



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

**PAPEL DE LAS CITIDINA DESAMINASAS EN
LA HOMEOSTASIS DE PIRIMIDINAS EN
*Trypanosoma brucei***

Universidad de Granada

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Ana Moro Bulnes

Tesis Doctoral

Septiembre 2021



**PAPEL DE LAS CITIDINA DESAMINASAS EN
LA HOMEOSTASIS DE PIRIMIDINAS EN
*Trypanosoma brucei***

Memoria presentada por la Graduada
Ana Moro Bulnes para optar
al grado de Doctora en
Bioquímica y Biología Molecular

Granada, Septiembre de 2021

Ana Moro Bulnes

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Moro Bulnes
ISBN: 978-84-1117-147-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71754>

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN	3
A.1. ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS	3
A.1.1. Tripanosomiasis africana	4
A.1.1.1. Epidemiología	4
A.1.1.2. Cuadro clínico y tratamiento	6
A.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>T. brucei</i>	8
A.2.1. Filogenia y ciclo de vida.....	8
A.2.2. Estructura celular y aspectos singulares de su biología.....	10
A.2.3. Ciclo celular	16
A.3. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS EN <i>T. brucei</i>	20
A.3.1. Transportadores de nucleótidos, nucleósidos y nucleobases	20
A.3.2. Metabolismo de purinas.....	24
A.3.3. Metabolismo de pirimidinas.....	28
A.4. ENZIMAS CON ACTIVIDAD DESAMINASA	35
A.4.1. Citidina desaminasas.....	38
A.4.2. Citosina desaminasas	42
A.4.3. Desaminasas de desoxicitidina-5'-monofosfato (dCMP desaminasas).....	44
A.4.4. Desaminasas de desoxicitidina-5'-trifosfato (dCTP desaminasas).....	45
A.4.5. Desaminación de citidina en ácidos nucleicos.....	46
B. OBJETIVOS	55
C. MATERIAL Y MÉTODOS	59
C.1. MATERIAL	59
C.1.1. Líneas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i>	59
C.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	60
C.1.3. Medios de cultivo	61
C.1.3.1. Medios de cultivo para parásitos	61
C.1.3.2. Medios de cultivo para bacterias	61
C.1.4. Soluciones y tampones.....	62
C.1.5. Compuestos	63
C.1.5.1. Nucleótidos, nucleósidos y nucleobases.....	63
C.1.5.2. Antibióticos	64
C.1.5.3. Otros compuestos.....	65

C.1.6.	Anticuerpos.....	66
C.1.7.	Oligonucleótidos.....	67
C.1.8.	Plásmidos.....	69
C.1.9.	Software y bases de datos.....	71
C.1.9.1.	Programas informáticos.....	71
C.1.9.2.	Bases de datos.....	72
C.1.10.	Análisis estadístico.....	72
C.2.	MÉTODOS.....	73
C.2.1.	Cultivo y manipulación de <i>Trypanosoma brucei</i>	73
C.2.1.1.	<i>Cultivo de Trypanosoma brucei</i>	73
C.2.1.2.	Criopreservación y descongelación.....	74
C.2.1.3.	Transfección y generación de líneas celulares.....	74
C.2.1.3.1.	Transfección estable mediante electroporación.....	74
C.2.1.3.2.	Generación de líneas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i>	76
C.2.2.	Purificación y caracterización <i>in vitro</i> de dos citidina desaminasas recombinantes de <i>T. brucei</i>	79
C.2.2.1.	Construcción de plásmidos.....	79
C.2.2.2.	Expresión de His-TbCDA y His-TbCDA-like.....	79
C.2.2.3.	Purificación de His-TbCDA recombinante.....	80
C.2.2.4.	Caracterización enzimática de His-TbCDA.....	81
C.2.3.	Estudios celulares a partir de <i>T. brucei</i> para la caracterización de la citidina desaminasa-like.....	81
C.2.3.1.	Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS) y tinción con DAPI.....	81
C.2.3.2.	Análisis metabolómico.....	82
C.2.3.3.	Cuantificación de los niveles de ribonucleótidos intracelulares.....	83
C.2.3.4.	Determinación de la actividad de unión a ARN mediante Orthogonal Organic Phase Separation (OOPS).....	83
C.2.3.5.	Análisis de la expresión génica mediante NGS (Next-generation transcriptome sequencing) RNA-seq.....	84
C.2.4.	Técnicas inmunológicas.....	86
C.2.4.1.	Obtención y purificación de anticuerpos policlonales.....	86
C.2.4.1.1.	Obtención y purificación de anti-TbCDA.....	86

C.2.4.1.2.	Obtención y purificación de anti-TbCDA-like.....	87
C.2.4.2.	Generación de extractos de <i>T. brucei</i> y western-blot.....	90
C.2.4.3.	Análisis mediante inmunofluorescencia.....	91
C.2.4.4.	Análisis de la localización de TbCDA-like en condiciones de estrés nutricional.....	92
D.	RESULTADOS.....	97
D.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA CITIDINA DESAMINASA DE <i>Trypanosoma brucei</i> (TbCDA).....	97
D.1.1.	Identificación de un ortólogo de la citidina desaminasa en <i>T. brucei</i>	97
D.1.2.	Expresión de la proteína recombinante TbCDA en el sistema heterólogo <i>Escherichia coli</i>	98
D.1.3.	Purificación de TbCDA recombinante e identificación mediante huella de masa peptídica.....	100
D.1.4.	Determinación de la masa molecular y de la conformación nativa de TbCDA.....	103
D.1.5.	Caracterización cinética de TbCDA.....	105
D.1.6.	Papel de TbCDA y TbdUTPasa en la provisión de dUMP para la síntesis de dTMP en <i>T. brucei</i>	107
D.1.6.1.	La deficiencia de TbCDA puede ser contrarrestada mediante la adición de altas concentraciones de nucleósidos pirimidínicos.....	107
D.1.6.2.	La dUTPasa de <i>T. brucei</i> no juega un papel relevante en la síntesis de dUMP.....	110
D.1.7.	Localización intracelular de TbCDA	113
D.2.	CARACTERIZACIÓN DE UNA CITIDINA DESAMINASA-LIKE EN <i>Trypanosoma brucei</i> (TbCDA-like).....	116
D.2.1.	Identificación de una citidina desaminasa-like de función desconocida en <i>T. brucei</i>	116
D.2.2.	Purificación de TbCDA-like recombinante.....	120
D.2.3.	Papel de TbCDA-like en la viabilidad celular de <i>T. brucei</i>	124
D.2.3.1.	La deficiencia y la sobreexpresión de TbCDA-like afectan a la tasa de proliferación de <i>T. brucei</i>	124
D.2.3.2.	TbCDA-like juega un papel importante en la progresión del ciclo celular de las formas procíclicas de <i>T. brucei</i>	128
D.2.3.3.	Implicación de TbCDA-like en la integridad genómica de <i>T. brucei</i>	132

D.2.4.	Papel de TbCDA-like en el metabolismo de nucleótidos y el perfil metabolómico de <i>T. brucei</i>	135
D.2.4.1.	La deficiencia de TbCDA-like altera el perfil metabolómico de <i>T. brucei</i>	135
D.2.4.2.	La deficiencia de TbCDA-like no puede ser compensada mediante la adición de nucleósidos o bases de pirimidina.....	139
D.2.4.3.	Variaciones en los niveles de expresión de TbCDA-like alteran el perfil de ribonucleótidos	142
D.2.5.	Localización intracelular de TbCDA-like e implicación en el metabolismo de ARN..	145
D.2.5.1.	Localización intracelular de TbCDA-like	145
D.2.5.2.	TbCDA-like presenta actividad de unión a ARN.....	148
D.2.5.3.	TbCDA-like se relocaliza en gránulos de estrés tras someter a los parásitos a condiciones de estrés nutricional	150
D.2.5.4.	Papel de TbCDA-like en la expresión diferencial de genes a nivel transcriptómico en <i>T. brucei</i>	157
E.	DISCUSIÓN	163
E.1.	TbCDA es una enzima esencial en el metabolismo de pirimidinas en <i>Trypanosoma brucei</i>	163
E.1.1.	Papel de la mitocondria en el metabolismo de pirimidinas y la síntesis de dTMP.....	163
E.1.2.	El metabolismo de nucleótidos se interconecta a través de los diferentes compartimentos de la célula.....	166
E.1.3.	La dUTPasa controla el ratio dUTP/dTTP	169
E.2.	TbCDA-like es una enzima esencial en <i>Trypanosoma brucei</i>	172
E.2.1.	TbCDA-like está implicada en el balance CTP/UTP	172
E.2.2.	TbCDA-like altera los niveles de γ -glutamil aminoácidos y fosfolípidos.....	175
E.2.3.	Citidina desaminasas y edición de ARN	179
E.2.4.	TbCDA-like está implicada en la respuesta a estrés en <i>T. brucei</i>	183
F.	CONCLUSIONES	191
G.	REFERENCIAS	195

ABREVIATURAS

A

AcN: acetonitrilo

ADA: adenosina desaminasa

ADAR: adenosina desaminasa que actúa sobre ARNm

ADAT: adenosina desaminasa que actúa sobre ARNt

Ade: adenina

ADNc: ADN complementario

ADNr: ADN ribosomal

Ado: adenosina

ADSL: adenilosuccinato liasa

ADSS: adenilosuccinato sintetasa

AK: adenosina kinasa

AMP: adenosina-5'-monofosfato

Amp: ampicilina

AMPD: AMP desaminasa

APRT: adenina fosforribosiltransferasa

ara-A: adenina arabinósido

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ARNt^{Thr}: ARN de transferencia de la treonina

ATCasa: aspartato transcarbamilasa

AtCDA: citidina desaminasa de *Arabidopsis thaliana*

ATP: adenosina-5'-trifosfato

B

BES: sitio de expresión telomérico o *telomeric bloodstream expression site*

Bla: blasticidina

Bp: pares de bases o *base pair*

BSA: albúmina sérica bovina

BsCDA: citidina desaminasa de *Bacillus subtilis*

C

CDA: citidina desaminasa

CHCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

CMP: citidina-5'-monofosfato

CNT: transportador concentrativo de nucleósidos o *concentrative nucleoside transporter*

CoDA: citosina desaminasa

CPSII: carbamoil fosfato sintetasa II

CRK: quinasa relacionada con Cdc2 o *Cdc2-related kinase*

Ctd: citidina

CTP: citidina-5'-trifosfato

CTPS: CTP sintetasa

Cyt: citosina

D

dAdo: 2'-desoxiadenosina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

dCMP: 2'-desoxicitidina-5'-monofosfato

dCtd: 2'-desoxicitidina
DCTD: desoxicitidina-5'-monofosfato desaminasa
dCTP: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DEG: genes diferencialmente expresados
DIC: contraste diferencial de interferencia o *differential interference contrast*
DHFR: dihidrofolato reductasa
DHFR-TS: dihidrofolato reductasa – timidilato sintasa
DHO: dihidroorotasa
DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa
dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
DO: densidad óptica
DOX: doxiciclina
dTDP: timidina-5'-difosfato
dThd: timidina
dTMP: timidilato o timidina-5'-monofosfato
DTT: ditioneitol
dTTP: timidina-5'-trifosfato
dUDP: 2'-desoxiuridina-5'-difosfato
dUMP: 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
dUrd: 2'-desoxiuridina
dUTP: 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato
dUTPasa: desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa

E

EcCDA: citidina desaminasa de *Escherichia coli*
EDTA: ácido etilén diamino tetraacético
ENT: transportador equilibrativo de nucleósidos o *equilibrative nucleoside transporter*

F

FACS: clasificación de células activadas por fluorescencia o *fluorescence-activated cell sorting*
FAZ: zona de anclaje del flagelo o *flagellum attachment zone*
Fleo: fleomicina
FPLC: cromatografía rápida líquida de proteínas

G

G-418: geneticina
GCL: glutamato-cisteína ligasa
γ-GCT: γ-glutamil ciclotransferasa
GDA: guanina desaminasa
GGT: γ-glutamil transpeptidasa
GMP: guanosina-5'-monofosfato
GMPR: GMP reductasa
GMPS: GMP sintasa
GS: glutatión sintetasa
Gua: guanina
Guo: guanosina

H

HGPRT: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

HGXPRT: hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa

HsCDA: citidina desaminasa humana

HsDCTD: desoxicitidina monofosfato desaminasa humana

HSP: proteína de choque térmico o *heat shock protein*

Hig: higromicina

Hyp: hipoxantina

I

IAG-NH: inosina-adenosina-guanosina hidrolasa

IG-NH: inosina-guanosina hidrolasa

IMP: inosina-5'-monofosfato

IMPDH: IMP deshidrogenasa

Ino: inosina

IPBLN: Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

K

Kan: kanamicina

kDa: kilodalton

k_{cat} : constante catalítica

KI: *knock-in*

K_m : constante de Michaelis

KO: *knock-out*

M

MBP: proteína de unión a maltosa o *maltose binding protein*

MCF: familia de transportadores mitocondriales o *mitochondrial carrier family*

5-Met-dCtd: 5-metil-2'-desoxicitidina

N

ncRNA: ARN no codificante o *non-coding RNA*

NDK: nucleósido difosfato kinasa

NH: nucleósido hidrolasa

O

OE: sobreexpresión (*overexpression*)

OMP: orotidina-5'-monofosfato

OMPDC: orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa

OPRT: orotato fosforribosiltransferasa

OOPS: *orthogonal organic phase separation*

ORF: marco abierto de lectura o *open reading frame*

P

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PRTasa: fosforribosiltransferasa

PTU: unidad de transcripción policistrónica o *polycistronic transcription units*

Pur: puromicina

R

RHS: *retrotransposon hot spot*

RNAi: ARN de interferencia

RNR: ribonucleótido reductasa
rNTP: ribonucleótido trifosfato
RT: temperatura ambiente o *room temperature*

S

SBF: suero bovino fetal
SGs: gránulos de estrés o *stress granules*
SHMT: serina hidroximetiltransferasa
sKO: *single knock-out* o knock-out de un alelo
SLC: transportadores de solutos o *solute carriers*

T

TAC: complejo de anclaje tripartito o *tripartite attachment complex*
TbCDA: citidina desaminasa de *Trypanosoma brucei*
TbdUTPasa: desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa de *Trypanosoma brucei*
TbTK: timidina kinasa de *Trypanosoma brucei*
TbTMPK: timidilato kinasa de *Trypanosoma brucei*
TFA: ácido trifluoro acético
TK: timidina kinasa
Tris: tris(hidroximetil)-amino metano
TS: timidilato sintasa

U

UDP: uridina-5'-difosfato
UMP: uridina-5'-monofosfato
UMPS: UMP sintasa

UNG: uracil ADN glicosilasa
UPasa: uridina fosforilasa
UPRT: uracilo fosforribosiltransferasa
Ura: uracilo
Urd: uridina
UTP: uridina-5'-trifosfato
UTR: región no traducida o *untranslated región*

V

VSG: glicoproteína variante de superficie o *variant surface glycoprotein*
V_{max}: velocidad máxima

X

Xan: xantina
Xao: xantosina
XMP: xantosina-5'-monofosfato

INTRODUCCIÓN

A. INTRODUCCIÓN

A.1. ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades tropicales desatendidas (ETDs) son en su mayoría enfermedades infecciosas que proliferan en entornos empobrecidos, y de forma especial en el ambiente caluroso y húmedo de los climas tropicales.

Se trata de un conjunto de enfermedades que afectan a 149 países con más de mil millones de personas infectadas causando una importante mortalidad y morbilidad y en ocasiones la estigmatización y discriminación de las personas afectadas. El término “desatendidas” hace referencia al hecho de que la incidencia es alta en países con dificultades para el acceso a la atención sanitaria, especialmente en áreas rurales o en conflicto donde no existen condiciones adecuadas de vivienda y saneamiento. Por otra parte, la desatención también se produce a nivel de investigación y desarrollo puesto que los incentivos para la inversión en nuevos medicamentos y vacunas son escasos para enfermedades que no suponen un amplio mercado. Sin embargo, desde 2005 la OMS ha diseñado e implantado una estrategia innovadora para combatir estas enfermedades desatendidas basada en cinco pilares fundamentales: i) atención innovadora e intensificada a las ETDs; ii) quimioprofilaxis a gran escala; iii) ecología y gestión de los vectores; iv) salud pública veterinaria y v) suministro de agua salubre, saneamiento e higiene (Engels y Zhou 2020).

Desde principios de los años 2000 la OMS reconocía 17 enfermedades diferentes causadas por virus, bacterias y protozoos como ETDs (Fig. A1) aunque desde 2016 han incorporado 3 nuevos grupos de enfermedades (micosis profundas, sarna y otros ectoparásitos y envenenamiento por mordeduras de serpiente) ampliándose así hasta 20 el número de patologías englobadas dentro del término ETD.

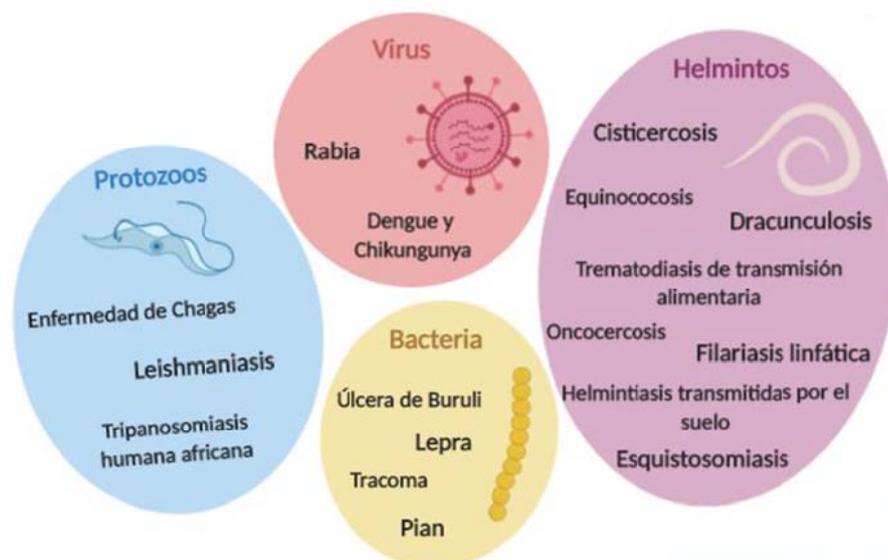


Figura A1. Esquema de las enfermedades tropicales desatendidas causadas por virus, bacterias, protozoos y helmintos. Imagen basada en el “Neglected Tropical Diseases: Progress and Challenges for the Post-2015 Development Era” (Science in the News (Harvard University) (<http://sitn.hms.harvard.edu/>)). Creado con BioRender.

Cabe destacar la importancia de especies de la clase kinetoplástida como *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp., como agentes causantes de enfermedades que originan un enorme impacto social y económico. Concretamente, diversas especies del género *Trypanosoma* son responsables de 2 importantes ETDs, como es la enfermedad de Chagas en América, causada por *Trypanosoma cruzi*, y la tripanosomiasis humana africana, también conocida como enfermedad del sueño causada por varias subespecies de *Trypanosoma brucei*.

A.1.1. Tripanosomiasis africana

A.1.1.1. Epidemiología

La tripanosomiasis humana africana (HAT, *Human African Trypanosomiasis*) conocida comúnmente como la enfermedad del sueño, es una ETD causada por protozoos parásitos pertenecientes a diversas subespecies de *Trypanosoma brucei*. Se

trata de una patología endémica en 36 países del África subsahariana siendo *T. brucei gambiense* la especie responsable de originar una forma crónica de HAT en las regiones oeste y central de África, mientras que la especie *T. brucei rhodesiense* causa una forma aguda de progresión rápida de la enfermedad en las regiones este y sur del continente (Fig. A2). En cambio, *T. brucei brucei* no es capaz de infectar humanos pero junto con *T. congolense* y *T. vivax* es responsable de la infección en animales, tanto salvajes como domésticos, originando la tripanosomiasis animal africana (AAT, *Animal African Trypanosomiasis*) o nagana que causa enormes pérdidas económicas cada año en el sector ganadero. Mientras que la AAT está ampliamente distribuida por todas las zonas donde se encuentra presente el insecto vector, moscas del género *Glossina* comúnmente conocida como mosca tse-tsé, la HAT presenta una distribución en focos como resultado de complejas interacciones entre el vector, el parásito y el hospedador. Habitualmente esos focos se localizan en áreas rurales y periurbanas donde se produce un contacto frecuente entre el vector y los humanos como consecuencia de actividades como la caza, la pesca, la ganadería o la recolección de agua y madera. De las 31 especies del género *Glossina*, que a su vez se subdividen en grupos dependiendo de si se localizan en zonas de sabana, bosques o ríos, sólo algunas juegan realmente un papel importante en la transmisión. Concretamente, *G. fuscipes* y *G. palpalis* son las principales especies responsables de la transmisión de *T. b. gambiense* mientras que *G. fuscipes* (Uganda), *G. morsitans* y *G. pallidipes* son las especies responsables de la transmisión de *T. b. rhodesiense* (Buscher, Cecchi et al. 2017).

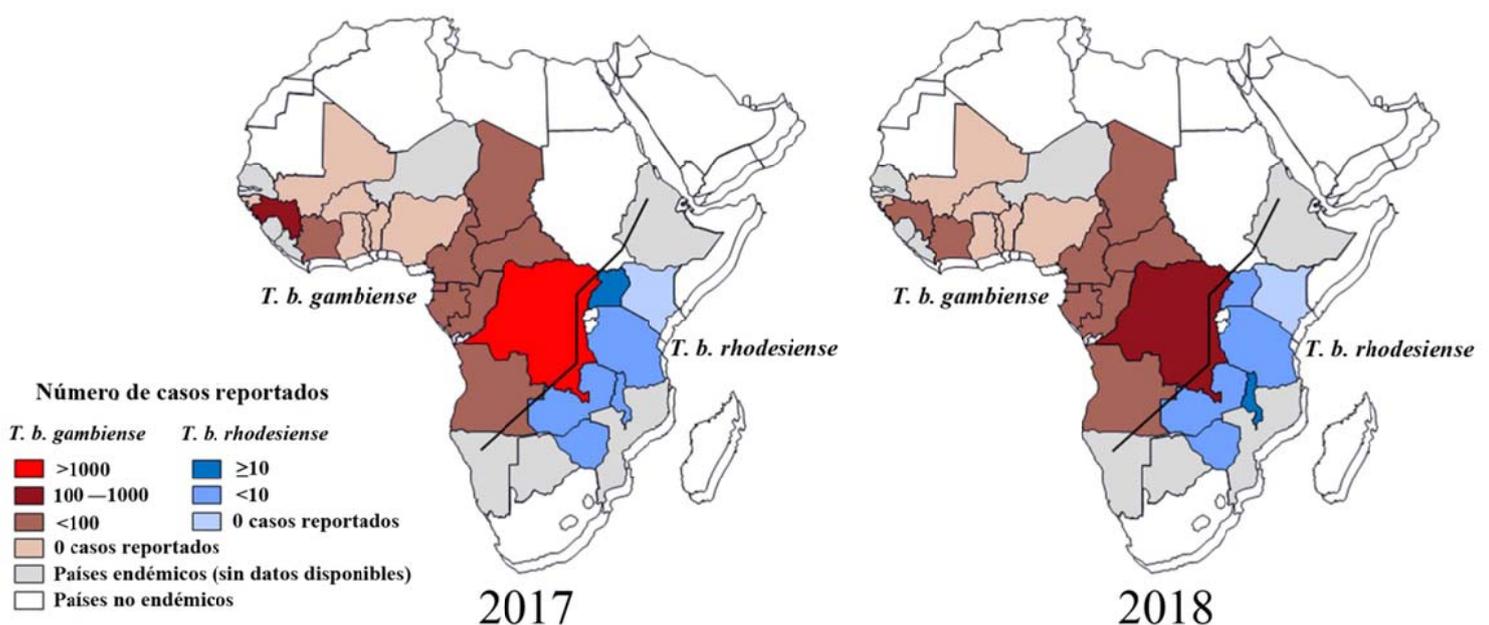


Figura A2. Distribución de la tripanosomiasis humana africana en países endémicos (adaptada de Gao, Qian et al. 2020). Se muestran datos de la OMS de 2017 y 2018. Se observa la clara distribución de la tripanosomiasis humana africana causada por 2 especies de protozoos parásitos del género *Trypanosoma*: *T. b. gambiense* que se distribuye por la región central y oeste de África y *T. b. rhodesiense* en la región este y sur del continente.

En la última década del siglo XX se produjo un alarmante incremento en el número de nuevos casos reportados llegándose a niveles de cerca de 40000 nuevos casos por año, lo que hizo necesario el refuerzo y el desarrollo de actividades coordinadas de vigilancia y control de la HAT. Así pues, de los 300000 casos totales estimados en 1998 por parte de la OMS, en 2018 se alcanzaron mínimos históricos con cifras por debajo de los 1000 nuevos casos reportados siendo aproximadamente el 98% de los mismos causados por *T. b. gambiense* y el 2% restante por *T. b. rhodesiense* (Gao, Qian et al. 2020).

No debemos olvidar que el movimiento de personas como turistas, personal militar o migrantes, supone la posibilidad de exportar casos de HAT fuera del continente africano, de hecho, se han reportado casos de HAT exportados a otros continentes, localizándose en Europa la mayoría de los casos. El mayor porcentaje de casos es originado por *T. b. rhodesiense* como consecuencia de la infección de turistas que han visitado Parques Nacionales y Reservas en Tanzania así como Malawi, Zambia o Zimbabwe. Así pues, en el periodo comprendido entre 1990 y 2018, de los 144 casos de HAT exportados, 101 fueron causados por *T. b. rhodesiense* (Buscher, Cecchi et al. 2017, Gao, Qian et al. 2020).

A.1.1.2. Cuadro clínico y tratamiento

El transcurso de la patología depende de diversos aspectos como la subespecie de *T. brucei* implicada, la cepa o el propio individuo en sí. Por lo general la HAT es mortal en ausencia de tratamiento, con una progresión de unos 3 años en el caso de la enfermedad causada por *T. b. gambiense* o alrededor de 6 meses en el caso de *T. b. rhodesiense* (Buscher, Cecchi et al. 2017).

La HAT se manifiesta en 2 estadios bien diferenciados. En primer lugar la fase hemolinfática en la que el parásito se multiplica y distribuye por el torrente sanguíneo, sistema linfático, órganos sistémicos (como el hígado, el bazo o el corazón) y órganos endocrinos. Los síntomas principales de esta primera fase son: fiebre intermitente, artralgia, anemia hemolítica, linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia, alteraciones endocrinas, pericarditis, etc. Pocas semanas después (meses en el caso de *T. b. gambiense*), los parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica para alcanzar el sistema nervioso central dando comienzo a la fase meningoencefálica. Esta fase se caracteriza por alteraciones del sueño, de donde la enfermedad toma su nombre común, con somnolencia diurna e insomnio nocturno así como otras alteraciones derivadas de la afectación del sistema nervioso como ataxia, acinesia, alteraciones del discurso, déficit de atención, comportamiento agresivo, etc. (Buscher, Cecchi et al. 2017, Kennedy y Rodgers 2019).

El tratamiento de la HAT depende de si el paciente se encuentra en la primera o la segunda fase y de si la infección ha sido causada por *T. b. gambiense* o *T. b. rhodesiense*, siendo en ambos casos efectivo y menos tóxico el tratamiento de la fase hemolinfática (Kennedy y Rodgers 2019). Actualmente se administra pentamidina por vía intramuscular o intravenosa para tratar la primera fase de la infección causada por *T. b. gambiense* y suramina por vía intravenosa para tratar la primera fase de la infección causada por *T. b. rhodesiense*. En el caso de que la enfermedad se encuentre en la segunda fase, para *T. b. gambiense* se emplea una terapia combinada de nifurtimox por vía oral y eflornitina por vía intravenosa siendo esta terapia mucho mejor tolerada y más fácil de administrar que la sola administración de eflornitina. Además, la combinación de ambos fármacos reduce drásticamente la probabilidad de aparición de resistencias por parte del parásito (Buscher, Cecchi et al. 2017). Para *T. b. rhodesiense* se emplea melarsoprol por vía intravenosa.

Algunos de estos fármacos tienen graves efectos secundarios, como el síndrome encefalopático causado por el melarsoprol y que se da en el 5-10% de los pacientes siendo mortal en aproximadamente la mitad de esos casos (Baker y Welburn 2018, Kennedy y Rodgers 2019), así como la mielosupresión que puede causar la eflornitina, o la nefrotoxicidad o agranulocitosis que puede causar la suramina (Buscher, Cecchi et al. 2017). Todo esto unido al hecho de que, a excepción del nifurtimox, ninguno de los fármacos empleados son activos por vía oral y requieren una administración compleja y

prolongada en el tiempo (generalmente son necesarios al menos 7 días de tratamiento), hacen especialmente necesario el desarrollo de nuevos fármacos activos por vía oral.

Existen principalmente dos nuevos fármacos prometedores para el tratamiento de la HAT y activos por vía oral. En primer lugar, el fexinidazol (perteneciente al grupo de los nitroheterociclos, como el nifurtimox) fue aprobado en diciembre de 2019 para su uso en la República Democrática del Congo. En marzo de 2019 el fexinidazol se incluyó en la lista de medicamentos esenciales de la OMS y se recomienda como tratamiento de primera línea para para ambos estadios de la infección causada por *T. b. gambiense* (Neau, Hanel et al. 2020). En segundo lugar, el acoziborol o SCYX-7158 demostró ser seguro en estudios de fase I en 2015 y desde finales de 2016 se encuentra en estudios de fase II/III con pacientes afectados por *T. b. gambiense* en África (Dickie, Giordani et al. 2020).

A.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE *T. brucei*

A.2.1. Filogenia y ciclo de vida

T. brucei es un protozoo parásito perteneciente a la clase Kinetoplastea, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, especie *brucei*. Se trata de un parásito extracelular que presenta un ciclo de vida digenético que transcurre entre un hospedador invertebrado que sirve como vector y un hospedador mamífero. A lo largo del ciclo *T. brucei* sufre importantes adaptaciones metabólicas que se ven reflejadas en cambios morfológicos.

La infección del hospedador mamífero comienza cuando la mosca tse-tsé inyecta la saliva junto con los tripomastigotes metacíclicos en la piel del huésped al alimentarse. Tras varios días durante los cuales los tripanosomas se multiplican en el lugar de la picadura, se distribuyen por los órganos periféricos y los tejidos mediante el sistema linfático y el torrente sanguíneo. Finalmente los parásitos atravesarán el parénquima cerebral desencadenando un proceso inflamatorio acompañado de daño neurológico (Buscher, Cecchi et al. 2017). En el torrente sanguíneo *T. brucei* se presenta en 2 formas bien diferenciadas. La forma “alargada” o *slender*, que se caracteriza por emplear

glucosa como fuente única de carbono para la obtención de ATP, presentar una única mitocondria tubular escasamente funcional y la membrana celular recubierta de una densa capa de glicoproteínas denominadas VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) que la protegen del sistema inmune (Buscher, Cecchi et al. 2017, Smith, Bringaud et al. 2017). La otra forma es la “rechoncha” o *stumpy* no proliferativa que se encuentra retenida en la fase G0/G1 del ciclo celular. El proceso de diferenciación a esta forma *stumpy* se inicia cuando la parasitemia alcanza niveles elevados produciéndose así un arresto en el crecimiento que permite a los parásitos asegurar la supervivencia del hospedador provocando la cronicidad de la infección, así como adaptarse al ambiente completamente diferente que se da en el interior del insecto vector (Rojas y Matthews 2019, Szoor, Silvester et al. 2020). De hecho, las formas *stumpy* soportan los cambios de pH y la actividad proteolítica, presentan una mitocondria más desarrollada y pueden utilizar el α -cetoglutarato como alternativa a la glucosa como fuente de energía (Szoor, Silvester et al. 2020). Este proceso de transición se basa en un mecanismo de quorum sensing dependiente de la densidad celular de modo que a medida que la parasitemia aumenta, se produce y acumula el factor SIF (*Stumpy Induction Factor*) cuya identidad química ha resultado un misterio durante los últimos 20 años. Publicaciones recientes señalan que este factor SIF consiste en un conjunto de pequeños oligopéptidos que se generan por la acción de peptidasas liberadas al medio por parte de la población creciente de parásitos y que degradan sustratos del hospedador (Rojas y Matthews 2019).

Finalmente, cuando el vector se alimenta de sangre procedente de un mamífero con tripanosomiasis, algunos parásitos se habrán diferenciado a la forma *stumpy* metabólicamente preadaptada para la supervivencia en el insecto. Una vez en el intestino de la mosca, las formas *stumpy* se transforman en tripomastigotes procíclicos que emplean la prolina como principal fuente de energía y presentan una mitocondria ramificada y plenamente activa. Así mismo, la membrana celular en las formas procíclicas está cubierta por prociclina en lugar de VSGs (Silvester, McWilliam et al. 2017, Smith, Bringaud et al. 2017). A continuación, los parásitos alcanzarán el proventrículo, donde se diferenciarán a epimastigotes que una vez alcancen las glándulas salivares se transforman en las formas metacíclicas infectivas para el hospedador mamífero y cerrándose así el ciclo (Fig. A3) (Smith, Bringaud et al. 2017).

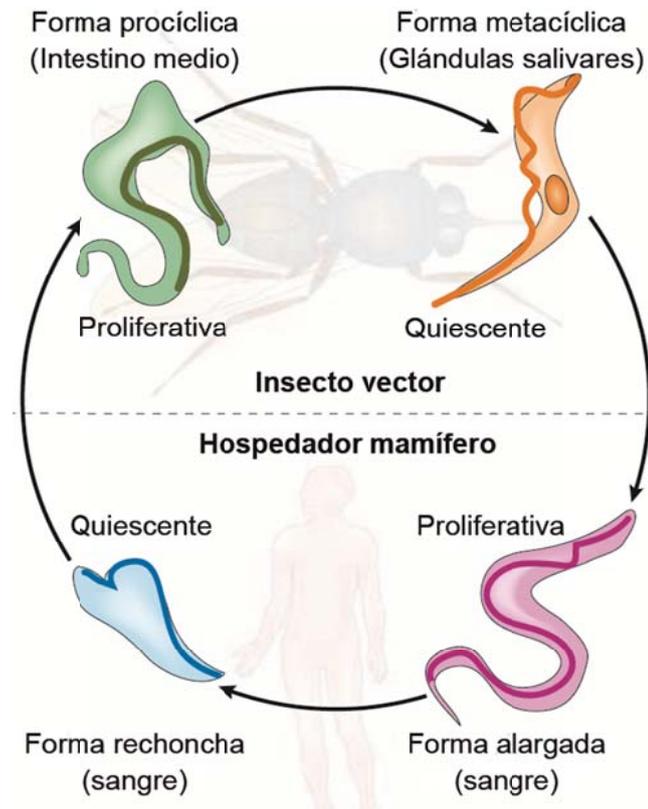


Figura A3. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (adaptado de Pays, Vanhollebeke et al. 2006). *T. brucei* es un protozoo parásito extracelular que se multiplica y se disemina por el hospedador mamífero a través del torrente sanguíneo y la linfa en su forma sanguínea alargada. Cuando la parasitemia es elevada, se produce la diferenciación, mediante un mecanismo de quorum sensing, a la forma sanguínea rechoncha no proliferativa y preadaptada a la vida en el insecto vector. Cuando la mosca tsé-tsé se alimenta de sangre de un hospedador infectado, ingiere parásitos en la forma rechoncha que se diferencian a tripomastigotes procíclicos en el intestino de la mosca. Finalmente, estas formas procíclicas migrarán hacia las glándulas salivares donde se diferenciarán a epimastigotes y posteriormente a tripomastigotes metacíclicos que son la forma infectiva para el hospedador mamífero, cerrándose así el ciclo.

A.2.2. Estructura celular y aspectos singulares de su biología

Trypanosoma brucei en las distintas etapas de su desarrollo presenta una forma elongada de unos 15 – 30µm de longitud (Fig. A4) y una estructura celular flexible pero robusta en la que la característica forma del tripomastigote viene definida por el conjunto de microtúbulos paralelos que se disponen a lo largo de la célula y que le confieren una elevada resistencia al daño. Probablemente se trata de una adaptación

encaminada a ayudar al parásito a sobrevivir en diferentes ambientes con condiciones físicas y químicas muy cambiantes (Ooi y Bastin 2013, Sunter y Gull 2016). Como consecuencia de esta robusta estructura, no es posible que se produzcan invaginaciones de la membrana a lo largo de la superficie celular para llevar a cabo procesos de endo o exocitosis siendo únicamente posible el intercambio de sustancias a través del bolsillo flagelar (zona por la que el flagelo sale de la célula). Además, en este bolsillo se localizan numerosos receptores como el de la transferrina (Sunter y Gull 2016). De hecho, la endocitosis es un proceso de enorme importancia para las formas sanguíneas de *T. brucei* dado que el recambio de las VSGs depende de ello, siendo por tanto una zona clave para las interacciones parásito-hospedador (Ooi y Bastin 2013, Langousis y Hill 2014).

T. brucei posee un único flagelo que está presente durante todos los estadios de su desarrollo. Es esencial para la viabilidad y permite el movimiento de la célula. Además, parece estar implicado en múltiples facetas del desarrollo, transmisión y patogénesis. Juega por tanto un papel crucial en la morfogénesis de la célula, la división celular y la herencia de estructuras celulares esenciales, así como en la interacción parásito-hospedador ya que interviene en la unión a los tejidos del hospedador. El flagelo emerge de la parte posterior de la célula y define el eje antero-posterior. Está constituido por un axonema canónico de tipo 9+2 que es la señal distintiva de los flagelos móviles y se ancla al citoplasma por la parte posterior a través del cuerpo basal (Ooi y Bastin 2013, Langousis y Hill 2014). Probablemente, el mejor ejemplo de la importancia del flagelo lo encontremos en el caso del genoma mitocondrial, que está organizado como una estructura tipo disco denominada kinetoplasto y que está físicamente unido al cuerpo basal mediante filamentos que atraviesan el citoplasma y las membranas mitocondriales interna y externa, de modo que para la correcta segregación de los kinetoplastos durante la división celular es fundamental la unión a esta estructura filamentosa denominada “complejo de anclaje tripartito” o *tripartite attachment complex* (TAC) (Hoffmann, Kaser et al. 2018). La mayor parte del flagelo está conectado al citoesqueleto de la célula a través de una región de anclaje conocida como *flagellum attachment zone* (FAZ) (Ooi y Bastin 2013).

Al contrario de lo que ocurre en levaduras y mamíferos, que poseen un número elevado de mitocondrias que se dividen constantemente, *T. brucei* posee una única mitocondria que contiene una copia del genoma mitocondrial (kinetoplasto). La inusual

organización del kinetoplasto consta de dos elementos genéticos: los maxicírculos, con 25 copias que codifican para ARNs ribosomales y proteínas de función desconocida o subunidades de los complejos de la fosforilación oxidativa y los minicírculos, con alrededor de unas 5000 copias que codifican para los ARNs guía. Es importante destacar la ausencia de genes que codifiquen ARNs, lo que demuestra que todos los ARNs mitocondriales tienen que importarse desde el citosol. Dado que sólo existe una copia del kinetoplasto, es muy importante que su replicación esté coordinada con la replicación del ADN nuclear (Schneider y Ochsenreiter 2018). Las formas sanguíneas del parásito dependen casi por completo de la glucólisis para la obtención de energía de manera que no llevan a cabo la fosforilación oxidativa y por tanto, poseen una mitocondria escasamente desarrollada. Sin embargo, las formas procíclicas dependen del metabolismo de aminoácidos para la obtención de energía y poseen una mitocondria funcional y estructuralmente mucho más compleja en la que se lleva a cabo la fosforilación oxidativa (Hoffmann, Kaser et al. 2018).

Los glicosomas son orgánulos parecidos a los peroxisomas especializados que se encuentran en organismos pertenecientes a las clases Kinetoplastea y Diplonemea dentro del Reino protista, lo que incluye parásitos tripanosomátidos de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* (Allmann y Bringaud 2017). La glucosa es el sustrato preferente para *T. brucei* dentro del hospedador mamífero puesto que en el torrente sanguíneo hay buena disponibilidad de la misma. Las formas sanguíneas de *T. brucei* sólo pueden generar ATP a partir de la glucólisis (Haanstra, Bakker et al. 2014) que, de hecho, es la ruta que tiene lugar principalmente dentro de los glicosomas. La mayor parte de la glucólisis ocurre dentro de dicho orgánulo tanto en las formas procíclicas (hasta el 1,3-bisfosfoglicerato) como en las sanguíneas (hasta 3-fosfoglicerato), mientras que las reacciones finales hasta la obtención de piruvato ocurren en el citosol (Haanstra, Bakker et al. 2014, Allmann y Bringaud 2017). Existen otras particularidades que hacen tan característico a este orgánulo puesto que se han identificado otras rutas que tienen lugar en su interior como la fermentación succínica, la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, el salvamento de purinas, o la síntesis de pirimidinas. El catabolismo de purinas está presente en los peroxisomas de la mayoría de los eucariotas pero no así en los glicosomas, que han adquirido otras rutas implicadas en el metabolismo de nucleótidos, como los 2 últimos pasos de la síntesis *de novo* de pirimidinas y algunas enzimas implicadas en el salvamento de purinas así como la

mayoría de enzimas implicadas en la síntesis de nucleótidos glicosilados a partir de glucosa (Allmann y Bringaud 2017).

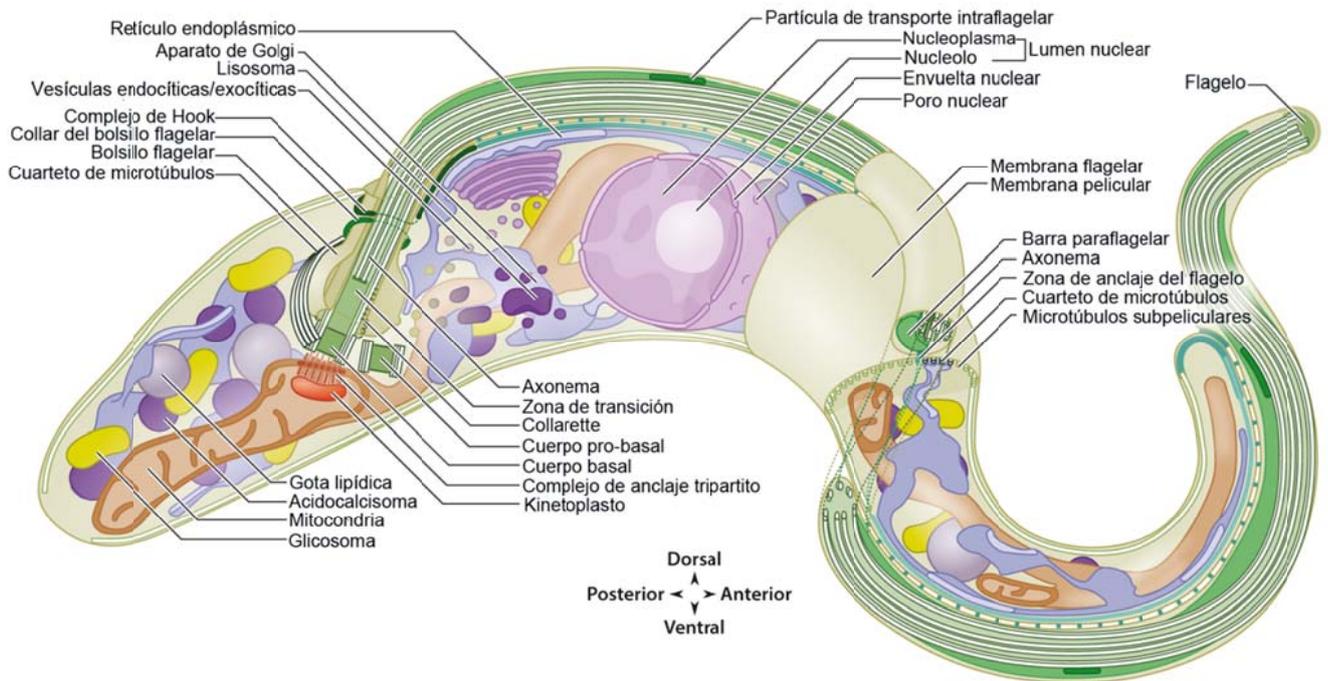


Figura A4. Morfología de *T. brucei* (adaptado de Wheeler, Gull et al. 2019). Estructura celular y orgánulos del tripomastigote procíclico.

Generalmente, la investigación se centra en especies causantes de patologías, pero existen muchos otros aspectos interesantes en la biología de los tripanosomátidos. Por ejemplo, el anclaje de glicosilfosfatidilinositol a la membrana, el *trans-splicing*, la edición de ARN o la transcripción policistrónica eucariota de genes que codifican proteínas, son procesos que fueron descritos por primera vez en tripanosomátidos (Field y Carrington 2009).

Variación antigénica: Las glicoproteínas variantes de superficie o *Variant Surface Glycoproteins* (VSGs) constituyen una cubierta protectora que recubre a la célula durante la infección del hospedador mamífero y constituye el 20% del proteoma total de la célula (Horn 2014) y alrededor del 95% del proteoma de la superficie de parásito, de manera que mediante impedimento estérico impiden a las proteínas invariantes de superficie unirse a anticuerpos del hospedador. Además de actuar como barrera protegiendo los epítomos invariantes de la superficie de *T. brucei*, las VSGs permiten la eliminación de los anticuerpos específicamente unidos a ellas mediante

procesos de endocitosis a través del bolsillo flagelar. El anticuerpo unido a la VSG es rápidamente degradado mientras que ésta, libre de anticuerpos, es devuelta a la superficie de la célula. Cuando los niveles circulantes de anticuerpo son muy elevados, este sistema no es suficiente para evadir la respuesta inmune del hospedador haciéndose necesario por parte de los parásitos expresar una VSG diferente (Mugnier, Stebbins et al. 2016). La clave del éxito a la hora de evadir al sistema inmune consiste en la expresión de una única VSG cada vez, de manera que a medida que el sistema inmune del hospedador reconoce una VSG y comienza a eliminar a los parásitos que la expresan, se producirá un cambio en la VSG expresada con una frecuencia de uno de cada cien mil parásitos (Horn 2014, Mugnier, Stebbins et al. 2016).

Las VSGs se transcriben desde uno de los ~15 sitios de expresión teloméricos o *telomeric bloodstream expression sites* (BESs) que presentan las formas sanguíneas del parásito. Así pues, cada vez sólo una VSG cubre la superficie del parásito excepto cuando éste se encuentra en proceso de recambio de una VSG por otra (Mugnier, Stebbins et al. 2016). Esto puede tener lugar mediante fenómenos de recombinación iniciados por roturas del ADN en el locus donde se localiza la VSG que se está expresando, de modo que el proceso de reparación culminará con la relocalización de otra VSG en el BES activo, o bien pueden darse eventos de exclusión alélica que se deben únicamente a mecanismos epigenéticos sin que se produzcan cambios en la secuencia de ADN. En este caso cesa la transcripción de la VSG que se encontraba activa y se inicia la transcripción de otra VSG a partir de otro BES distinto (Horn 2014, Mugnier, Stebbins et al. 2016).

Transcripción policistrónica y *trans-splicing* de ARN: los kinetoplastidos se han convertido en un modelo fundamental para el estudio del control de la expresión génica a nivel post-transcripcional dada su organización génica característica en la que los genes se agrupan en largos clúster o unidades de transcripción policistrónicas (*polycistronic transcription units* o PTUs), que comprenden hasta 100 ORFs y que son transcritas por la ARN polimerasa II (Preusser, Jae et al. 2012, Reynolds, Cliffe et al. 2014, Clayton 2016). La iniciación y la terminación de la transcripción tienen lugar en regiones flanqueantes de las PTUs llamadas *divergent strand switch regions* o *convergent strand switch regions*, respectivamente. La terminación y la iniciación también pueden ocurrir en sitios donde termina la transcripción de la PTU anterior y se

inicia la de la PTU posterior denominados *head-tail sites* (HT) (Reynolds, Cliffe et al. 2014).

Los mRNAs precursores son procesados para dar mRNAs maduros con la adición en 5' de la secuencia de 39 nucleótidos del *Splice Leader* mediante *trans-splicing* seguido por la poliadenilación en 3'. Los precursores también pueden ser degradados de modo que el equilibrio entre la degradación del mRNA precursor y su procesamiento determinará la cantidad de mRNA maduro sintetizado (Preusser, Jae et al. 2012, Reynolds, Cliffe et al. 2014, Clayton 2016). En otros eucariotas la terminación de la ARN polimerasa II está generalmente acoplada al procesamiento del mRNA en 3'. En kinetoplástidos, sin embargo, el procesamiento en 3' está acoplado al *trans-splicing* en 5' del gen adyacente, previniendo así la terminación prematura dentro de una PTU. Sin embargo, el mecanismo de terminación de la ARN polimerasa II en kinetoplástidos aún no se conoce (Reynolds, Cliffe et al. 2014).

Así pues, en su conjunto, tanto la organización génica como la transcripción policistrónica ha conducido a la suposición de que la transcripción en estos organismos es un proceso no regulado y que la mayor parte de la regulación de la expresión génica ocurre a nivel post-transcripcional. Sin embargo, recientemente se han descubierto numerosos marcadores epigenéticos, localizados específicamente en sitios de iniciación y terminación de la transcripción, incluyendo metilación y acetilación de histonas (Reynolds, Cliffe et al. 2014, Clayton 2016). Un papel importante en la regulación de la transcripción parece jugarlo la base J o β -d-glucosil-hidroximetiluracil, una modificación de la timidina que se genera fundamentalmente en las regiones teloméricas, aunque también se ha encontrado en regiones internas de los cromosomas concretamente en zonas de iniciación y terminación de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II. Se trata de una modificación presente únicamente en kinetoplástidos, aunque las funciones que ejerce la base J no son iguales en todos ellos. En *L. major*, la pérdida de la base J conduce a la generación de ARNs antisentido como consecuencia de eventos de *readthrough* en las *convergent strand switch regions* o los sitios HT. Por el contrario, en *T. brucei* no se producen defectos en la terminación de la transcripción en dichos sitios, sino que se observa una sobreexpresión de los genes que se localizan a continuación de la base J dentro de la misma PTU (Reynolds, Cliffe et al. 2014).

A.2.3. Ciclo celular

El ciclo celular eucariota es un proceso altamente regulado que implica una serie de eventos moleculares que deben ocurrir de forma perfectamente ordenada y controlada. Se distinguen clásicamente 4 fases: G_0/G_1 , S, G_2 y M (Fig. A5). El ADN se replica durante la fase S y tras la fase G_2 , que es la fase preparatoria para la mitosis y la citocinesis, se divide en la fase M. En células animales la citocinesis comienza antes de la segregación de los cromosomas de modo que ambos eventos se solapan. El ciclo celular de *Trypanosoma brucei* sigue básicamente el mismo esquema, pero presenta unas características únicas, puesto que la célula presenta una serie de orgánulos y estructuras de copia única, como el kinetoplasto, la mitocondria, el cuerpo basal y el flagelo. Estas estructuras que deben ser correctamente duplicadas y segregadas de forma coordinada y regulada para asegurar la correcta división celular. Dicha división ocurre longitudinalmente desde la región anterior hacia la posterior de la célula (Hammarton 2007, Li 2012).

Fase G_1 . Durante la fase G_1 las células examinan las condiciones ambientales para determinar si proliferan, se diferencian, entran en quiescencia o inducen la apoptosis (Hammarton 2007, Li 2012). Cuando las células en fase G_1 (aquella con un núcleo y un kinetoplasto, 1N1K) progresan a lo largo del ciclo celular, se pueden distinguir 3 subciclos que comprenden la correcta duplicación y segregación del (a) núcleo, (b) kinetoplasto y (c) conjunto de estructuras del citoesqueleto. En metazoos el punto clave que determina el inicio del ciclo celular es la entrada del núcleo en fase S iniciada irreversiblemente por la activación de Cdk2 a través de la ciclina E, cuyo análogo en *T. brucei* (CYC2) está implicado en el inicio de la fase S del núcleo y la mitosis (Wheeler, Gull et al. 2019). Así pues, de igual forma que en el resto de células eucariotas se requieren ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases* o CDKs) para regular los eventos del ciclo celular. *T. brucei* codifica en su genoma un total de 10 ciclinas y 11 quinasas relacionadas con Cdc2 (*Cdc2-related kinases* o CRKs) (Li 2012).

Fase S nuclear. El inicio de la fase S en el núcleo implica a las ciclinas CYC2, CYC4, CYC5 y CYC7, así como diversas CRKs (Hammarton 2007, Li 2012, Wheeler,

Gull et al. 2019). La replicación de los cromosomas se inicia a partir de orígenes de replicación bien definidos y cuya localización genómica coincide con lugares de inicio de la transcripción de unidades de transcripción policistrónica y donde se dan determinadas modificaciones de histonas (Wheeler, Gull et al. 2019).

Mitosis. La transición G2/M implica a las ciclinas CYC6 y CYC8 así como a las quinasas CRK3 y CRK9 (Hammarton 2007, Li 2012, Wheeler, Gull et al. 2019). La mitosis depende de la fase S del núcleo y es aparentemente independiente de la fase S del kinetoplasto y de los eventos del citoesqueleto. Comienza después de la división del kinetoplasto. El huso mitótico es una estructura constituida por paquetes de microtúbulos denominados kinetocoros a los que se unen los cromosomas a través de los centrómeros (secuencias repetitivas características) (Wheeler, Gull et al. 2019). Durante la mitosis, la envuelta nuclear permanece intacta (Li 2012).

Las formas procíclicas, al contrario que las sanguíneas carecen de un punto de control en la transición desde la mitosis a la citoquinesis. Así pues, en formas sanguíneas la inhibición de la mitosis previene a la célula de entrar en citoquinesis pero no así de entrar en ciclos sucesivos de replicación del ADN nuclear y del kinetoplasto resultando en células con un gran núcleo y múltiples kinetoplastos. En procíclicos, sin embargo, la citoquinesis tiene lugar a pesar de la inhibición de la mitosis resultando en una célula con un núcleo con doble contenido de ADN y 2 kinetoplastos (1N*2K) que se dividirá pudiendo dar lugar a una célula con un núcleo tetraploide y un kinetoplasto (1N*1K) y otra célula, denominada zoide, con un solo kinetoplasto (0N1K) (Hammarton 2007).

El genoma nuclear de *T. brucei* comprende 11 megacromosomas, algunos cromosomas intermedios y unos 100 minicromosomas. Los minicromosomas se segregan siguiendo una cinética diferente con respecto a los megacromosomas. Se ha sugerido que los minicromosomas se segregan lateralmente a lo largo de los microtúbulos, de polo a polo, antes de que los megacromosomas sean segregados mediante un mecanismo dependiente del kinetocoro (Hammarton 2007).

Fase S del kinetoplasto. El genoma mitocondrial consta de varios miles de minicírculos y una docena de maxicírculos. La fase S del kinetoplasto empieza justo antes que la del núcleo. El complejo proceso de replicación de los minicírculos ha sido estudiado en detalle de manera que son separados del resto de la red y replicados por la

acción de una topoisomerasa II, para ser posteriormente transportados a los polos del kinetoplasto (sitios antipodales). Sin embargo, el mecanismo de replicación de los maxicírculos y los eventos de señalización que regulan el inicio de la fase S del kinetoplasto aún no han sido estudiados en profundidad (Hammarton 2007, Wheeler, Gull et al. 2019).

División del kinetoplasto. La división del kinetoplasto y la segregación del genoma mitocondrial requieren de la participación del TAC que conecta el cuerpo basal con el ADN del kinetoplasto a través de la doble membrana mitocondrial. Esto conduce a la división del kinetoplasto a medida que el cuerpo basal se separa. Los maxicírculos permanecen en el centro del kinetoplasto en división. El TAC es necesario para un correcto posicionamiento del kinetoplasto y parece estar implicado en la segregación del mismo de forma análoga al kinetocoro durante la mitosis (Wheeler, Gull et al. 2019).

Cuerpo basal y estructuras asociadas. La duplicación del cuerpo basal y el crecimiento del nuevo flagelo son los primeros eventos citológicos detectables durante el ciclo de *Trypanosoma* spp. De forma sincronizada con el inicio de la fase S, se produce la maduración de un nuevo cuerpo basal a partir del que se generará el nuevo flagelo que invade el bolsillo flagelar para que finalmente, a través de una serie de cambios morfológicos en el citoesqueleto y la membrana se generen 2 bolsillos flagelares independientes asociados cada uno a un flagelo (Hammarton 2007, Wheeler, Gull et al. 2019).

El aparato de Golgi se localiza entre el sitio de exporte del retículo endoplásmico y el bolsillo flagelar de manera que el nuevo Golgi se desarrolla junto al preexistente. Otros orgánulos tales como los glicosomas, acidocalcisomas o gotas lipídicas están presentes en multicopia de modo que la segregación entre las células hijas es probablemente aleatoria (Wheeler, Gull et al. 2019).

Citoquinesis. La citoquinesis en tripanosomátidos es muy diferente de lo que ocurre en células de mamífero y hongos. Tiene lugar desde la parte anterior hacia la posterior de la célula mediante el ingreso del surco de escisión desde el extremo del nuevo FAZ. El posicionamiento relativo de este surco de escisión garantiza la correcta herencia de los cuerpos basales, kinetoplastos y bolsillos flagelares, pero los núcleos deben estar correctamente posicionados (en este sentido podría ser relevante la longitud del huso mitótico). Finalmente, el surco progresa hasta quedar únicamente un punto de

unión entre la parte posterior de una célula y el lateral de la otra célula hija. La escisión definitiva ocurre sin aparente participación de un anillo contráctil de actino-miosina (Hammarton 2007, Li 2012, Wheeler, Gull et al. 2019).

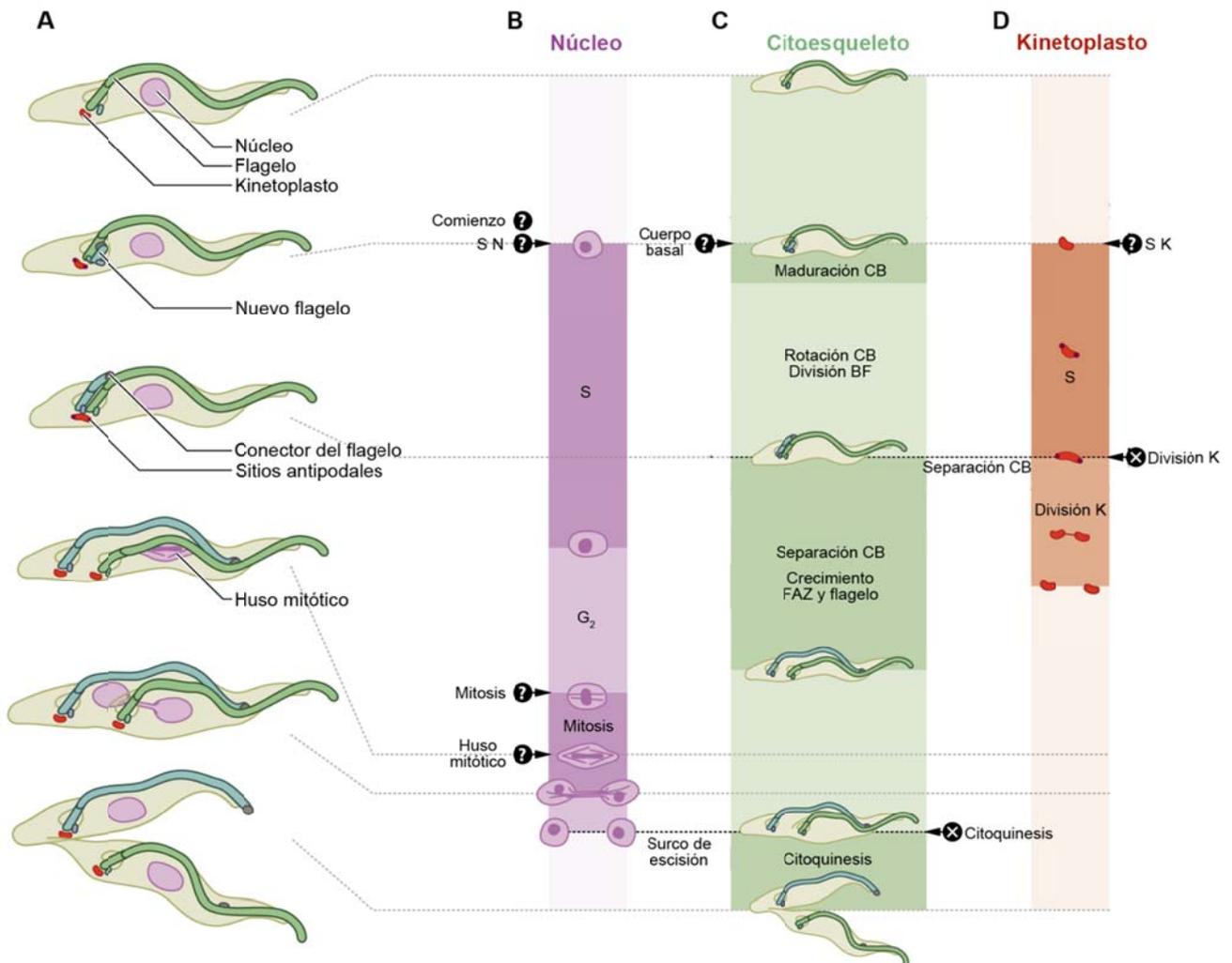


Figura A5. Ciclo celular en *T. brucei* (adaptado de Wheeler, Gull et al. 2019). Desarrollo de las distintas etapas del ciclo celular en la forma procíclica de *T. brucei* y su distribución a lo largo del tiempo. (A) Morfología de la célula en diferentes estadios del ciclo desde G1 hasta el crecimiento del nuevo flagelo desde el bolsillo flagelar (BF), anafase, mitosis y citoquinesis. (B-D) Desarrollo en el tiempo de los distintos eventos que tienen lugar en el (B) núcleo, (C) citoesqueleto y (D) kinetoplasto y su sincronización aproximada. Los puntos de control que probablemente tienen lugar a lo largo del ciclo están marcados con una interrogación mientras que para aquellos marcados con una “x” existe evidencia suficiente que demuestra su ausencia. Abreviaturas: N, núcleo; S, síntesis; CB, cuerpo basal; BF, bolsillo flagelar; FAZ, zona de anclaje del flagelo o *flagellum attachment zone*; K, kinetoplasto.

A.3. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS EN *T. brucei*

Los niveles de desoxirribonucleótidos trifosfato están sometidos a un estricto control en todos los organismos puesto que juegan un papel central en los procesos de replicación y reparación del ADN. De hecho, alteraciones de dichos niveles afectan a la integridad de la célula desencadenando procesos tales como mutagénesis, genotoxicidad o el desarrollo de tumores (Kohnken, Kodigepalli et al. 2015).

En la mayoría de organismos, incluyendo las células humanas, los nucleótidos de purina y pirimidina se pueden obtener por dos vías: la síntesis *de novo* o la ruta de salvamento. Sin embargo los protozoos parásitos, incluyendo *T. brucei*, por lo general carecen de la capacidad para sintetizar purinas *de novo*. Por el contrario, estos organismos son protótrofos para pirimidinas y poseen enzimas implicadas tanto en la síntesis *de novo* como en el salvamento algunas de las cuales se han postulado como interesantes dianas para el diseño de fármacos antiparasitarios.

A.3.1. Transportadores de nucleótidos, nucleósidos y nucleobases

En eucariotas, el transporte de nucleósidos y nucleobases tiene lugar a través de los transportadores CNT (*concentrative nucleoside transporter*) o a través de los transportadores ENT (*equilibrative nucleoside transporter*). Hasta la fecha, todos los transportadores de nucleósidos y nucleobases identificados en protozoos parásitos pertenecen a la familia ENT (Sanchez, Drutman et al. 2004, Berg, Van der Veken et al. 2010, Campagnaro, Alzahrani et al. 2018).

Mientras que la mayoría de células de mamífero pueden sintetizar sus propias purinas y pirimidinas, algunos protozoos parásitos como los tripanosomátidos o los apicomplexa, pueden sintetizar pirimidinas *de novo* pero son auxótrofos para purinas y dependen del salvamento de las mismas procedentes del hospedador. Por este motivo, expresan una amplia variedad de transportadores de bases y nucleósidos de purina

altamente eficientes (de Koning, Watson et al. 2000, Natto, Wallace et al. 2005, Campagnaro, Alzahrani et al. 2018).

A lo largo de su ciclo de vida, *T. brucei* expresa diferentes transportadores para la captación de nucleósidos y bases de purina. Los transportadores tipo P1 (NT2, NT3, NT4, NT5, NT6 y NT7) se expresan tanto en formas procíclicas como sanguíneas y todos ellos presentan afinidad por inosina (Ino), adenosina (Ado), guanosina (Guo) y en algunos casos por hipoxantina (Hyp) (NT5, NT6 y NT7) (Sanchez, Drutman et al. 2004). Dos transportadores adicionales, TbNT9 y TbNT10, son también transportadores de nucleósidos de purina con actividad P1 que se expresan específicamente en la forma procíclica y en la forma sanguínea *stumpy*, respectivamente. TbNT10 es un transportador de elevada afinidad por Ado, Guo e Ino (no presenta afinidad por ninguna de las bases de purina). (Sanchez, Drutman et al. 2004, Berg, Van der Veken et al. 2010, Campagnaro, Alzahrani et al. 2018). Finalmente, TbNT8.1, TbNT11 y probablemente TbNT12, se comportan como transportadores de alta afinidad para las bases de purina (Sanchez, Drutman et al. 2004).

TbAT1, el primer transportador ENT que se identificó, es el llamado transportador P2 y es responsable del transporte de Ado y adenina (Ade). Se expresa únicamente en las formas sanguíneas del parásito (Sanchez, Drutman et al. 2004, Bellofatto 2007). Además de los transportadores de nucleósidos, se han identificado 4 transportadores especializados de nucleobases con especial afinidad por la Hyp (Berg, Van der Veken et al. 2010, Campagnaro, Alzahrani et al. 2018): H1 y H4 en procíclicos y H2 y H3 que se expresan en las formas sanguíneas.

Recientemente se ha revelado (Campagnaro, Alzahrani et al. 2018) la presencia de mecanismos de transporte de purinas que no habían sido caracterizados en *T. brucei*. De hecho, las primeras evidencias parecen indicar que podrían tratarse de los primeros transportadores de purinas en protozoos que no pertenecen a la familia ENT. Se trata de 2 nuevos transportadores expresados en la forma sanguínea del parásito: un transportador específico de Hyp, el HXT1 y otro de muy alta afinidad por la Ade, el ADET1.

Al contrario de lo que ocurre con las purinas, la mayoría de los protozoos parásitos son capaces de sintetizar pirimidinas *de novo* y, por consiguiente, el transporte

de pirimidinas además de no ser esencial en *T. brucei* es mucho menos eficiente que el de purinas.

En 1998 se caracterizó el primer transportador de pirimidinas en kinetoplastos, el TbU1, que presenta una alta selectividad por el uracilo (Ura) con una afinidad del orden submicromolar y es el principal transportador responsable del salvamento de pirimidinas en las formas procíclicas de *T. brucei* (Gudin, Quashie et al. 2006, Ali, Creek et al. 2013).

La uridina (Urd) es transportada por al menos 2 transportadores en procíclicos, TbU1 y TbU2, que presentan una afinidad moderadamente elevada por dicho nucleósido. Pese a que TbU2 presenta elevada afinidad por la Urd, la eficiencia de transporte no parece muy alta (Gudin, Quashie et al. 2006, Tiwari y Dubey 2018). El transporte de Urd y Ura constituye la principal diferencia entre la capacidad de salvamento de las formas procíclicas y las sanguíneas, debido a la expresión diferencial de los transportadores encargados de dicha función. Mientras que en procíclicos TbU1 es el responsable del salvamento de Ura, en sanguíneos es TbU3, un transportador de alta afinidad por el Ura pero muy baja afinidad para la Urd y 2'-desoxiuridina (dUrd) (Ali, Tagoe et al. 2013, Tiwari y Dubey 2018). De hecho, sólo es posible detectar el transporte de dichos nucleósidos cuando la concentración en el medio es elevada, confirmándose que TbU3 es un transportador de Ura. Así mismo la presencia de elevadas concentraciones de Urd inhibe el transporte de Ura a través de TbU1 pero por el contrario, la presencia de Urd no afecta al transporte de Ura en sanguíneos a través de TbU3 (Gudin, Quashie et al. 2006, Ali, Creek et al. 2013).

Las formas sanguíneas son ineficientes en la captación de citidina (Ctd) puesto que carecen de sistemas para el transporte de la misma. Algo similar ocurre en procíclicos, en los que tampoco se detecta transporte de Ctd, aunque en este caso sí se da el salvamento de citosina (Cyt) a través de un transportador denominado TbC1. Se trata de un transportador de muy alta afinidad por la Cyt, pero cuyos reducidos niveles de expresión hacen que la capacidad de salvamento de dicha base sea muy reducida (Gudin, Quashie et al. 2006, Bellofatto 2007). Todos estos datos en su conjunto apuntan al hecho de que el salvamento de pirimidinas en *T. brucei* depende principalmente del transporte de Ura.

No se observa un transporte significativo de timidina (dThd) por parte de *T. brucei* en el rango de concentraciones micromolares o submicromolares. El transporte de dThd está mediado por un transportador denominado TbT1. La extremadamente baja afinidad por la dThd, así como la eficiencia de traslocación conduce a pensar que no contribuye de manera sustancial al salvamento de pirimidinas *in vivo*, por lo que podemos concluir que la función principal de este transportador no es el salvamento de dThd (Ali, Creek et al. 2013). De hecho, se trata de un transportador de nucleósidos de purinas de tipo P1 expresado por las formas sanguíneas de *T. brucei* (Ali, Creek et al. 2013). No se ha detectado actividad específica de transporte para Ctd, 2-desoxicitidina (dCtd), Cyt, orotato o timina por lo que no parece que exista un salvamento significativo de estas pirimidinas en condiciones fisiológicas.

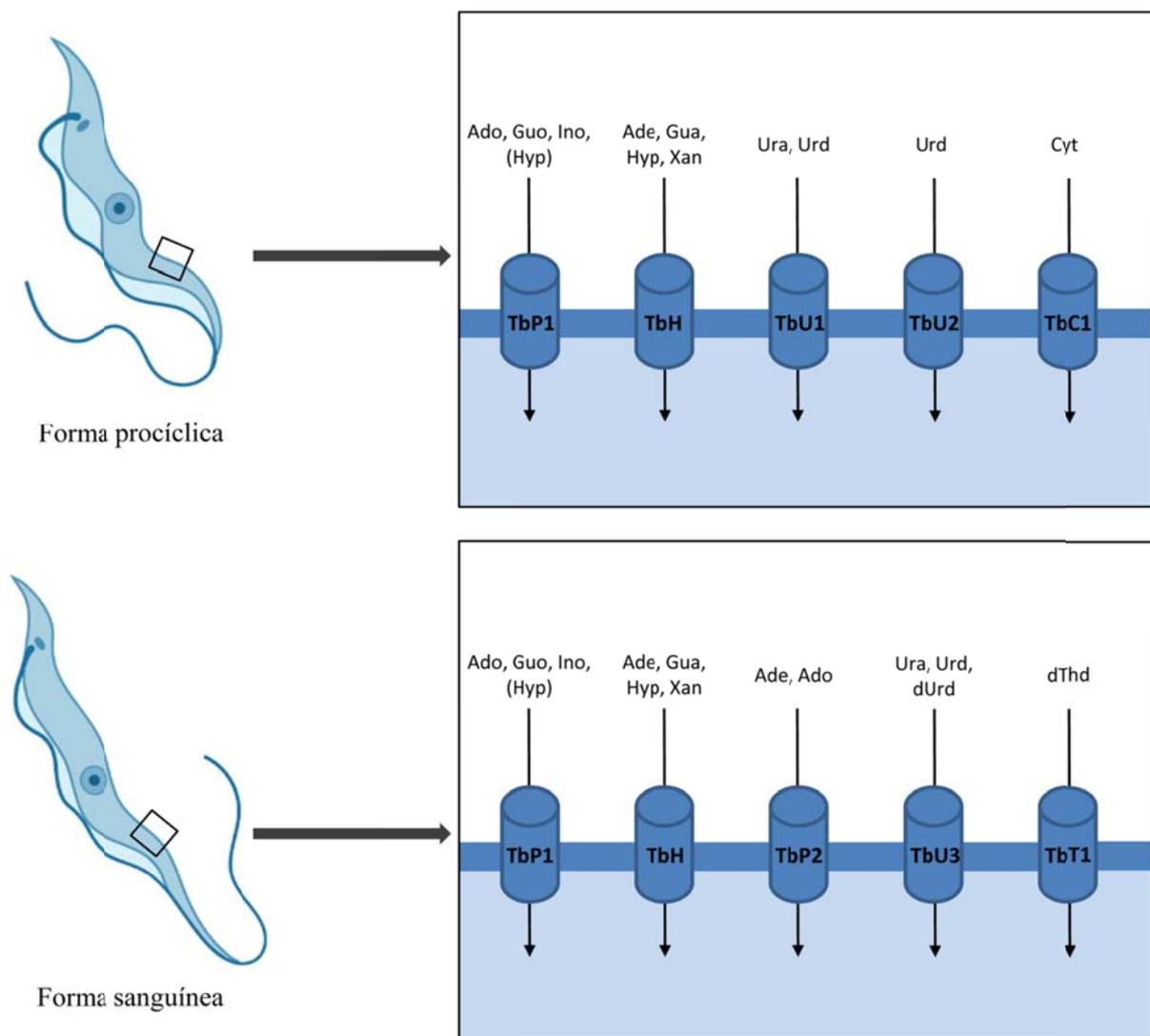


Figura A6. Representación esquemática de los transportadores de nucleósidos en las formas procíclica y sanguínea de *T. brucei*. La expresión de los transportadores de

nucleósidos cambia a lo largo del ciclo de vida de *T. brucei*, de manera que el transporte de purinas está mediado fundamentalmente por los transportadores TbH de nucleobases, los TbP1 de amplia especificidad de sustrato y el TbP2 específico para adenina y adenosina que se expresa únicamente en las formas sanguíneas, mientras que el transporte de pirimidinas está mediado por TbU1, TbU2 y TbC1 en procíclicos y TbU3 y TbT1 en sanguíneos. Abreviaturas: Ado (adenosina), Guo (guanosina), Ino (inosina), Hyp (hipoxantina), Ade (adenina), Gua (guanina), Xan (xantina), Ura (uracilo), Urd (uridina), Cyt (citosina), dUrd (2'-desoxiuridina) y dThd (timidina).

A.3.2. Metabolismo de purinas

En general las células de mamífero poseen dos rutas para la síntesis de nucleótidos de purinas. La síntesis *de novo*, que produce inosina-5'-monofosfato (IMP) partiendo de precursores simples como la glicina y la ruta de salvamento consiste en la reutilización de bases y nucleósidos preformados que la célula toma de fuentes endógenas y/o exógenas para satisfacer sus requerimientos de purinas. Sin embargo, algunos organismos como los protozoos parásitos son auxótrofos para purinas y, por tanto, incapaces de llevar a cabo la síntesis *de novo* de manera que dependen única y exclusivamente de las bases y nucleósidos preformados que obtienen del hospedador (Ogbunude y Ikediobi 1983, Hammond y Gutteridge 1984, Berg, Van der Veken et al. 2010).

En consecuencia, los parásitos han desarrollado sistemas para transportar, internalizar y metabolizar las bases y nucleósidos requeridos. Se ha observado que cualquiera de las bases o nucleósidos de purina naturales son suficientes para mantener el crecimiento de los parásitos *in vitro* poniendo de manifiesto que las rutas de salvamento son interconvertibles (Hammond y Gutteridge 1984, Li, Leija et al. 2015).

Al contrario de lo que ocurre con otros kinetoplastidos como *Leishmania* spp, *T. brucei* es un parásito extracelular y por tanto no tiene acceso a las purinas que se encuentran en el interior de la célula. Las principales bases y nucleósidos que se encuentran en el suero humano y el líquido cerebroespinal son Hyp, Xan e Ino, mientras que otras bases y nucleósidos de purina como la Ade o la Ado están presentes en concentraciones despreciables. Esto sugiere que el salvamento de purinas en *T. brucei*

ocurre a través de la xantosina-5'-monofosfato (XMP) y el IMP y que algunas de las enzimas de interconversión requeridas para la síntesis de guanosina-5'-monofosfato (GMP) y adenosina-5'-monofosfato (AMP) podrían ser esenciales *in vivo* (Li, Leija et al. 2015, Dolezelova, Teran et al. 2018).

La ruta de salvamento de purinas en *T. brucei* está constituida por enzimas como las nucleósido hidrolasas, la 6-oxopurina fosforribosiltransferasas, la adenina fosforribosiltransferasa (APRT, EC 2.4.2.7) y la adenosina kinasa (AK, EC 2.7.1.20). Participan también enzimas de interconversión como son la AMP desaminasa (AMPD, EC 3.5.4.6), adenilosuccinato liasa (ADSL, EC 4.3.2.2), adenilosuccinato sintetasa (ADSS, EC 6.3.4.4), guanina desaminasa (GDA, EC 3.5.4.3), GMP sintasa (GMPS, EC 6.3.5.2), GMP reductasa (GMPR, EC 1.7.1.7) y la IMP deshidrogenasa (IMPDH, EC 1.1.1.205) (Dolezelova, Teran et al. 2018).

Las nucleósido hidrolasas (NHs) hidrolizan el enlace N-glucosídico de β -ribonucleósidos con la participación en el proceso catalítico de una molécula de agua. Su papel metabólico está muy bien establecido en protozoos parásitos, donde juegan un importante papel dentro del salvamento de purinas. Por el contrario, en mamíferos, no se ha detectado actividad NH. En *T. brucei* encontramos una inosina-adenosina-guanosina hidrolasa (IAG-NH, EC 3.2.2.1) y una inosina-guanosina hidrolasa (IG-NH) (Hammond y Gutteridge 1984, Berg, Van der Veken et al. 2010).

Las purina fosforribosiltransferasas catalizan la transferencia de la ribosa-5'-fosfato desde el 5-fosfo- α -D-ribosil-1-pirofosfato hasta la respectiva base de purina (Ade, Gua, Hyp o Xan) dando lugar a los correspondientes 5'-monofosfatos (Berg, Van der Veken et al. 2010). *T. brucei* expresa una APRT y 3 isoformas de 6-oxopurina fosforribosiltransferasas mientras que en humanos solo hay una. Dos de las tres isoformas en *T. brucei* son hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasas (HGPRTs, EC 2.4.2.8) puesto que los sustratos preferentes son la Hyp y la Gua mientras que la tercera se identifica como una hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa (HGXPRT) (Hammond y Gutteridge 1984, Berg, Van der Veken et al. 2010, Dolezelova, Teran et al. 2018).

La adenosina kinasa (AK) fosforila Ado para obtener el correspondiente 5'-monofosfato AMP en presencia de adenosina-5'-trifosfato (ATP). La presencia de AK en *T. brucei* es controvertida puesto que la observación de actividad AK parece

dependen del método de extracción empleado (Vodnala, Fijolek et al. 2008, Berg, Van der Veken et al. 2010).

La Ado es la purina más eficientemente salvada por parte de *T. brucei* y se transforma mediante dos reacciones secuenciales que implican la liberación de la base de Ade por parte de la IAG-NH para a continuación llevar a cabo la síntesis de AMP en una reacción catalizada por la APRT (Berg, Van der Veken et al. 2010). A día de hoy sigue existiendo controversia respecto a si la síntesis de AMP ocurre mayoritariamente como acabamos de describir o si realmente existe una AK en *T. brucei*.

Recientemente se ha reportado el carácter esencial de la GMPS, una aminotransferasa que cataliza la síntesis de GMP a partir de XMP. La GMPS es el punto donde convergen la Xan, Hyp, Ade y Ado rescatadas mediante la formación de XMP o IMP para la síntesis de GMP, que tendrá lugar en dos pasos a partir del IMP catalizados por la IMPDH y la GMPS. Por el contrario, la GMPR cataliza la conversión del GMP en IMP, lo que permite la interconversión de los nucleótidos de guanina y adenina. *T. brucei* expresa una GDA que genera Xan a partir de Gua (Hammond y Gutteridge 1984, Li, Leija et al. 2015). Otras enzimas implicadas en la interconversión de purinas son las aminohidrolasas responsables de la conversión de Ade en Hyp. *T. brucei* carece de adenina desaminasa y pese a que los parásitos poseen el gen que codifica para una adenosina desaminasa (ADA, EC 3.5.4.4), aún no está claro si las formas sanguíneas de *T. brucei* expresan dicha enzima. En algunos tripanosomátidos también parece tener lugar la desaminación del AMP (Hammond y Gutteridge 1984, Vodnala, Fijolek et al. 2008).

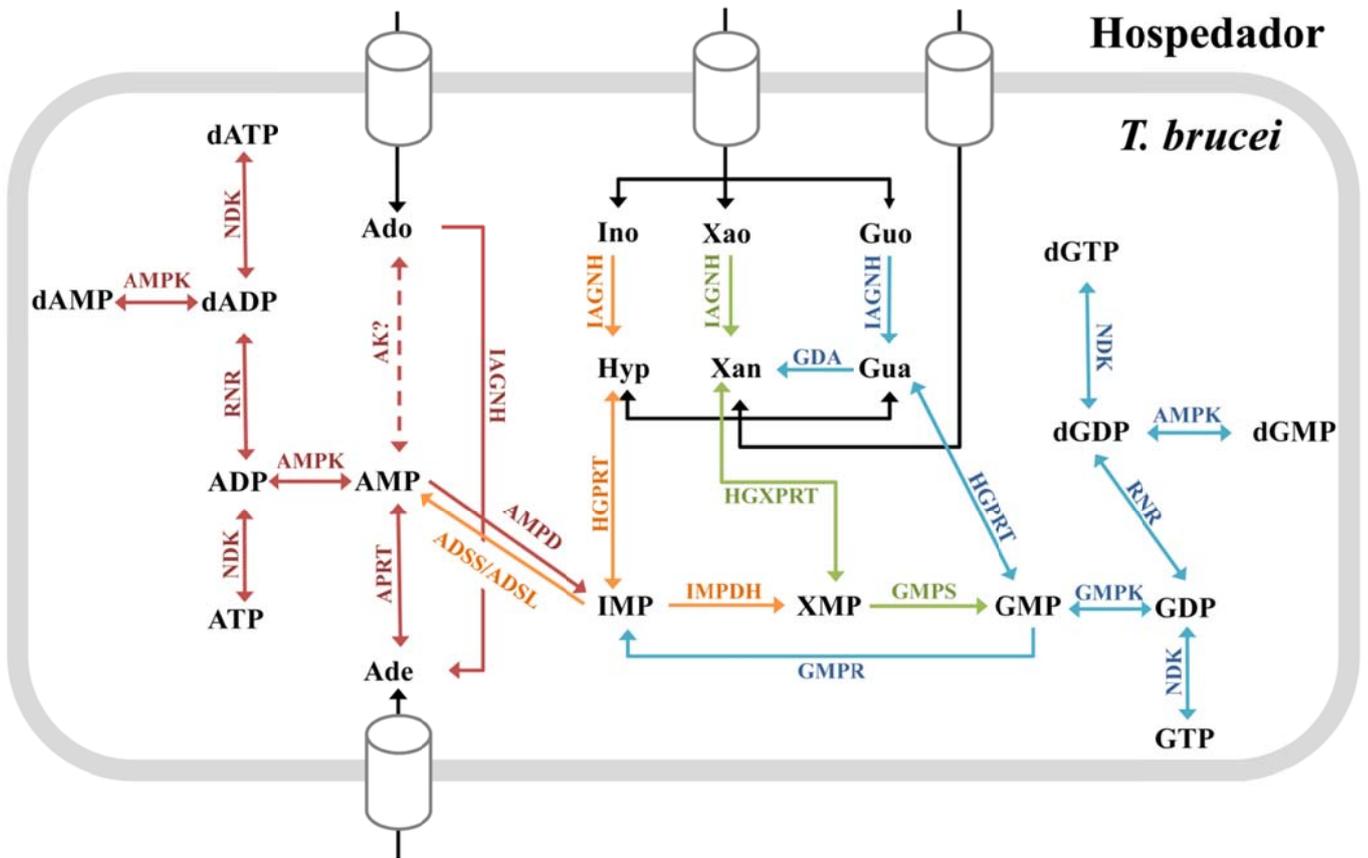


Figura A7. Metabolismo de purinas en *T. brucei* (adaptado de Dolezelova, Teran et al. 2018). *T. brucei* es incapaz de llevar a cabo la síntesis *de novo* de IMP de manera que depende únicamente del salvamento de bases y nucleósidos de purina procedentes del medio. En primer lugar, la actividad nucleósido hidrolasa libera la base procedente del nucleósido para que posteriormente tenga lugar la síntesis del correspondiente nucleótido monofosfato vía actividad fosforribosiltransferasa. Los nucleótidos difosfato son producto de la reacción catalizada por kinasas específicas como la AK o la GMPK para finalmente, y mediante la actividad RNR y NDK, obtener los diferentes nucleótidos trifosfato. AMPK (proteína kinasa activada por AMP), AK (adenosina kinasa), APRT (adenina fosforribosiltransferasa), AMPD (AMP desaminasa), ADSS (adenilosuccinato sintetasa), ADSL (adenilosuccinato liasa), IAGNH (inosina-adenosina-guanosina hidrolasa), HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa), GDA (guanina desaminasa), HGXPRT (hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa), IMPDH (IMP deshidrogenasa), GMPS (GMP sintasa), GMPK (GMP kinasa), GMPR (GMP reductasa), NDK (nucleósido difosfato kinasa) y RNR (ribonucleótido reductasa). En rojo se indican las reacciones que implican derivados de adenina, en naranja las que implican derivados de hipoxantina, en verde las de los derivados de xantina y en azul las de los derivados de guanina.

A.3.3. Metabolismo de pirimidinas

La mayoría de células, incluyendo los tripanosomátidos, son capaces de sintetizar el anillo de pirimidina *de novo*, a partir de precursores simples como la L-glutamina, el bicarbonato o el L-aspartato y además son capaces de llevar a cabo el salvamento de nucleósidos y/o nucleobases de pirimidina. En la síntesis *de novo*, el bicarbonato es convertido en carbamil fosfato vía la carbamoil fosfato sintetasa (CPSII, EC 6.3.5.5.) y posteriormente en carbamoil aspartato mediante una aspartato transcarbamilasa (ATCasa, EC 2.1.3.2.), para finalmente ser convertido en el primer derivado cíclico de la ruta, el dihidroorotato, mediante la acción de la dihidroorotasa (DHO, EC 3.5.2.3.). La DHO es capaz de catalizar la reacción en ambos sentidos aunque estudios realizados en *L. donovani* y *C. fasciculata* demuestran que está favorecida la síntesis de dihidroorotato sobre la ruta degradativa (Tiwari y Dubey 2018). Esto es diferente de lo que ocurre en células de mamífero, que expresan una enzima multifuncional (CAD) que cataliza los 3 primeros pasos de la síntesis *de novo*. En cualquier caso, estudios de co-inmunoprecipitación y LC-masas parecen confirmar que estas tres enzimas presentan una interacción no covalente en tripanosomátidos (Ong, Sienkiewicz et al. 2013, Tiwari y Dubey 2018).

La cuarta enzima de la ruta es la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH, EC 1.3.98.1.), que oxida el dihidroorotato hasta orotato. Mientras que la DHODH humana (EC 1.3.5.2.), se localiza en la membrana mitocondrial y transfiere electrones a la ubiquinona, la enzima de *T. brucei* es citosólica y emplea fumarato como aceptor de electrones (Ali, Creek et al. 2013, Ong, Sienkiewicz et al. 2013). Estudios funcionales empleando ARN de interferencia para inhibir la enzima de *T. brucei*, revelaron que las formas sanguíneas del parásito presentan afectación del crecimiento *in vitro* que puede ser revertida si existen pirimidinas disponibles en el medio (Arakaki, Buckner et al. 2008, Ali, Creek et al. 2013, Tiwari y Dubey 2018). De hecho, los parásitos crecen con normalidad en medio con suero no dializado demostrando que la concentración de Ura presente en el mismo ($0,17 \pm 0,05 \mu\text{M}$), similar a la del plasma humano, es suficiente para mantener el crecimiento de *T. brucei* de manera que podemos concluir que la síntesis *de novo* no es esencial *in vitro*. Así mismo todo parece indicar que tampoco debería serlo *in vivo* (Arakaki, Buckner et al. 2008, Ali, Tagoe et al. 2013).

En los pasos finales de la síntesis *de novo*, el orotato se convierte en orotidina-5'-monofosfato (OMP) y a continuación en UMP por la acción de las enzimas orotato fosforribosiltransferasa (OPRT, EC 2.4.2.10.) y orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa (OMPDC, EC 4.1.1.23.). En bacterias y algunos parásitos dichas enzimas se encuentran separadas, pero tanto en humanos como en *T. brucei* se encuentran formando parte de una única proteína de fusión, anotada como uridina monofosfato sintasa (UMPS). En el caso de *T. brucei* el orden de la fusión está invertido (OMPDC-OPRT) y está localizada en los glicosomas (Ong, Sienkiewicz et al. 2013). La inhibición del último paso de la síntesis *de novo* mediante la generación de líneas *knock out* (KO) para la UMPS condujo a la obtención de parásitos auxótrofos para pirimidinas que pueden proliferar *in vitro* en presencia de Ura o Urd. En condiciones *in vivo*, sin embargo, los parásitos fueron capaces de establecer infección en ratones compensando la deficiencia de la UMPS mediante la sobreexpresión de la uridina fosforilasa (UPasa, EC 2.4.2.3.) y el incremento de la actividad del transportador TbU3 poniendo de manifiesto por tanto que la biosíntesis de pirimidinas no es esencial *in vivo* (Ali, Tagoe et al. 2013, Ong, Sienkiewicz et al. 2013). En cambio, sí se produjo una reducción de la virulencia de esta cepa KO para la UMPS, lo que hace pensar que la ruta de salvamento no es suficiente para compensar por completo la ausencia de la síntesis *de novo* (Ong, Sienkiewicz et al. 2013, Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016).

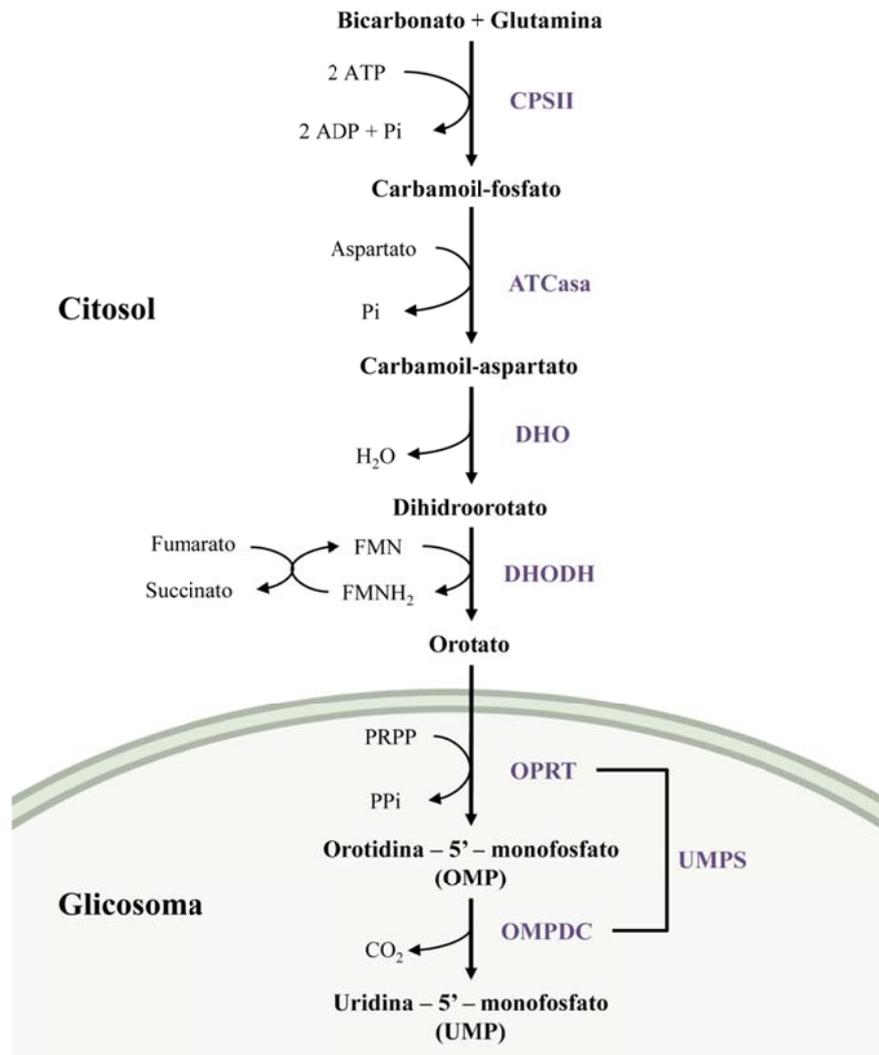


Figura A8. Síntesis *de novo* de UMP en *T. brucei*. Las 4 primeras reacciones de la ruta hasta la síntesis de orotato tienen lugar en el citosol y están catalizadas por enzimas independientes. Las 2 últimas reacciones que conducen a la obtención de UMP tienen lugar en el glicosoma y están catalizadas por una UMPS cuyo extremo N-terminal posee un dominio OMPDC mientras que en el extremo C-terminal se localiza el dominio OPRT. CPSII (carbamoil fosfato sintetasa), ATCasa (aspartato transcarbamilasa), DHO (dihidroorotasa), DHODH (dihidroorotato deshidrogenasa), UMPS (UMP sintasa), OPRT (orotato fosforribosiltransferasa), OMPDC (orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa).

Aunque la síntesis de pirimidinas en tripanosomátidos depende en buena medida de la síntesis *de novo* de UMP, *T. brucei* puede captar Ura del medio eficientemente y convertirlo en UMP mediante la uracilo fosforribosiltransferasa (UPRT, EC 2.4.2.9.). La Urd también puede ser rescatada del medio, pero dado que los kinetoplastos

carecen de actividad uridina kinasa (Tiwari y Dubey 2018), se requiere la intervención de la UPasa para obtener Ura. De hecho, estudios con nucleósidos fluorados demostraron que el sustrato preferente de la UPasa es la Urd respecto a la dUrd (Ali, Creek et al. 2013). Así pues, tanto la síntesis *de novo* como la ruta de salvamento convergen en el UMP, un metabolito central en el metabolismo de pirimidinas de *T. brucei* a partir del cual la célula puede sintetizar todos los ribonucleótidos y 2'-desoxirribonucleótidos de pirimidina. La fosforilación del UMP a uridina-5'-difosfato (UDP) tiene lugar mediante una UMP-CMP kinasa (EC 2.7.4.14.) y posteriormente es fosforilado a uridina-5'-trifosfato (UTP) vía nucleósido difosfato kinasa (NDK, EC 2.7.4.6.). A continuación tiene lugar la síntesis *de novo* de citidina-5'-trifosfato (CTP) a partir de UTP mediante una CTP sintetasa (CTPS, EC 6.3.4.2.). La reacción catalizada por la CTPS se ha postulado como un punto vulnerable dentro de la ruta puesto que *T. brucei* posee niveles bajos de CTP como consecuencia de que la reacción transcurre lentamente y de que el salvamento de Cyt o Ctd es prácticamente inexistente en las formas sanguíneas del parásito, de modo que al contrario de lo que ocurre en mamíferos, *T. brucei* no puede compensar la inhibición de la CTPS mediante el salvamento de Ctd (Hofer, Steverding et al. 2001, Tiwari y Dubey 2018). La síntesis de 2'-desoxiuridina-5'-difosfato (dUDP) está catalizada por la ribonucleótido reductasa (RNR, EC 1.17.4.1.) a partir de UDP.

Un paso clave en la síntesis de ADN es la formación de timidilato (dTMP) catalizado por la timidilato sintasa (TS, EC 2.1.1.45.), lo que implica la metilación reductiva de la 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) por el 5,10-metilentetrahidrofolato. El otro producto de la reacción es el dihidrofolato, que se convierte en tetrahidrofolato por acción de la dihidrofolato reductasa (DHFR, EC 1.5.1.3.). Finalmente, el metilentetrahidrofolato se regenera a partir del tetrahidrofolato por acción de una serina hidroximetiltransferasa (SHMT, EC 2.1.2.1.), ausente en *T. brucei*, o mediante el sistema de degradación de la glicina. En tripanosomátidos y otros protozoos parásitos como *Plasmodium* spp., la TS y la DHFR están fusionadas formando una proteína bifuncional, al contrario de lo que ocurre en células de mamífero. La DHFR-TS es una enzima esencial para la supervivencia de *T. brucei* tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo la dThd en concentraciones elevadas y no fisiológicas, la única pirimidina capaz de rescatar el fenotipo de las formas KO (Sienkiewicz, Jaroslowski et al. 2008). La inhibición selectiva de la TS o la DHFR en células

procariotas o eucariotas conduce a la llamada *thymineless death* o muerte por falta de timina que se caracteriza por la intensa reducción de los niveles de timidina-5'-trifosfato (dTTP) y el concomitante incremento del dUMP que será fosforilado para generar 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), que debe ser retirado por acción de la desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa (dUTPasa, EC 3.6.1.23.) liberándose dUMP.

La hidrólisis del dUTP catalizada por la dUTPasa contribuye a mantener bajo el ratio dUTP/dTTP evitando así la incorporación del dUTP al ADN durante la replicación. La presencia de Ura en ADN es reparada por la ruta de escisión de bases mediada por la uracil ADN glicosilasa (UNG, EC 3.2.2.27.) que reconoce y escinde el residuo de Ura dejando un sitio abásico. Sin embargo, si la capacidad de la dUTPasa se ve superada por un exceso de dUTP, se producirá una incorporación masiva de dUTP en el ADN que conducirá a la generación de múltiples sitios abásicos mutagénicos y el colapso de la horquilla de replicación en las regiones que están siendo reparadas que originará un daño irreparable en los cromosomas y conducirá a la muerte celular (Sienkiewicz, Jaroslowski et al. 2008, Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013). La dUTPasa es una enzima esencial en *T. brucei* y las formas KO pueden proliferar únicamente en presencia de concentraciones elevadas de dThd. Se ha postulado como una diana atractiva para el diseño de fármacos puesto que las dUTPasas presentes en kinetoplástidos poseen una estructura cuaternaria dimérica y son capaces de hidrolizar no sólo dUTP sino también dUDP, al contrario que las dUTPasas triméricas de mamíferos (Tiwari y Dubey 2018).

Los tripanosomátidos carecen de dCMP desaminasa (DCTD, EC 3.5.4.12.) que contribuye a la síntesis de dTTP mediante la producción de dUMP a partir de dCMP en células eucariotas. En su lugar, *Trypanosoma* spp. expresan una timidina kinasa (TK, EC 2.7.1.21.) y una citidina desaminasa (CDA, EC 3.5.4.5.) que podrían estar implicadas en la síntesis de dUMP.

Al contrario que las células de mamífero que expresan una TK1 citosólica y una TK2 mitocondrial, *T. brucei* expresa una única TK1 con estructura de pseudo-dímero que presenta 2 dominios homólogos de tipo TK1 (Valente, Timm et al. 2016). TK es una enzima esencial cuya inhibición provoca una importante reducción de los niveles de dTTP y el consiguiente daño en el ADN que ello origina. Teniendo en cuenta que los parásitos no son auxótrofos de pirimidinas y que carecen de actividad DCTD o dCTP

desaminasa (EC 3.5.4.13.), esta dependencia del dTTP de la actividad de TK parece indicar que el papel esencial de la enzima no reside en el salvamento de dThd, sino en la fosforilación de dUrd para la síntesis de dUMP, lo que se confirma por el hecho de que la deficiencia de TK puede ser compensada no solo por dThd en concentraciones elevadas (Valente, Timm et al. 2016), sino también mediante la expresión de la DCTD humana (Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016) que estaría proporcionando al parásito una ruta alternativa para la obtención de dUMP para la síntesis de dTMP.

En este contexto CDA jugaría un importante papel como fuente principal de dUrd procedente de la desaminación de la dCtd. De hecho, CDA es una enzima esencial *in vitro* y las formas KO son auxótrofas para dUrd o dThd demostrando su implicación esencial en la síntesis de dTMP (Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016).

Sin embargo, en *T. brucei* el dUMP podría proceder no sólo de la fosforilación de dUrd por TK sino también de la hidrólisis de dUTP o dUDP por acción de la dUTPasa, enzima para la que se ha propuesto un doble papel: mantener el correcto ratio dUTP/dTTP para controlar la incorporación excesiva de uracilo en ADN y producir dUMP para la síntesis de dTMP (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013). En definitiva, existen dudas acerca de cuál es la principal ruta de producción del dUMP, sustrato necesario para la síntesis de dTMP.

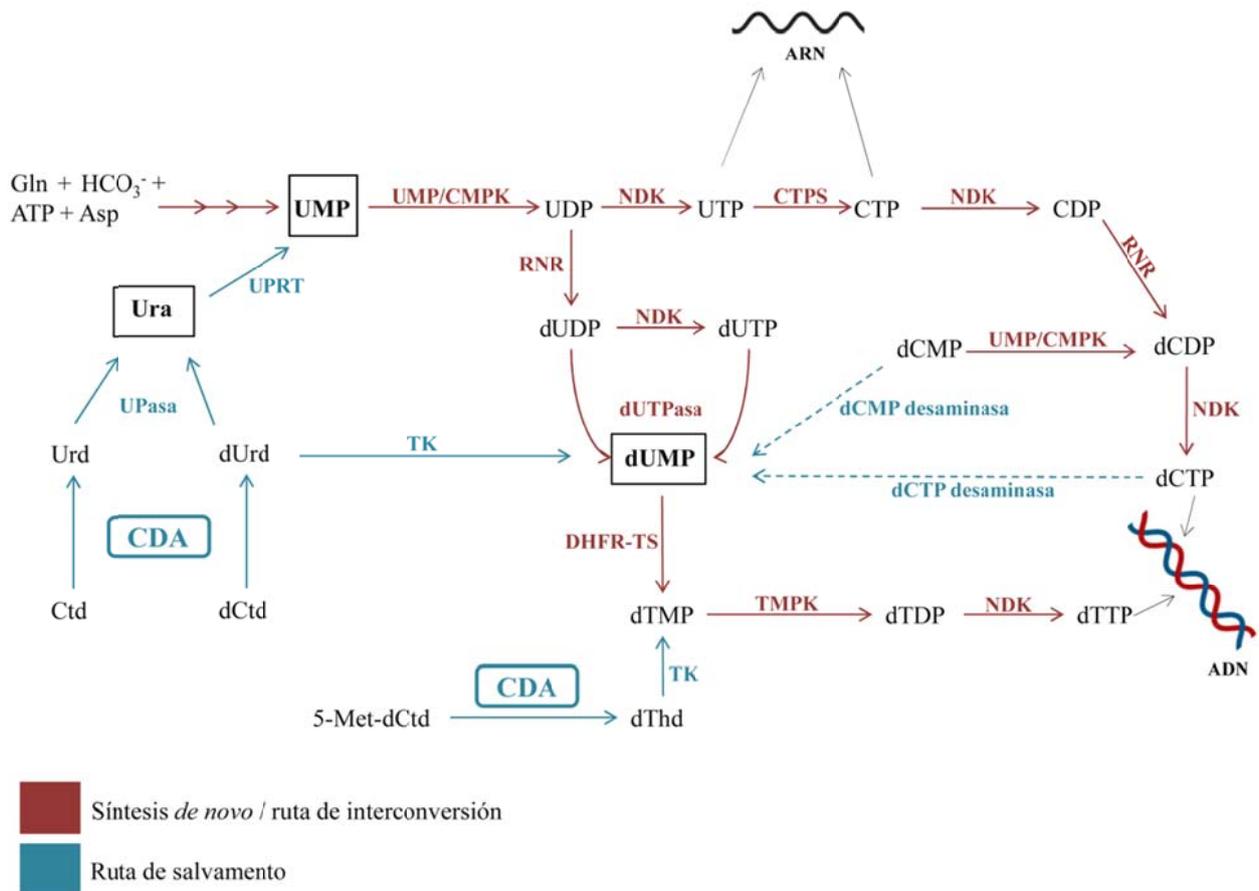


Figura A9. Metabolismo de pirimidinas en *T. brucei*. *T. brucei* es capaz de llevar a cabo tanto la síntesis *de novo* de UMP como el salvamento de pirimidinas, destacando el uracilo como la pirimidina más eficientemente salvada especialmente por parte de las formas sanguíneas del parásito. El uracilo se convierte en UMP vía UPRT confirmando el papel central de dicho nucleótido tanto en la síntesis *de novo* como en la ruta de salvamento de pirimidinas. El UMP es posteriormente fosforilado hasta UTP, sustrato de la CTPS en la síntesis de CTP que finalmente origina dCTP mediante la acción de las enzimas NDK y RNR. Por su parte, cabe destacar la función de la CDA en la síntesis de desoxiuridina (dUrd) que actúa como sustrato para TK en la síntesis del dUMP necesario para la obtención de dTMP vía DHFR-TS. Este dTMP será finalmente empleado en la síntesis de dTTP mediante la acción de la TMPK y la NDK. UMP/CMPK (UMP-CMP kinasa), NDK (nucleósido difosfato kinasa), CTPS (CTP sintetasa), RNR (ribonucleótido reductasa), CDA (citidina desaminasa), UPasa (uridina fosforilasa), UPRT (uracilo fosforribosiltransferasa), TK (timidina kinasa), dUTPasa (desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa), DHFR-TS (dihidrofolato reductasa – timidilato sintasa), TMPK (timidilato kinasa).

A.4. ENZIMAS CON ACTIVIDAD DESAMINASA

El zinc es el ion que participa con más frecuencia en las reacciones de hidrólisis o hidratación catalizadas por metaloenzimas (Johansson, Neuhard et al. 2004). La superfamilia de desaminasas dependientes de zinc se caracterizan por presentar un dominio desaminasa tipo His/Cys-Ala/Val-Glu-X₂₄₋₃₆-Pro-Cys-X-X-Cys (Conticello 2008) e incluye enzimas que catalizan la desaminación de bases, nucleótidos y ácidos nucleicos en diferentes contextos biológicos que van desde el salvamento de purinas y pirimidinas en bacterias, eucariotas y fagos, donde estarían implicadas CDAs, dCMP desaminasas, GDAs o AMPDs, hasta la desaminación *in situ* de bases que se encuentran formando parte de la cadena de ARN o ADN. Dichas desaminaciones juegan un papel central en el proceso de edición del ARN a la hora de generar secuencias apropiadas en el anticodón de los ARNt, modificar secuencias de micro ARNs o alterar el marco abierto de lectura de los ARNm. También se han relacionado las desaminaciones con procesos de defensa frente a virus o con la hipermutación somática asociada al cambio de clase de los anticuerpos (Iyer, Zhang et al. 2011).

Dentro de las desaminasas que actúan sobre ácidos nucleicos, las más ampliamente distribuidas en bacterias y eucariotas, son las adenosina desaminasas de ARNt (ADAT) que catalizan la desaminación de adenosina a inosina en la primera posición del anticodón, como por ejemplo la ADAT1 (EC 3.5.4.34) eucariota que desamina la posición 37 del ARNt de la alanina para estabilizar las interacciones codón-anticodón. En tripanosomátidos, se ha observado que ADAT2/3, además de ser responsable de la desaminación de la adenosina en posición 34 y la citosina (previa metilación por TRM140) en posición 32 del ARNt de la treonina (Fig. A10) (Rubio, Gaston et al. 2017), es capaz de llevar a cabo la desaminación de citosina a uracilo en ADN de cadena sencilla (Rubio, Pastar et al. 2007). Las adenosina desaminasas de ARNm (ADAR, EC 3.5.4.37) están implicadas en la inactivación de virus tipo ARN y en la edición de diversos ARNm y precursores de micro ARNs. En cuanto a desaminación de citidina en ácidos nucleicos, la AID (*activation-induced deaminase*) estaría implicada en la diversificación de los anticuerpos y las enzimas APOBEC (*Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like*) en la edición de diversos ARNm. Se ha caracterizado además una nueva CDA, denominada CDAT8 (EC 3.5.4.35), presente en arqueas como *Methanopyrus kandleri* (Randau, Stanley et al.

2009) que cataliza la desaminación de la citidina en posición 8 de ciertos ARNt como el del ácido aspártico o la histidina.

Las ADAR fueron identificadas por primera vez en *Xenopus laevis*, siendo la primera ADAR identificada en humanos ADAR1, la que condujo a la posterior identificación de ADAR2 y ADAR3, enzimas que están muy conservadas en vertebrados (Nishikura 2010). En mamíferos concretamente, ADAR1 presenta 2 isoformas o variantes de *splicing*, ADAR1p150 y ADAR1p110(Christofi y Zaravinos 2019). En *Drosophila melanogaster* hay un gen que codifica para una ADAR2-like mientras que en *Caenorhabditis elegans* hay 2 genes, *CeADR1* y *CeADR2* que codifican para proteínas con actividad ADAR (Tonkin, Saccomanno et al. 2002). Así mismo, se han identificado genes que codifican para ADAR1 y ADAR2 en erizos de mar y anémonas, indicando que éstos surgieron por duplicación génica en la evolución temprana de los metazoos, mientras que ADAR3 parece haber evolucionado a partir de la duplicación del gen *ADAR2* en vertebrados. Además, las ADAR están ausentes en protozoos, levaduras y plantas (Nishikura 2010, Jin, Zhang et al. 2009).

Se pensaba que las enzimas de la familia AID/APOBEC se expresaban únicamente en vertebrados. Sin embargo, se ha observado la presencia de proteínas APOBEC-like en diversos grupos de metazoos como los dictiostélidos y algunas algas. En humanos se expresan 11 proteínas de la familia AID/APOBEC: AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H y APOBEC4. Concretamente, AID y APOBEC2 surgieron en los peces sin mandíbula (agnatos), mientras que APOBEC1 surgió en pájaros y reptiles. Posteriormente, eventos de duplicación génica dieron lugar a la aparición de APOBEC3 en mamíferos, mientras que APOBEC4 es la de más reciente aparición (Christofi y Zaravinos 2019).

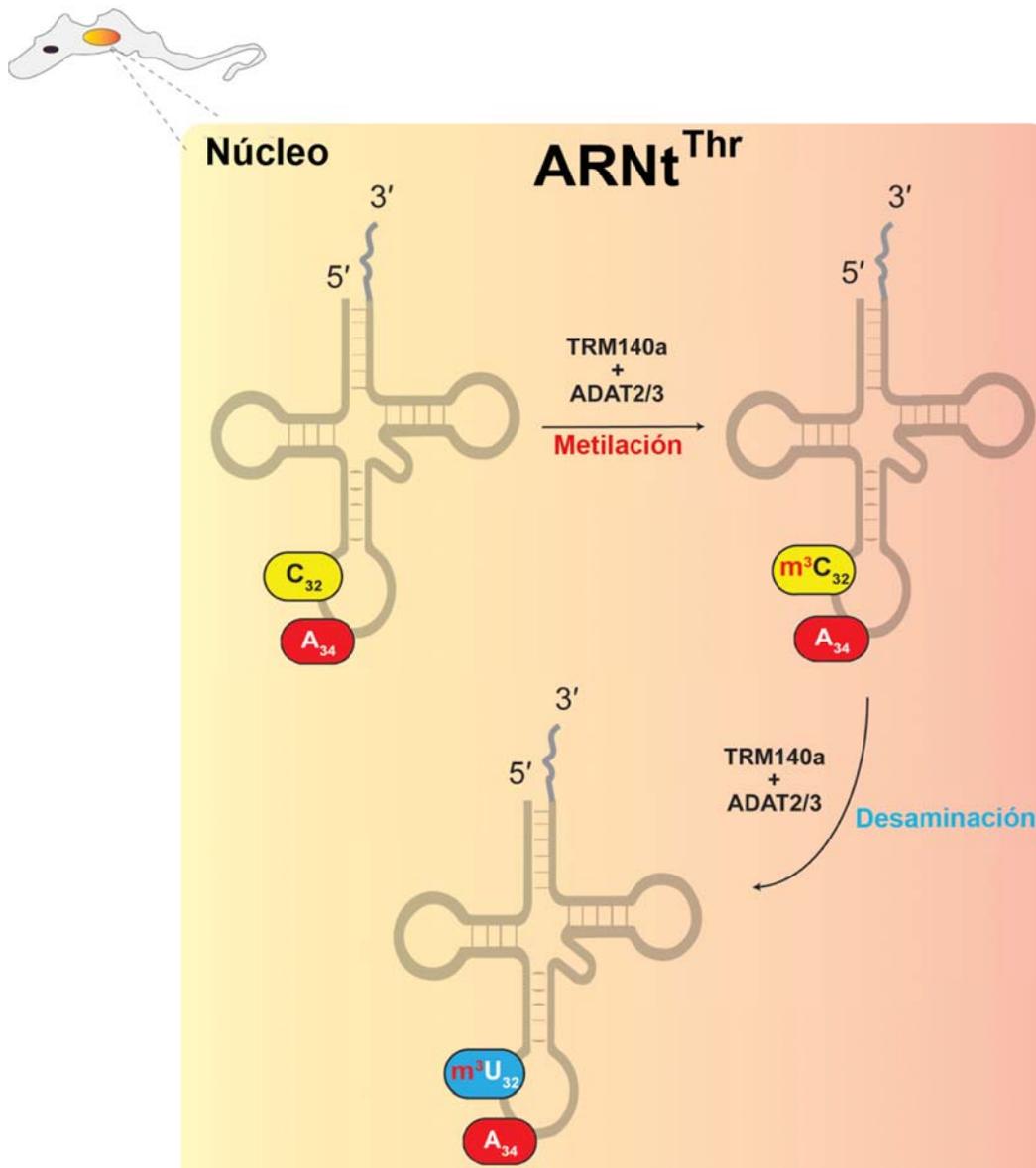


Figura A10. Representación esquemática de la metilación y posterior desaminación de la citosina 32 del ARNt de la treonina en *T. brucei* (adaptado de Dixit, Henderson et al. 2019). La imagen muestra cómo ocurre la desaminación de la citosina 32 del ARNt de la treonina (ARNt^{Thr}) en el núcleo de *T. brucei*. Posteriormente ADAT2/3 cataliza también la desaminación de la adenosina 34 en el citoplasma de la célula.

Aparte de los integrantes de la superfamilia de las desaminasas dependientes de zinc, en la desaminación de bases libres y nucleótidos están implicadas otras aminohidrolasas tales como citosina desaminasas (CoDA, EC 3.5.4.1) que requieren de la participación de un ion de hierro durante la catálisis (en el caso de la enzima bacteriana) o las dCTP desaminasas (EC 3.5.4.13) de bacterias como la de *Escherichia*

coli, en cuyo mecanismo de acción no está implicado ningún ion metálico (Johansson, Neuhard et al. 2004).

Por otra parte, las desaminasas tipo DYW, que se encuentran únicamente en plantas y en *Naegleria* spp., están implicadas en la maduración de los transcritos en cloroplasto y mitocondria, a través de eventos de desaminación de citidina (Iyer, Zhang et al. 2011, Hayes y Santibanez 2020).

A.4.1. Citidina desaminasas

CDA es una enzima de la ruta de salvamento de pirimidinas que cataliza la desaminación de Ctd y dCtd hasta Urd y dUrd respectivamente (Fig. A11). CDA es una enzima dependiente de zinc, ion metálico que es esencial para la catálisis. Se han descrito 2 grandes familias estructurales, las CDAs tetraméricas, en las que cada monómero tiene una masa molecular de unos 15 kDa y las CDAs diméricas en las que cada uno de los monómeros tiene una masa de unos 30 kDa. Las diméricas se encuentran en bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* (Betts, Xiang et al. 1994), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann, Adams et al. 1995) *Vibrio cholerae* o *Klebsiella pneumoniae* (Liu, Shang et al. 2019) y en plantas como *Arabidopsis thaliana* (Vincenzetti, Cambi et al. 1999), mientras que las tetraméricas parecen estar más ampliamente distribuidas y se encuentran en bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Johansson, Mejlhede et al. 2002), así como en *Mycobacterium tuberculosis* (Sanchez-Quitian, Schneider et al. 2010) o *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich, Hilbert et al. 1996) y en muchos eucariotas tales como mamíferos (Vincenzetti, Cambi et al. 1996, Teh, Kimura et al. 2006), nematodos (Anant, Martin et al. 1997, Thompson, Britton et al. 2002) o levaduras (Xie, Sowden et al. 2004) (Fig. A12A). La masa molecular del enzima en condiciones nativas es de aproximadamente 60 kDa puesto que en el primer caso se constituyen como homodímeros y en el segundo como homotetrámeros.

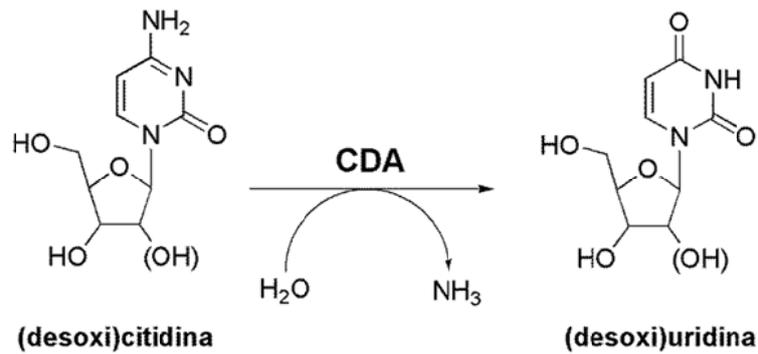


Figura A11. Representación esquemática de la reacción catalizada por CDA. La imagen muestra cómo para que tenga lugar la reacción de desaminación catalizada por CDA sobre Ctd o dCtd es necesaria la participación de una molécula de agua generándose como productos Urd o dUrd y amoníaco.

Tanto la estructura general como el mecanismo de la catálisis de las CDAs diméricas o tetraméricas es muy similar (Vincenzetti, De Sanctis et al. 2003), aunque una de las características distintivas entre ambas es la naturaleza de los residuos que se coordinan con el zinc en el centro activo. Mientras que en las diméricas se trata de una histidina y dos cisteínas (His102, Cys129 y Cys132 para *E. coli*), en las tetraméricas son tres cisteínas (Cys65, Cys99 y Cys102 para la humana) cargadas negativamente, lo cual es bastante inusual, siendo la Cys65 esencial para la correcta orientación del mismo (Frances y Cordelier 2020). Además, se ha sugerido que el zinc en las CDAs tetraméricas juega un papel estructural aparte de su papel catalítico (Johansson, Neuhard et al. 2004).

El ácido glutámico en posición 67 (numeración de la enzima humana) tiene un papel central en el inicio de la catálisis puesto que el grupo carboxilo es el responsable de promover el ataque inicial sobre el carbono 4 del anillo de pirimidina, protonando el nitrógeno adyacente en posición 3 y desprotonando la molécula de agua, que está coordinada con el átomo de zinc en el centro activo, formándose un intermediario de estructura tetraédrica constituida entre el anillo de pirimidina, el grupo hidroxilo procedente de la molécula de agua, el carboxilo del ácido glutámico y el zinc (Johansson, Mejlhede et al. 2002, Chung, Fromme et al. 2005, Sanchez-Quitian, Schneider et al. 2010, Frances y Cordelier 2020). Finalmente, mediante química ácido-base se favorece la ruptura del intermediario tetraédrico (Fig. A12B).

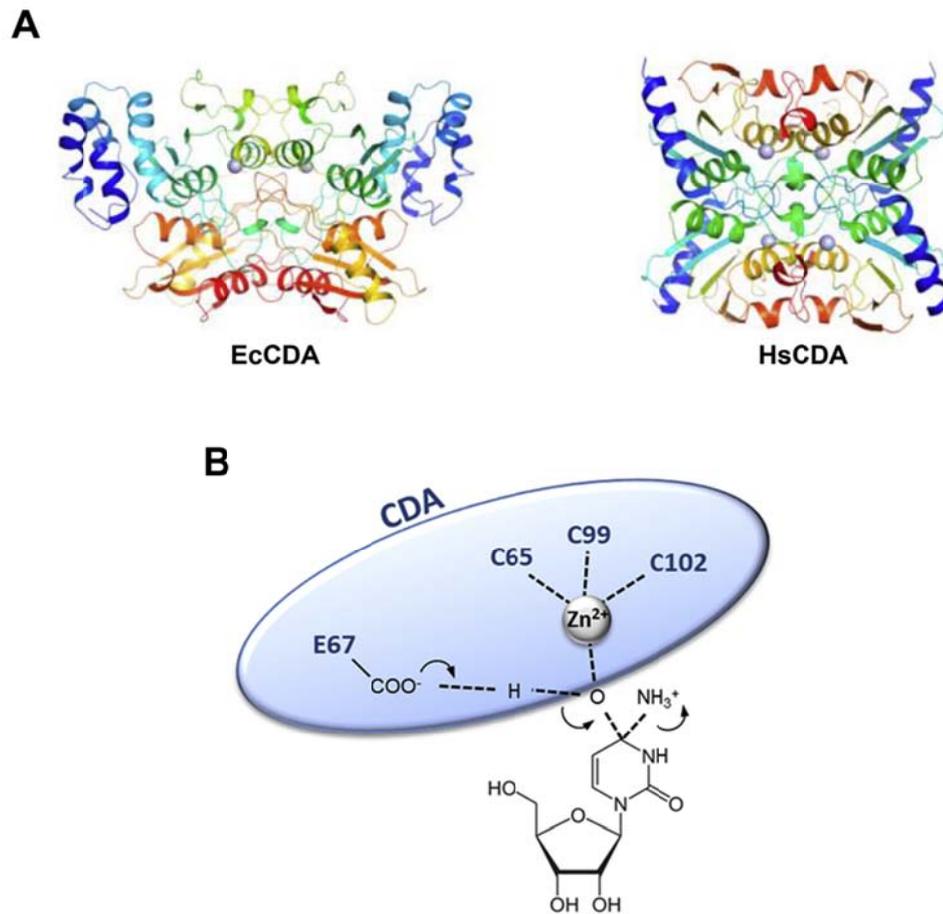


Figura A12. Estructura de las diferentes clases de CDAs e intermediario tetraédrico de la reacción (Adaptado de Frances y Cordelier 2020, Wang, Guo et al. 2020). (A) Estructura de las CDAs diméricas y tetraméricas representadas por la CDA de *E. coli* (EcCDA) y la humana (HsCDA) respectivamente. (B) Intermediario tetraédrico de la reacción de desaminación catalizada por CDA, constituido por el anillo de pirimidina, el grupo hidroxilo procedente de la molécula de agua, el carboxilo del ácido glutámico y el átomo de zinc.

En las enzimas diméricas, como la de *E. coli*, ambos monómeros se disponen para formar un pseudotetrámero y cada una de las dos subunidades posee un dominio activo que se coordina con un átomo de zinc y otro dominio C-terminal que no es funcional, puesto que a pesar de ser estructuralmente homólogo al dominio catalítico (Teh, Kimura et al. 2006), carece tanto de los residuos que se coordinan con el zinc como del ácido glutámico esencial para la catálisis. La similitud entre los 2 dominios sugieren que las CDAs diméricas surgieron a partir de un evento de duplicación génica o a raíz de una serie de mutaciones que condujeron a la pérdida del dominio catalítico C-terminal sin alterar la estructura general (Johansson, Mejlhede et al. 2002, Chen, Herde et al. 2016,

Wang, Guo et al. 2020). En el dominio C-terminal inactivo se encuentra una cavidad denominada *broken active site* que juega un importante papel puesto que el centro activo de cada monómero está constituido por residuos del *broken active site* del otro monómero (Vincenzetti, De Sanctis et al. 2003, Micozzi, Pucciarelli et al. 2010).

Las CDAs tetraméricas, como la humana, están constituidas por cuatro subunidades idénticas que se asocian para formar un dímero de dímeros (Chung, Fromme et al. 2005). Cada uno de los monómeros contiene un dominio catalítico que opera de manera independiente y está coordinado a un átomo de zinc (Vincenzetti, De Sanctis et al. 2003, Micozzi, Pucciarelli et al. 2010, Micozzi, Carpi et al. 2014), siendo importante señalar que cada centro activo está constituido por residuos procedentes de las otras tres subunidades a través de una serie de complejas interacciones, lo que explicaría por qué la enzima sólo es activa en forma de tetrámero (Frances y Cordelier 2020). Se ha observado que los residuos Phe36 y Phe137 pueden ser importantes en la estabilización de las interacciones hidrofóbicas entre el ligando y la enzima y por tanto facilitar el proceso catalítico (Vincenzetti, De Sanctis et al. 2003). Parece que en las CDAs tetraméricas existen otros residuos muy conservados que estarían implicados en el mantenimiento de la estructura cuaternaria o en la unión al sustrato como: Tyr60, que forma un enlace de hidrógeno con el 5'-OH del anillo de ribosa, Tyr33, que forma parte del motivo ${}_{32}\text{PYSHF}_{36}$ que está conservado en la mayoría de las CDAs tetraméricas, Arg68 o Glu108 (numeración humana) (Vincenzetti, De Sanctis et al. 2003, Micozzi, Pucciarelli et al. 2010, Frances y Cordelier 2020). El grupo 3'-OH de la ribosa se une mediante enlaces de hidrógeno a la Asn54 y Glu56 (Teh, Kimura et al. 2006). No existen evidencias de que el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa de la Ctd establezca interacciones con ningún residuo de CDA, motivo por el cual la Ctd y la dCtd son buenos sustratos y por lo que la enzima no discrimina entre ribosa y desoxirribosa (Johansson, Mejlhede et al. 2002).

El interés clínico de CDA se debe a su capacidad de desaminar agentes quimioterapéuticos análogos de citidina empleados como antineoplásicos o antivirales tales como la citosina arabinósido (Ara-C), 5'-azadesoxicitidina, gemcitabina, decitabina, etc. La desaminación de estos agentes conduce a su inactivación farmacológica (Chung, Fromme et al. 2005, Frances y Cordelier 2020). Es por ello que estos fármacos se administran frecuentemente junto con inhibidores de CDA como la

tetrahidouridina (THU) o la zebularina para mejorar su farmacocinética y farmacodinámica (Micozzi, Carpi et al. 2014, Ruan, Qiu et al. 2016).

Así pues, CDA juega un importante papel en la terapia frente al cáncer puesto que niveles elevados pueden contribuir en el fracaso de las terapias y alternativamente, niveles bajos de CDA en pacientes tratados con dichos fármacos muestran serios efectos adversos debido a la toxicidad del tratamiento (Frances y Cordelier 2020). La expresión de CDA en las células cancerosas permite dividir los tumores en 2 grandes subgrupos: los que sobreexpresan CDA (tumores de páncreas, estómago, tiroides,...) y los deficientes en CDA (tumores de hígado, cérvix, colon,...), lo que hace que difieran en su sensibilidad frente al tratamiento antitumoral. Es decir, CDA se podría emplear como marcador para guiar la terapia anticancerosa (Mameri, Bieche et al. 2017). Concretamente, la sobreexpresión de CDA sensibiliza a las células frente a derivados no tóxicos como la 5-hidroximetildesoxicitidina (5hmdC) o la 5-formildesoxicitidina (5fdC) (Zauri, Berridge et al. 2015), de manera que la administración de dichos derivados en tumores con niveles elevados de CDA podría conducir a una mayor selectividad de la quimioterapia.

La deficiencia de CDA conduce a inestabilidad genómica y daño en el ADN y se ha relacionado con el síndrome de Bloom, de manera que la pérdida de la expresión de CDA es concomitante con la mutación del gen *BLM* asociado a dicha enfermedad (Frances y Cordelier 2020). El desequilibrio del *pool* de pirimidinas resultante de la deficiencia de CDA es fuente de estrés durante la replicación y produce defectos en la segregación debido a la acumulación intracelular de dCTP que a su vez reduce la actividad de PARP-1 (poli(ADP-ribosa) polimerasa 1) implicada en la respuesta al daño en ADN (Gemble, Ahuja et al. 2015, Gemble, Buhagiar-Labarchede et al. 2016).

A.4.2. Citosina desaminasas

La CoDA es una metaloenzima que cataliza la desaminación de Cyt para generar Ura y amoníaco y de 5-metilcitosina a timina (Ko, Lin et al. 2003). Este enzima no está presente en tripanosomátidos y se encuentra en bacterias y hongos, donde juega un importante papel en el salvamento de pirimidinas. Sin embargo, no está presente en

células de mamíferos que utilizan la CDA en su lugar (Ireton, McDermott et al. 2002, Ko, Lin et al. 2003). Si comparamos las CoDAs de bacterias, representadas por la de *E. coli*, con las de levaduras, representada por la de *Saccharomyces cerevisiae*, encontramos multitud de diferencias que abarcan desde la secuencia de aminoácidos hasta la estructura cuaternaria. Mientras que la enzima bacteriana es un hexámero, que podríamos definir como un dímero de trímeros, constituido por subunidades independientes y con una masa molecular total de 300 kDa, la de levaduras es un homodímero de unos 35 kDa de masa molecular. En ambos casos la enzima presenta un dominio catalítico por subunidad (Ireton, Black et al. 2003, Zhao, She et al. 2017). Otra diferencia reseñable es el hecho de que en las CoDAs bacterianas un átomo de hierro está coordinado con tres histidinas y un aspartato (His61, His63, His214, Asp313 para *E. coli*), aunque se ha observado que la enzima presenta actividad, si bien ésta es menor, si el centro activo se coordina con otro catión divalente como el zinc (Hall, Fedorov et al. 2011). Por su parte, en las CoDAs de levaduras el centro activo se coordina a un átomo de zinc a través de una histidina y dos cisteínas (His62, Cys91 y Cys94 para *S. cerevisiae*) (Ko, Lin et al. 2003).

Las CoDAs bacterianas son similares a la ADA, conservando residuos implicados en la unión al ión metálico y al sustrato (Ireton, McDermott et al. 2002). Por otra parte, la arquitectura del dominio catalítico de la CoDA de levaduras es muy similar a la de la CDA dimérica de *E. coli* y presenta dos secuencias conservadas en la familia de las CDAs: His-X-Glu y Cys-X-X-Cys, que están implicadas en la coordinación con el átomo de zinc en el centro activo así como con la propia actividad catalítica. Es importante destacar que la CoDA no actúa sobre Ctd probablemente debido a que la ribosa de la Ctd no puede ser acomodada en el centro activo (Ireton, Black et al. 2003, Ko, Lin et al. 2003).

Las desaminasas de nucleósidos y las de nucleobases han evolucionado independientemente de manera que una de las familias incluye enzimas como la CoDA bacteriana o la ADA, mientras que la otra contiene a las CDAs, así como desaminasas implicadas en la edición de ARN como es el caso de las ADAR y las ADAT. La CoDA de levaduras también parece estar incluida en esta última familia (Ireton, McDermott et al. 2002).

A.4.3. Desaminasas de desoxicitidina-5'-monofosfato (dCMP desaminasas)

Las dCMP desaminasas están presentes en la mayoría de organismos eucariotas (no así en tripanosomátidos) y bacterias Gram-positivas catalizando la conversión de dCMP a dUMP dentro de la ruta de salvamento de pirimidinas. Por el contrario, las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Hou, Liang et al. 2008) producen dUMP a partir del dCTP. Posteriormente el dUMP será empleado por la TS en la síntesis de dTMP. Tanto la TS como la dCMP desaminasa presentan niveles de expresión elevados en células que se dividen rápidamente como tumores o células embrionarias (Weiner, Ciesla et al. 1995), mientras que apenas se expresan en células que no se dividen (Almog, Maley et al. 2004).

Se distinguen dos clases de dCMP desaminasas en función de si se encuentran en células de mamífero o bacterias Gram-positivas y fagos, pero en ambos casos la estructura cuaternaria es un hexámero de unos 117 kDa (Maley, Lobo et al. 1993) en el que cada subunidad contiene un centro activo idéntico (Almog, Maley et al. 2004, Hou, Liang et al. 2008) y un único sitio alostérico (Li, Guo et al. 2016). Mientras que en las CDAs el centro activo de cada monómero está constituido por residuos de los otros monómeros, en las dCMP desaminasas el dominio catalítico está formado por residuos de una única subunidad. Las enzimas de mamífero contienen un único ión de zinc por subunidad necesario para la catálisis, mientras que las de bacterias y fagos contienen 2 iones de zinc por monómero (Keefe, Maley et al. 2000, Almog, Maley et al. 2004). Uno de ellos implicado en la catálisis y el otro parece estar implicado en el mantenimiento de la integridad estructural y en la interacción con el grupo fosfato del sustrato (Almog, Maley et al. 2004, Hou, Liang et al. 2008).

Es muy llamativo el hecho de que la actividad catalítica de la enzima se ve afectada en función del ratio dCTP/dTTP y de hecho, las dCMP desaminasas son las únicas integrantes de la superfamilia de desaminasas dependientes de zinc que presentan regulación alostérica (Marx y Alian 2015). Mientras que el dCTP actúa como un activador, el dTTP lo hace como inhibidor, mediante un mecanismo competitivo dependiente de la concentración de ambos (Li, Guo et al. 2016), de manera que a medida que se incrementa el *pool* de dTTP, éste desplaza al dCTP del sitio alostérico y viceversa, regulando la actividad de la enzima para mantener controlado el ratio

dCTP/dTTP. Tanto dCTP como dTTP parecen unirse al mismo sitio alostérico en coordinación con un catión de magnesio (Hou, Liang et al. 2008, Marx y Alian 2015, Li, Guo et al. 2016).

Las dCMP desaminasas pertenecen a la superfamilia de las CDAs y presentan 3 motivos conservados fundamentales implicados tanto en la interacción del regulador (dCTP o dTTP) con el sitio alostérico (Gly-Tyr-Asn-Gly) (Hou, Liang et al. 2008, Li, Guo et al. 2016), como en la coordinación con el ión de zinc y en la propia catálisis (His-Ala/Val-Glu-X-Asn y Pro-Cys-X-X-Cys) (Hou, Liang et al. 2008, Marx y Alian 2015).

Es interesante señalar que el clorovirus *PBCV-1* posee una dCMP-dCTP desaminasa bifuncional en la que el dCTP promueve tanto la desaminación de él mismo con la del dCMP, mientras que el dTTP inhibe su actividad en ambos casos (Zhang, Maley et al. 2007, Li, Guo et al. 2016).

A.4.4. Desaminasas de desoxicitidina-5'-trifosfato (dCTP desaminasas)

La síntesis de dTMP catalizada por la TS ocurre a través de la metilación reductiva del dUMP que se puede obtener mediante 2 vías. Una de ellas, que es considerada muy minoritaria en el aporte de dTTP consiste en la reducción del UDP por la RNR para obtener dUDP que será fosforilado a dUTP y éste finalmente transformado en dUMP (Johansson, Thymark et al. 2007). El principal aporte de dUMP en eucariotas y bacterias Gram-positivas procede de la desaminación del dCMP, catalizada por la dCMP desaminasa, mientras que en otros procariontes, como las enterobacterias *E. coli* y *S. typhimurium* (Beck, Eisenhardt et al. 1975), la dCTP desaminasa cataliza la desaminación del dCTP hasta dUTP que posteriormente será hidrolizado a dUMP mediante una dUTPasa. En arqueas como *Methanocaldococcus jannaschii*, la síntesis de dUMP a partir de dCTP ocurre directamente por la acción de una dCTP desaminasa/dUTPasa bifuncional (Bjornberg, Neuhardt et al. 2003, Helt, Thymark et al. 2008). Ésta junto con las dCTP desaminasas y las dUTPasas triméricas constituyen una familia de enzimas estructuralmente relacionadas puesto que se constituyen como homotrímeros (Li, Xu et al. 2003). Tanto la dCTP desaminasa monofuncional como la

dCTP desaminasa/dUTPasa son inhibidas por dTTP, que se une al centro activo estabilizando a la enzima en una conformación inactiva (Johansson, Thymark et al. 2007, Thymark, Johansson et al. 2008). La actividad dCTP desaminasa está ausente en tripanosomátidos.

Las dCTP desaminasas no presentan secuencias conservadas respecto a las desaminasas dependientes de zinc, a excepción de un residuo de ácido glutámico fundamental para que tenga lugar la desaminación (Li, Xu et al. 2003). En el mecanismo de la catálisis no interviene ningún cofactor metálico activando la molécula de agua para el ataque nucleófilo como sí ocurre en las dCMP, citidina o citosina desaminasas (Johansson, Fano et al. 2005).

Se ha observado para la dCTP desaminasa de *E. coli* que un ión de magnesio está coordinado con los grupos fosfato del dCTP. Así pues, aunque el magnesio no juega ningún papel en la catálisis, sí parece confirmarse que el verdadero sustrato de la enzima sería el complejo Mg^{2+} -dCTP y que el magnesio compensaría la carga negativa de dichos grupos fosfato (Johansson, Fano et al. 2005). En el caso de las enzimas bifuncionales de arqueas, también requieren magnesio para su actividad confirmándose que ningún otro catión metálico puede sustituirlo (Bjornberg, Neuhard et al. 2003, Li, Xu et al. 2003).

Las dCTP desaminasas/dUTPasas bifuncionales habían sido identificadas únicamente en arqueas pero *M. tuberculosis* también expresa una enzima con actividad dCTP desaminasa y dUTPasa que resulta inhibida por dTTP. Al igual que los otros miembros de la familia se constituye como un homotrímero. Pese a tratarse de una enzima bifuncional, parece estar más íntimamente relacionada con la dCTP desaminasa monofuncional de *E. coli*. (Helt, Thymark et al. 2008).

A.4.5. Desaminación de citidina en ácidos nucleicos

En todos los organismos se dan cientos de modificaciones a nivel de los (desoxi)ribonucleótidos tanto en ARN como en ADN. La identificación de dichas modificaciones a nivel de ARN recibió el nombre de “edición de ARN”, término que ya había sido empleado por Rob Benne en los años 80 en referencia a las

inserciones/delecciones de uridinas a nivel de ARNm en la mitocondria de *Trypanosoma* spp., para ajustar los codones y la pauta abierta de lectura (Stuart, Schnauffer et al. 2005, Read, Lukes et al. 2016, Smith 2017, Lerner, Papavasiliou et al. 2018). Las proteínas AID/APOBEC comparten la capacidad de generar mutaciones en ADN y ARN desaminando la citidina a uridina. El primer miembro de la familia que se identificó y caracterizó fue APOBEC1 (*apolipoprotein B editing complex 1*) (Conticello 2008, Lerner, Papavasiliou et al. 2018). La familia APOBEC en humanos consta de 11 miembros que incluyen APOBEC1, AID (*activation-induced deaminase*), APOBEC2, APOBEC3A-H y APOBEC4 (Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017).

Todos los miembros de la familia comparten la estructura de las desaminasas dependientes de zinc, cuya principal característica es el dominio responsable de la actividad catalítica que porta la secuencia de aminoácidos His-[Ala/Val]-Glu-X₂₄₋₃₆-Pro-Cys-X-X-Cys, en la que la histidina y las dos cisteínas se coordinan con un átomo de zinc. El sustrato se acomoda en el bolsillo catalítico y la desaminación tiene lugar a través del ataque nucleófilo de una molécula de agua activada por el zinc, sobre el carbono 4 del anillo de citosina. El residuo de ácido glutámico actúa como dador de protones. Se trata por tanto de un mecanismo de acción conservado por todos los miembros de la superfamilia de desaminasas dependientes de zinc, lo que sugiere la existencia de un antecesor común (Conticello 2008, Prohaska, Bennett et al. 2014, Smith 2017).

Existen rasgos estructurales inherentes a la familia APOBEC, como regiones constituidas por residuos cargados positivamente, así como residuos hidrofóbicos que rodean el centro activo y varían entre los distintos miembros de la familia. Estas secuencias estarían implicadas en la neutralización de la carga negativa de la cadena de ARN o ADN así como en la acomodación de la base de citidina (Prohaska, Bennett et al. 2014, Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017). El motivo Ser-Trp-Ser localizado antes del motivo Pro-Cys-X-XCys es necesario para la catálisis (Conticello 2008).

Los integrantes de esta familia llevan a cabo la desaminación de citosina en el contexto del ARN o ADN de cadena simple de modo que la regulación de este proceso y la eficiencia de edición está determinada por diversos mecanismos tales como la regulación de la expresión de los genes APOBEC, modificaciones postraduccionales, compartimentalización subcelular, interacción con cofactores y procesos de degradación

proteica (Prohaska, Bennett et al. 2014). De hecho, dada la actividad mutagénica de este grupo de proteínas, la mayoría de las enzimas AID/APOBEC se localizan inicialmente en el citoplasma como mecanismo de control (Conticello 2008).

AID

Juega un papel central en los linfocitos B como desaminasa implicada en las múltiples mutaciones requeridas para la diversificación y recombinación de los genes de las inmunoglobulinas mediante procesos como la recombinación de cambio de clase o la hipermutación somática (Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017). La deficiencia en AID conduce al síndrome de hipergammaglobulinemia M tipo 2, una inmunodeficiencia en la que la incapacidad para llevar a cabo la recombinación de cambio de clase conduce a la ausencia de anticuerpos a excepción de las IgM (Conticello 2008, Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017).

La actividad catalítica de AID tiene lugar en el núcleo pero la enzima se localiza fundamentalmente en el citoplasma debido a la presencia de una señal de exportación nuclear en el extremo C-terminal. También se ha descrito la presencia de una señal débil de localización nuclear en la región N-terminal (Conticello 2008). En el citoplasma, AID se encuentra retenida mediante una serie de interacciones con el factor de elongación eucariota 1 α (eEF1A), la proteína de choque térmico 90 (HSP90) y posiblemente ARN (Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017). Se ha visto que forma homodímeros funcionales aunque los monómeros también presentan actividad (Salter, Bennett et al. 2016).

APOBEC1

Es responsable de la desaminación de la Ctd en posición 6666 en el pre-ARNm de la apolipoproteína B (ApoB), generando un codón de parada prematuro que conduce a la obtención de una proteína truncada que es el principal componente de los quilomicrones implicados en el transporte de los triglicéridos (Conticello 2008, Lerner, Papavasiliou et al. 2018).

Esta enzima por sí misma no tiene actividad desaminasa ni capacidad de unión al ARN (o es muy baja), de manera que APOBEC1 forma parte de un complejo macromolecular llamado editosoma y del que también forman parte proteínas de unión a ARN, como ACF (*apobec1 complementation factor*) o RBM47 (*RNA-binding motif*

protein 47) (Smith 2017, Lerner, Papavasiliou et al. 2018). APOBEC1 se mantiene en el citoplasma junto con ACF formando un complejo 60S catalíticamente inactivo. La fosforilación de ACF permite que APOBEC1 se desplace al núcleo donde se formará *de novo* un complejo 27S activo (Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017). La enzima presenta un estado oligomérico de dímero esencial para la actividad catalítica (Xie, Sowden et al. 2004).

ACF es el cofactor de APOBEC1 más ampliamente estudiado y está implicado en el reconocimiento de una secuencia de anclaje en 3' respecto a la Ctd editada que además está rodeada de secuencias ricas en AU (Conticello 2008, Prohaska, Bennett et al. 2014). Estudios de transcriptómica han revelado que existen numerosos eventos de edición de Ctd a Urd en la región 3'UTR de numerosos transcritos, la mayoría de los cuales presentan secuencias de anclaje en 3'. APOBEC1 y ACF se unen a los ARNm para regular la expresión proteica mediante cambios en su estabilidad (Prohaska, Bennett et al. 2014, Smith 2017, Lerner, Papavasiliou et al. 2018).

APOBEC3

Las proteínas APOBEC3 constan de 7 miembros que comprenden desde APOBEC3A hasta APOBEC3H, siendo su sustrato preferente la dCtd en ADN de cadena sencilla. APOBEC3B, D, F y G presentan dos dominios desaminasa de los cuales, el N-terminal carece de actividad desaminasa pero está implicado en la interacción con el ARN o ADN. Estudios espectroscópicos han puesto de manifiesto que APOBEC3A y C se encuentran en estado monomérico en las células, mientras que APOBEC3B, D, F, G y H son multiméricas (Salter, Bennett et al. 2016, Smith 2017). Los integrantes de este grupo están implicados principalmente en la defensa frente a virus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el de la hepatitis B (VHB), así como elementos móviles del genoma.

APOBEC3G se localiza en el citoplasma formando parte de complejos ribonucleoproteicos de elevado o de bajo peso molecular en los que el enzima se encuentra en estado inactivo o activo respectivamente. Dichos complejos se encuentran formando parte de los *P bodies* y los gránulos de estrés (SGs) implicados en la función, estabilidad y metabolismo del ARN (Conticello 2008, Prohaska, Bennett et al. 2014). Por el contrario, APOBEC3B se localiza preferentemente en el núcleo debido a una señal de localización nuclear y su expresión se mantiene en niveles muy bajos en la

mayoría de tejidos normales, mientras que se encuentra muy elevada en diversas formas de cáncer. La única limitación en el acceso de APOBEC3B al ADN genómico parece ser el control de los niveles de expresión (Salter, Bennett et al. 2016), al contrario de lo que ocurre con otros miembros de la familia que están sometidos a mecanismos de control más ajustados.

Otras CDAs con actividad sobre ARN

Se han caracterizado CDAs implicadas en el metabolismo de pirimidinas con actividad de unión a ARN, como la CDA de *Brugia pahangi* que presenta una V_{max} menor que la enzima humana y exhibe actividad de unión a ARN con secuencias ricas en AU (como la secuencia del ARNm de ApoB) (Anant, Martin et al. 1997) o la CDA-1 y CDA-2 de *Caenorhabditis elegans* que presentan igualmente actividad de unión a secuencias de ARN ricas en AU (Thompson, Britton et al. 2002). Así mismo, la CDA-1 de *S. cerevisiae* no sólo es capaz de unirse a secuencias de ARN sino que cataliza una desaminación significativa del ARNm de ApoB (Dance, Beemiller et al. 2001).

Las secuencias de estas cuatro CDAs con actividad de unión a ARN presentan dos residuos aromáticos conservados, el primero de los cuales es una tirosina o una histidina y el segundo es una fenilalanina (Tyr69/Phe98 para *B. pahangi*, His76/Phe105 y Tyr76/Phe105 para la CDA-1 y 2 de *C. elegans* respectivamente o His75/Phe106 de *S. cerevisiae*). Por el contrario, en otras CDAs como la de *E. coli* o *B. subtilis* que no presentan actividad sobre ARN, estos residuos aromáticos son reemplazados por residuos lineales (Teh, Kimura et al. 2006). Por lo tanto, CDAs que presenten dichos residuos conservados en su secuencia como la de *Mus musculus* o la propia enzima humana podrían tener un papel adicional interactuando con ARN.

En la arquea *M. kandleri* los ARNt del ácido aspártico, la cisteína y la histidina poseen una Urd en posición 8 mientras que el correspondiente gen posee una Ctd. La enzima implicada en dicha edición se ha identificado como CDAT8, cuya estructura en solución es un dímero y que presenta tanto la secuencia conservada His-Ala/Val-Glu-X₂₄₋₃₆-Pro-Cys-X-X-Cys propia de los integrantes de la superfamilia de desaminasas dependientes de zinc, como el dominio THUMP implicado en la interacción con la secuencia 3'-CCA de los ARNt (Randau, Stanley et al. 2009).

En tripanosomátidos también se produce edición de Ctd a Urd en algunos ARNt como el del triptófano, en el que el anticodón CCA se edita a UCA para poder decodificar el codón UGA del triptófano a nivel mitocondrial (Alfonzo, Blanc et al. 1999). Esta reacción está catalizada por una CDA mitocondrial denominada TbmCDAT (CDA mitocondrial que actúa sobre ARNt) que ha sido recientemente caracterizada (Paris, Svobodova et al. 2021).

Por otra parte, se ha identificado una CDA-like de función desconocida y sin ortólogos conocidos en mamíferos. Dicha proteína se encuentra muy conservada en kinetoplástidos y se caracteriza por presentar en su secuencia tanto un dominio tipo CDA como un dominio CCCH de dedos de zinc (Kramer, Kimblin et al. 2010) que sugiere la posible interacción con ácidos nucleicos. La proteína de *T. brucei* (TbCDA-like) pertenece a una rama divergente dentro del clado de las CDAs en el que se incluyen proteínas de otros organismos eucariotas tales como algas clorofitas, estramenopilos (Stramenopiles) o heterocontos (Heterokonta) y alveolados como *Perkinsus marinus* (Iyer, Zhang et al. 2011). TbCDA-like también será objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

OBJETIVOS

B. OBJETIVOS

El mantenimiento de la integridad genómica es fundamental para asegurar la supervivencia y la viabilidad celular, especialmente en el caso de las células altamente proliferativas como los microorganismos patógenos. Se trata de un proceso altamente regulado en el que se debe mantener un control constante de los niveles de dNTPs ya que alteraciones en dicha regulación pueden conducir a eventos de genotoxicidad y mutagénesis.

En el caso de *T. brucei* el metabolismo de pirimidinas está constituido por dos principales vías: la síntesis *de novo* y la ruta de salvamento; dependiendo esta última de numerosas enzimas necesarias para la supervivencia del parásito. Se ha observado que las enzimas implicadas en la generación de dTMP tales como DHFR-TS o TK son esenciales, haciendo de la síntesis de dTMP una interesante fuente para la obtención de dianas para el diseño de fármacos. En este sentido, cabe destacar que *T. brucei* posee una dUTPasa esencial que regula los niveles de dUTP impidiendo su incorporación a ADN y por otra parte produciendo dUMP, el sustrato de la síntesis del dTMP. Teniendo en cuenta que los tripanosomátidos carecen de actividad dCMP desaminasa (que es responsable de la formación mayoritaria de dUMP en células de mamíferos), se plantea la cuestión acerca de si el dUMP necesario procede mayoritariamente de la acción de dUTPasa o alternativamente de TK (que fosforila dUrd a dUMP) y de ser este último caso, de dónde procede la dUrd que actúa como sustrato para TK. Por todo ello, el primer objetivo de la presente tesis doctoral consistió en esclarecer la ruta que conduce a la síntesis del dTMP estudiando la contribución de una CDA en la producción de dUrd como sustrato para TK, así como establecer si la dUTPasa está relacionada únicamente con el mantenimiento de unos niveles bajos de dUTP o por el contrario tiene un papel fundamental en la generación del dUMP necesario para la síntesis de dTMP. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar la caracterización bioquímica y cinética de TbCDA estudiando sus potenciales sustratos.
2. Determinar la localización intracelular de TbCDA en *T. brucei*.
3. Establecer el papel de TbCDA y TbdUTPasa en el mantenimiento de los niveles de dUMP y la síntesis de dTMP.

La expresión génica en *T. brucei* presenta una transcripción policistrónica de manera que depende casi exclusivamente de mecanismos de control post-transcripcional basados, a menudo en proteínas de unión a ARN que regulan tanto la traducción como la estabilidad del ARNm así como de otras especies de ARN. En este sentido, se han descrito en otros organismos diversas enzimas con actividad desaminasa implicadas en la maduración de los ARNms y ARNts mediante la desaminación de adenosinas y/o citosinas en posiciones concretas. Hasta la fecha no se han descrito en *Trypanosoma* enzimas que lleven a cabo la desaminación del ARNm (ADAR) mientras que la desaminación de ARNt está catalizada por enzimas con actividad ADAT que han sido bien caracterizadas. Así mismo, parecen jugar un papel importante las secuencias AU que se encuentran en las regiones 3'UTR de los ARNm, a las que aparentemente se unen algunas CDAs y que especialmente en *T. brucei* son determinantes para regular los niveles de ARNm.

Hemos identificado la existencia de una CDA-like de función desconocida conservada en kinetoplastidos y perteneciente a una rama divergente dentro del clado de las CDAs. Esta novedosa CDA-like se caracteriza por presentar un dominio de dedos de zinc en su secuencia. Con estas observaciones en mente, el segundo objetivo general de esta tesis consiste en estudiar el papel de CDA-like como posible desaminasa de citosina en ARN y establecer su importancia para la supervivencia de *T. brucei*. Con este fin, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el impacto de TbCDA-like en la proliferación y supervivencia de *T. brucei*.
2. Evaluar la implicación de TbCDA-like en la progresión del ciclo celular y la integridad genómica.
3. Establecer el papel de TbCDA-like en la homeostasis de nucleótidos y el perfil metabólico de *T. brucei*.
4. Determinar la actividad de unión a ARN de TbCDA-like y su papel dentro de la regulación de la expresión génica de *T. brucei*.
5. Describir la localización intracelular de TbCDA-like en *T. brucei* en condiciones fisiológicas y de estrés nutricional. Establecer así mismo el grado de colocación con otras proteínas que se localizan en gránulos de estrés.

MATERIAL Y MÉTODOS

C. MATERIAL Y MÉTODOS

C.1. MATERIAL

C.1.1. Líneas celulares de *Trypanosoma brucei*

En la presente Tesis Doctoral el trabajo ha sido realizado sobre protozoos parásitos de la especie *Trypanosoma brucei*, en concreto, la subespecie *T. brucei brucei*, agente causal de la tripanosomiasis africana en animales o “nagana”. En los experimentos se han empleado tanto tripomastigotes sanguíneos de la forma alargada (forma sanguínea) como tripomastigotes procíclicos (forma procíclica). Todas las líneas celulares generadas derivan de las siguientes líneas parentales de *T. b. brucei* 427:

***T. brucei* 449** (forma procíclica) (*Tb* PF) (Biebinger, Wirtz et al. 1997). Se caracteriza porque se ha integrado en su genoma el gen para el represor inducible de tetraciclina (TetR). El cultivo de esta línea parental se realiza en presencia de fleomicina 0,5 µg/ml.

***T. brucei* S16** (forma sanguínea) (*Tb* BF) (Wirtz, Leal et al. 1999). Se han integrado en su genoma genes para la T7 ARN polimerasa y TetR. El cultivo de esta línea parental se realiza en presencia de G-418 2,5 µg/ml.

Líneas celulares generadas:

Línea celular	Línea parental	Marcador de selección	Descripción	Referencia
CDA-RNAi	<i>Tb</i> BF	Hig ^a	ARN de interferencia frente a la secuencia codificante de TbCDA	Presente Tesis Doctoral
CDA-RNAi(2)	<i>Tb</i> BF	Hig ^a	ARN de interferencia frente a la secuencia codificante y la 3' UTR de TbCDA	Presente Tesis Doctoral
CDA-OE	<i>Tb</i> BF	Pur ^a	Sobreexpresión de una copia ectópica inducible de TbCDA	Presente Tesis Doctoral
CDA-OE	<i>Tb</i> PF	Pur ^a	Sobreexpresión de una copia ectópica inducible de TbCDA	Presente Tesis Doctoral
CDA-c-myc	<i>Tb</i> PF	Pur ^a	Sobreexpresión de una copia ectópica inducible de TbCDA fusionada a c-	Presente Tesis Doctoral

			myc en el extremo C-terminal	
DUT-KO	<i>Tb</i> BF	Hig, Bla	Línea knock-out para la TbdUTPasa	(Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013)
DUT-KO + DCTD	<i>Tb</i> BF	Hig, Bla, Pur ^a	Línea knock-out para la TbdUTPasa que expresa la DCTD humana de forma inducible	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-RNAi	<i>Tb</i> PF	Hig ^a	ARN de interferencia frente a la región N-terminal de la secuencia codificante de TbcDA-like	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-RNAi(2)	<i>Tb</i> PF	Hig ^a	ARN de interferencia frente a la región C-terminal de la secuencia codificante de TbcDA-like	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-OE	<i>Tb</i> PF	Pur ^a	Sobreexpresión de una copia ectópica inducible de TbcDA fusionada a c-myc en el extremo N-terminal	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-sKO	<i>Tb</i> PF	Hig	Línea single knock-out para TbcDA-like	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-sKO	<i>Tb</i> BF	Hig	Línea single knock-out para TbcDA-like	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-N-ter KI	<i>Tb</i> PF	Hig, Bla	Línea single knock-in (sobre un fondo sKO) para TbcDA-like con 6 c-mycs en el extremo N-terminal del locus endógeno de un alelo	Presente Tesis Doctoral
CDA-like-C-ter KI	<i>Tb</i> PF	Hig, Bla	Línea single knock-in (sobre un fondo sKO) para TbcDA-like con 12 c-mycs en el extremo N-terminal del locus endógeno de un alelo	Presente Tesis Doctoral

^aLa adición de DOX 1 µg/ml induce la sobreexpresión de la copia ectópica o la expresión del ARN de interferencia según el caso.

Tabla C1. Líneas celulares generadas a partir de las líneas parentales *Tb* PF y *Tb* BF.
Listado, descripción y condiciones de cultivo.

C.1.2. Cepas de *Escherichia coli*

XL1-Blue (Bullock WO 1987) *Rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hdsR17, supE44, relA1, lac* [F⁺*proAB lacIq ZAM15 Tn10* (Tetr)]. Empleada para los clonajes.

BL21(DE3) (Phillips, VanBogelen et al. 1984) *F- dcm, ompT, hsdS (rB- mB-)gal* λ (DE3). Empleada para la expresión de proteínas.

C.1.3. Medios de cultivo

C.1.3.1. Medios de cultivo para parásitos

HMI-9 es el medio empleado para llevar a cabo el cultivo de los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*. Su composición se detalla a continuación: IMDM (Sigma) 1,77% (p/v), NaHCO₃ 36 mM, hipoxantina 1 mM, timidina 80 µM, cisteína 1,5 mM, ácido disulfónico de batocuproína 54 µM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 0,2 mM. Ajustar el pH a 7,5, filtrar a través de membranas de 0,22 µM y suplementar con suero bovino fetal (SBF) 10 % (GIBCO). En el caso de los experimentos llevados a cabo en medio HMI-9 libre de pirimidinas se excluyó la timidina en la preparación del mismo.

SDM-79 es el medio empleado para llevar a cabo el cultivo de los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. Su composición se detalla a continuación: MEM (GIBCO) 0,7 % (p/v); medio 199 (GIBCO) 0,2 % (p/v), aminoácidos esenciales MEM 50x (Sigma) 0,8 % (p/v), aminoácidos 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 3 mM, tirosina 552 µM, guanosina 35 µM, ácido fólico 9 µM, D(+)-glucosamina 0,2 mM, ácido p-aminobenzoico 14,6 µM, biotina 409 nM. Filtrar y suplementar con SBF 10 % y hemina 11,5 µM.

C.1.3.2. Medios de cultivo para bacterias

Lysogeny broth (LB) es el medio empleado para llevar a cabo el cultivo de bacterias. Su composición se detalla a continuación: 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 se adicionó al medio ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml), dependiendo de la resistencia otorgada según el plásmido.

C.1.4. Soluciones y tampones

Soluciones de uso general	
PBS 1X (tampón fosfato salino)	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 7,4
PBS-250	NaCl 250 mM, KCl 2,7 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 7,4
PBS-500	NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 7,4
TDB-glucosa	NaCl 80 mM, KCl 5 mM, Na ₂ HPO ₄ 20 mM, MgSO ₄ 1 mM, glucosa 20 mM, pH 7,4
TAE	Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM
Purificación de proteínas	
FPLC-A	Tampón fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, inhibidores de proteasas (Roche)
FPLC-B	Tampón fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, inhibidores de proteasas (Roche)
Tampón almacenamiento (TbCDA)	50 mM Tris-HCl pH 7,5, glicerol 20%
Tampón de lisis (TbCDA-like cuerpos de inclusión)	Tris-HCl 50 mM, imidazol 20 mM, urea 8 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5, inhibidores de proteasas (Roche)
Tampón de lavado (TbCDA-like cuerpos de inclusión)	Tris-HCl 50 mM, imidazol 50 mM, urea 8 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5, inhibidores de proteasas (Roche)
Tampón de elución (TbCDA-like cuerpos de inclusión)	Tris-HCl 50 mM, imidazol 0,5 M, urea 8 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5, inhibidores de proteasas (Roche)
Caracterización de proteínas	
Caracterización cinética (TbCDA)	Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 1 mM
Tampón de lisis para obtener extractos de parásitos	Urea 6 M, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1% pH 7
Tampón de carga para proteínas	Tris-HCl 67,5 mM pH 6,8, SDS 3%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%
Tampón SDS running	Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%
Tampón de transferencia	Tris base 25 mM, glicina 186 mM, metanol 20% (v/v)
Purificación de anticuerpos	

Tampón de adherencia	HEPES 50 mM, pH 7,5
Tampón de bloqueo	Etanolamina-HCl 100 mM, pH 8
Tampón de elución	Glicina 100 mM, pH 2,5
Determinación de rNTPs	
Tampón de lisis	HClO ₄ 0,4 N
Tampón de separación	(NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,5 M, pH 3,4
<i>Orthogonal Organic Phase Separation (OOPS)</i>	
Tampón de digestión con RNasa A	Tris-HCl 20 mM pH 6,8, MgCl ₂ 1 mM, SDS 1%
Transfección de parásitos	
Cytomix (van den Hoff, Moorman 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 y Cross 1989)	NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na ₂ HPO ₄ 8mM, KH ₂ PO ₄ 1,5 mM, Mg(CH ₃ COO) ₂ 1,5 mM, Ca(CH ₃ COO) ₂ 90µM, pH 7

Tabla C2. Principales tampones empleados. Listado y composición.

C.1.5. Compuestos

C.1.5.1. Nucleótidos, nucleósidos y nucleobases

Nombre	Abreviatura	Referencia
Nucleótidos		
Citidina-5'-trifosfato	CTP	Sigma-Aldrich
Uridina-5'-trifosfato	UTP	Sigma-Aldrich
Adenosina-5'-trifosfato	ATP	Sigma-Aldrich
Guanosina-5'-trifosfato	GTP	Sigma-Aldrich
Citidina-5'-monofosfato	CMP	Sigma-Aldrich

Desoxicitidina-5'-monofosfato	dCMP	Sigma-Aldrich
Nucleósidos		
Citidina	Ctd	Sigma-Aldrich
Desoxicitidina	dCtd	Sigma-Aldrich
5-metil-2'-desoxicitidina	5-Met-dCtd	Santa Cruz Biotechnology
Timidina	dThd	Sigma-Aldrich
Desoxiuridina	dUrd	Sigma-Aldrich
Uridina	Urd	Sigma-Aldrich
Nucleobases		
Uracilo	Ura	Sigma-Aldrich
Citosina	Cyt	Sigma-Aldrich

Tabla C3. Nucleótidos, nucleósidos y nucleobases utilizados. Se incluyen las abreviaturas y la referencia.

C.1.5.2. Antibióticos

Nombre	Abreviatura	Descripción	Organismo seleccionado	Referencia
Geneticina	G-418	Antibiótico aminoglucósido. Inhibe la síntesis proteica	<i>T. brucei</i>	Gibco
Fleomicina	Fleo	Antibiótico glucopéptido. Se une al DNA bloqueando la fase S del ciclo celular	<i>T. brucei</i>	Sigma-Aldrich
Higromicina	Hig	Antibiótico aminoglucósido. Inhibe la síntesis proteica (actúa sobre ARNm)	<i>T. brucei</i>	Sigma-Aldrich
Puromicina	Pur	Antibiótico aminonucleósido. Causa terminación prematura de la cadena polipeptídica	<i>T. brucei</i>	Sigma-Aldrich
Blasticidina	Bla	Antibiótico nucleósido-peptídico. Bloquea la terminación de la	<i>T. brucei</i>	Gibco

		traducción		
Ampicilina	Amp	Antibiótico betalactámico derivado de las penicilinas. Interfiere la síntesis de la pared celular	<i>E.coli</i>	Roche
Doxiciclina	Dox	Antibiótico derivado de las tetraciclinas. Inhibe la síntesis proteica uniéndose al ribosoma	<i>T. brucei</i>	Sigma-Aldrich
Kanamicina	Kan	Antibiótico aminoglucósido. Inhibe la síntesis proteica uniéndose al ribosoma	<i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich

Tabla C4. Antibióticos empleados. Se incluyen las abreviaturas y una breve descripción.

C.1.5.3. Otros compuestos

DAPI: Prolong gold antifade mountant with DAPI (Invitrogen). Fluoróforo que se une a regiones ricas en adenina y timina en ADN permitiendo por tanto el marcaje del núcleo y kinetoplasto.

MitoTracker: MitoTracker Red CMX Ros (Invitrogen). Fluoróforo que se acumula en la mitocondria de células vivas debido al potencial de membrana altamente negativo de ésta.

Yoduro de propidio: (Sigma-Aldrich). Agente intercalante fluorescente que permite teñir el ADN del núcleo y kinetoplasto en células fijadas.

TRIzol: (ThermoFischer). Reactivo para el aislamiento de ARN total a partir de extractos celulares. Se trata de una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que permite la purificación del ARN desde la capa acuosa tras la adición de cloroformo.

C.1.6. Anticuerpos

Nombre	Organismo	Uso en wesn-tern-blot	Uso en inmunofluorescencia	Referencia
Anticuerpos primarios				
Anti-TbCDA	Conejo	1:500	1:50	Presente Tesis Doctoral
Anti-TbCDA-like	Conejo	1:1000	1:25	Presente Tesis Doctoral
Anti-c-myc	Ratón	1:5000	1:100	Sigma-Aldrich
Anti-TbdUTPasa	Conejo	1:75000	-	Castillo-Acosta, Estevez et al. 2008
Anti-HsDCTD	Ratón	1:1000	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti- β -tubulina	Ratón	1:5000	-	Sigma-Aldrich
Anti- γ -H2A	Conejo	-	1:500	Glover y Horn 2012
Anti-TbDhh1	Conejo	-	1:100	Cedido por Antonio Estévez
Anti-TbScd6	Conejo	-	1:100	Cedido por Antonio Estévez
Anti-TbDRBD3	Conejo	-	1:100	Cedido por Antonio Estévez
Anticuerpos secundarios				
HRP anti-IgG de conejo	Cabra	1:5000	-	Promega
HRP anti-IgG de ratón	Cabra	1:3000	-	Promega
Alexa-Fluor [®] 488 anti-IgG de conejo	Cabra	-	1:40	Sigma-Aldrich
Alexa-Fluor [®] 594 anti-IgG de conejo	Cabra	-	1:40	Sigma-Aldrich
Alexa-Fluor [®] 488 anti-IgG de ratón	Cabra	-	1:40	Sigma-Aldrich

Tabla C5. Anticuerpos empleados durante el desarrollo de esta Tesis. Listado y descripción.

C.1.7. Oligonucleótidos

Aquellos oligonucleótidos que han sido sintetizados por la unidad de genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra aparecen referenciados como IPBLN en la tabla C6.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Sitio de restricción	Uso	Referencia
VCA165	GCCATATGCAATGCTCAT CATTGAAGACC	NdeI	Clonaje TbCDA en pET28a/pGRV23b/ pGRV33	IPBLN
VCA166	GCGGATCCTCAGAAAGTT CCTGGACACC	BamHI	Clonaje TbCDA en pET28a/pGRV23b	IPBLN
VCA167	GCGGATCCAAGCTTTGCG GTGGGTGCTGC	BamHI/Hind III	Construcción RNAi (1) TbCDA	IPBLN
VCA168	AACGGGCCCCGTCGCAAG TGCGGCCACGTC	HpaI/ApaI	Construcción RNAi (1) TbCDA	IPBLN
AMB1	GCGGATCCAAGCTTGCTG ATGCCACAGTCCCTCC	BamHI/Hind III	Construcción RNAi (2) TbCDA	IPBLN
AMB2	GCGTTAACGGGCCCCATC CCTGCTGCTCATTAC	HpaI/ApaI	Construcción RNAi (2) TbCDA	IPBLN
VCA179b	GCGTTAACGAAAGTTCTT GGACACCTTGAGTG	HpaI	Clonaje TbCDA en pGRV33	IPBLN
T7P	AATACGACTCACTATAG	-	Secuenciación	IPBLN
SP6	ATTTAGGTGACACTATA	-	Secuenciación	IPBLN
T7T	GCTAGTTATTGCTCAGC	-	Secuenciación	IPBLN
AE41	GAGTTTAACATGTTCTCG TCC	-	Secuenciación	IPBLN
AE42	CCTTCTCTTCTTTTGGGTT CGTC	-	Secuenciación	IPBLN
AMB16	GCGGATCCAAGCTTGGAT TGGCCAGATGATGGC	BamHI/Hind III	Construcción RNAi (1) TbCDA-like	Metabion
AMB17	AACGGGCCCCGAGATTGT CACCACCAATGTCAGC	HpaI/ApaI	Construcción RNAi (1) TbCDA-like	Metabion
AMB21	GCGGATCCAAGCTTGGTG GTGACCTCGCTG	BamHI/Hind III	Construcción RNAi (2) TbCDA-like	Metabion
AMB19	AACGGGCCCTAAACCCC ATGTCGTCCC	HpaI/ApaI	Construcción RNAi (2) TbCDA-like	Metabion
AMB22	GCGGCCGCAACAGCATG GTGCCACTTTTAG	NotI	Clonaje 5'UTR TbCDA-like para KO	Metabion
AMB23	CTCGAGCAATCAGCTATG CAACTAAGTAG	XhoI	Clonaje 5'UTR TbCDA-like para KO	Metabion
AMB24	AGGCCTTTCGTTTGGAGC GGTAGATG	StuI	Clonaje 3'UTR TbCDA-like para KO	Metabion

AMB25	GCTAGCGCGGCCGCGTG GACACGCCCTCAG	NheI/NotI	Clonaje 3'UTR TbCDA-like para KO	Metabion
AMB26	GCAACGGCTGAGCACAA AGG	-	Comprobación RNAi TbCDA-like por RT- qPCR	Metabion
AMB27	GCCCGTATCTTTTCGCAC GC	-	Comprobación RNAi TbCDA-like por RT- qPCR	Metabion
VCA33	GCGCGATTGCTGATCCC CATGTGTATCAC	-	Comprobación líneas KO TbCDA-like	Metabion
VCA34	GTGATACACATGGGG ATCAGCAATCGCGC	-	Comprobación líneas KO TbCDA-like	Metabion
AMB32	CGTGTGTGCACAGACGAT GGAATGC	-	Comprobación líneas KO TbCDA-like	Metabion
AMB33	GAGAGGGGCAGAGGCGA GACAAGG	-	Comprobación líneas KO TbCDA-like	Metabion
AMB28	CCTAGGATGCCCCGTCCAT GCC	AvrII	Clonaje región N- terminal TbCDA-like en pNAT para KI	Metabion
AMB29	GGATCCGCCTTGCAAACA GAGC	BamHI	Clonaje región N- terminal TbCDA-like en pNAT para KI	Metabion
AMB30	AAGCTTTGGTGACCTCGC TGATGACG	HindIII	Clonaje región C- terminal TbCDA-like en pNAT para KI	Metabion
AMB31	TCTAGACTCATGAAGATC CGCCAC	XbaI	Clonaje región C- terminal TbCDA-like en pNAT para KI	Metabion
AMB34	GTTGACAGCCATCACAGT AGAACGC	-	Comprobación líneas C-terminal KI TbCDA-like	Metabion
AMB35	GCACACCCAGCGGCTCTC GATGCTC	-	Comprobación líneas C-terminal KI TbCDA-like	Metabion
AMB36	CCTCCTCTTCCCCCTCTTC CGG	-	Comprobación líneas N-terminal KI TbCDA-like	Metabion
AMB37	GCGTGAGAACTCAAACG AGAGGG	-	Comprobación líneas N-terminal KI TbCDA-like	Metabion
AMB12	GCCATATGCCCGTCCATG CCCATG	NdeI	Clonaje TbCDA-like en pET28a/pGRV23b	Metabion
AMB13	GCAAGCTTCTACTCATGA AGATCCGCC	HindIII	Clonaje TbCDA-like en pET28a	Metabion
AMB43	AGATCTCTACTCATGAAG ATCCGCC	BglIII	Clonaje TbCDA-like en pGRV23b	Metabion
AMB14	GGTCTGCTTACGAGCGA ATCATTG	-	Secuenciación región central TbCDA-like	Metabion
AMB15	CCACCTGCCGCATTGGAT CCTTCTTG	-	Secuenciación región central TbCDA-like	Metabion

Tabla C6. Oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de esta Tesis. Listado y descripción.

C.1.8. Plásmidos

Nombre	Vector	Inserto	Marcador de selección en <i>E. coli</i>	Marcador de selección en <i>T. brucei</i>	Uso
pGRV181	pGEM-T ^a	TbCDA ORF	Amp	-	Purificación y sobreexpresión de TbCDA
pGRV182	pET-28a ^b	TbCDA ORF	Kan	-	Expresión de TbCDA fusionada a un péptido de 6 histidinas
pGRV192	pGRV23b ^c	TbCDA ORF	Amp	Pur	Sobreexpresión de una copia ectópica de TbCDA en <i>T. brucei</i>
pGRV193a	pGEM-T ^a	TbCDA ORF sin codón de parada	Amp	-	Sobreexpresión de una copia ectópica de TbCDA fusionada a c-myc en <i>T. brucei</i>
pGRV193	pGRV33 ^d	TbCDA ORF sin codón de parada	Amp	Pur	Sobreexpresión de una copia ectópica de TbCDA fusionada a c-myc en <i>T. brucei</i>
pGRV183	pGR19 ^e	Fragmento del ORF de TbCDA	Amp	Hig	Generación de un sistema RNAi frente a TbCDA en <i>T. brucei</i>
pGRV184	pGR19 ^e	Fragmento del ORF de TbCDA (sentidos opuestos)	Amp	Hig	Generación de un sistema RNAi frente a TbCDA en <i>T. brucei</i>
pGRA1	pGEM-T ^a	Fragmento del ORF y 3'UTR de TbCDA	Amp	-	Generación de un segundo sistema de RNAi frente a TbCDA en <i>T. brucei</i>
pGRA2	pGR19 ^e	Fragmento del ORF y 3'UTR de TbCDA	Amp	Hig	Generación de un segundo sistema de RNAi frente a TbCDA en <i>T. brucei</i>
pGRA3	pGR19 ^e	Fragmento del ORF y 3'UTR de TbCDA (sentidos opuestos)	Amp	Hig	Generación de un segundo sistema de RNAi frente a TbCDA en <i>T. brucei</i>

pGRV23b +DCTD	pGRV23b ^c	HsDCTD ORF	Amp	Pur	Expresión de la DCTD humana en <i>T. brucei</i>
pGRA4	pGEM-T ^a	TbCDA-like ORF	Amp	-	Purificación de TbCDA-like
pGRA5	pET-28a ^b	TbCDA-like ORF	Kan	-	Expresión de TbCDA-like fusionada a un péptido de 6 histidinas
pGRA6	pGEM-T ^a	Fragmento del ORF de TbCDA-like	Amp	-	Generación de un sistema RNAi frente a TbCDA-like en <i>T. brucei</i>
pGRA7	pGR19 ^e	Fragmento del ORF de TbCDA-like	Amp	Hig	Generación de un sistema RNAi frente a TbCDA-like en <i>T. brucei</i>
pGRA8	pGR19 ^e	Fragmento del ORF de TbCDA-like (sentidos opuestos)	Amp	Hig	Generación de un sistema RNAi frente a TbCDA-like en <i>T. brucei</i>
pGRA10	pGR19 ^e	Fragmento del ORF de TbCDA-like	Amp	Hig	Generación de un segundo sistema de RNAi frente a TbCDA-like en <i>T. brucei</i>
pGRA11	pGR19 ^e	Fragmento del ORF de TbCDA-like (sentidos opuestos)	Amp	Hig	Generación de un segundo sistema de RNAi frente a TbCDA-like en <i>T. brucei</i>
pGRA12a	pGEM-T ^a	TbCDA-like ORF	Amp	-	Sobreexpresión de una copia ectópica de TbCDA-like fusionada a c-myc en <i>T. brucei</i>
pGRA12	pGRV23b ^c	TbCDA-like ORF	Amp	Pur	Sobreexpresión de una copia ectópica de TbCDA fusionada a c-myc en <i>T. brucei</i>
pGRA13	pGEM-T ^a	Fragmento de la 5'UTR de TbCDA-like	Amp	-	Generación de un KO de TbCDA-like
pGRA14	pGEM-T ^a	Fragmento de la 3'UTR de TbCDA-like	Amp	-	Generación de un KO de TbCDA-like
pGRA15	pHD887 ^f	Gen de resistencia a higromicina	Amp	Hig	Generación de un KO de TbCDA-like
pGRA16	pHD887 ^f	Fragmento de la 5'UTR de TbCDA-like	Amp	Hig	Generación de un KO de TbCDA-like

pGRA17	pHD887 ^f	Fragmento de la 3' y 5' UTR de TbCDA-like	Amp	Hig	Generación de un KO de TbCDA-like
pGRA22	pHD887 ^f	Fragmento de la 3' y 5' UTR de TbCDA-like /resistencia a blasticidina	Amp	Bla	Generación de un KO de TbCDA-like
pGRA18	pGEM-T ^a	Fragmento del 5'ORF de TbCDA-like	Amp	-	Generación de un KI de TbCDA-like
pGRA19	pGEM-T ^a	Fragmento del 3'ORF de TbCDA-like	Amp	-	Generación de un KI de TbCDA-like
pGRA20	^g pNAT ^{x12MYC}	Fragmento del 3'ORF de TbCDA-like	Amp	Bla	Generación de un KI de TbCDA-like con 12 c-myc en el extremo C-terminal
pGRA21	^g pNAT ^{6MYC}	Fragmento del 5'ORF de TbCDA-like	Amp	Bla	Generación de un KI de TbCDA-like con 6 c-myc en el extremo N-terminal

^aPromega

^bNovagen

^c(Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2012)

^d(Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2012)

^eCedido por Christine Clayton (Clayton, Estevez et al. 2005)

^fCedido por Christine Clayton (Helfert, Estevez et al. 2001)

^gCedido por David Horn (Alsford y Horn 2008)

Tabla C7. Plásmidos generados durante el desarrollo de esta Tesis. Listado y descripción.

C.1.9. Software y bases de datos

C.1.9.1. Programas informáticos

- *Adobe Photoshop*[®] CS3 version 10.0.
- *Biorender*[®] 2019.
- *CaryWin UV Software*.
- *Cell-R IX-81 Software*.
- *EndNote X7*.
- *FIJI/ImageJ* (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012).
- *FlowJo* (version 7.6).

- *Gene Construction kit*[®] version 1.03.1.
- *GraphPad Prism 5 Software*.
- *Huygens Essential Software* (versión 3.3; Scientific Volume Imaging).
- *IBM SPSS*[®] *Statistics* (versión 25).
- *Imaris software* (Bitplane, Scientific Software).
- *JACOP ImageJ plugin* (Bolte y Cordelieres 2006).
- *Jalview Desktop*.
- *Microsoft Office 2007 y 2010* (*Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft Power Point*).
- *Google Chrome y Mozilla Firefox*.
- *Oligonucleotide Properties Calculator*, Northwestern University Medical School.

C.1.9.2. Bases de datos

- *EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk/>).
- *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>).
- *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- *PDB (Protein Data Bank)* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/>).
- *TrypTag* (<http://tryptag.org/>).
- *TriTrypDB* (<http://tritypdb.org/tritypdb/>).
- *UniProt (Universal Protein Resource)* (<http://www.uniprot.org/>).
- *Pfam (The protein families database)* (<http://pfam.xfam.org/>).

C.1.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se llevó a cabo el cálculo de la medias y las desviaciones estándar para posteriormente aplicar el test de la t de Student para la comparación de medias procedentes de dos muestras independientes una vez comprobada la normalidad de los datos y la igualdad de varianzas mediante el test de Levene. En caso de no cumplirse alguna de las premisas anteriores (normalidad e

igualdad de varianzas), se recurrió a la comparación de medianas mediante el test de Mann-Whitney o a la comparación de frecuencias de distribución mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para comparar medias procedentes de más de dos muestras independientes, se recurrió al test ANOVA de análisis de la varianza aplicando la comparación *post-hoc* de Bonferroni, previa comprobación de la normalidad de los datos y la igualdad de varianzas. En caso de tratar con datos que no se distribuyen según una distribución normal, o cuyas varianzas no son iguales, se recurrió al test de Kruskal-Wallis.

Para la realización de los cálculos se empleó el software *GraphPad Prism 5* o el *IBM SPSS® Statistics*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

C.2. MÉTODOS

C.2.1. Cultivo y manipulación de *Trypanosoma brucei*

C.2.1.1. Cultivo de *Trypanosoma brucei*

Para los estudios *in vitro*, se utilizaron tripomastigotes tanto de la forma sanguínea como procíclica. En el primer caso, se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ en medio HMI-9 o medio HMI-9 sin timidina en el caso de los experimentos con medio libre de pirimidinas, suplementado con un 10% de SBF. El mantenimiento de los cultivos se realizó mediante dilución de los mismos a unos 5×10^3 parásitos/ml cada 48 horas, cuando se encontraban a una densidad aproximada de $1,5 \times 10^6$ parásitos/ml, para mantenerlos en fase logarítmica. Se emplearon frascos de cultivo estériles con aireación de 25, 75 y 125 cm³, así como placas de diversos formatos (NUNC).

Los tripomastigotes procíclicos se cultivaron a 28°C en medio SDM-79 suplementado con un 10% de SBF y hemina 0,01 mM. Los parásitos se diluyeron cada 48 horas, cuando se encontraban aproximadamente a 10^7 parásitos/ml, a unos $1,5-2 \times 10^5$ parásitos/ml para mantenerlos en fase logarítmica. Se emplearon frascos de cultivo estériles sin aireación de 25, 75 y 125 cm³ y placas de diversos formatos (NUNC).

En ambos casos la densidad celular se determinó con un contador de partículas Z2 de Beckman Coulter™.

C.2.1.2. Criopreservación y descongelación

Para la congelación de las células, 15×10^6 parásitos de la forma sanguínea o 25×10^6 parásitos de la forma procíclica se centrifugaron a 1400g durante 10 minutos y los pellet fueron resuspendidos en 0,25 ml de medio con 10% de glicerol en viales de congelación de 2 ml, que se congelaron de forma gradual en recipientes con isopropanol a -80°C , para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido durante largos periodos de tiempo.

Para poner en marcha cultivos a partir de células congeladas, los viales se descongelaron introduciéndolos en un baño a 37°C y posteriormente el contenido del vial se traspasó a un frasco de cultivo con medio fresco.

C.2.1.3. Transfección y generación de líneas celulares

C.2.1.3.1. Transfección estable mediante electroporación

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas. En el caso de *T. brucei*, la transfección se realiza mediante electroporación tanto en la forma sanguínea como procíclica (Biebinger, Wirtz et al. 1997, Wirtz, Leal et al. 1999) y dependiendo del diseño del plásmido, podrá producirse la integración del mismo (previamente linearizado) en la región espaciadora del ADN ribosomal (ADNr), que no está sujeta a transcripción, o la recombinación homóloga en un locus concreto del genoma para la obtención de líneas *knock-out* (KO) o *knock-in* (KI). En todos los casos, el ADN fue purificado mediante el kit NucleoSpin® plasmid (Macherey-Nagel) y se digirió con las enzimas de restricción adecuadas. A continuación se precipitó con etanol y se resuspendió en agua estéril a 1 mg/ml de concentración aproximadamente.

Para la transfección de los tripomastigotes sanguíneos, se recogieron por centrifugación (1400g, 10 minutos y temperatura ambiente (RT)) 24×10^6 parásitos de un cultivo en fase logarítmica y el pellet se lavó dos veces con el tampón Cytomix (Tabla C2) centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente el pellet fue resuspendido de nuevo en Cytomix a una concentración de 6×10^7 parásitos/ml y se añadieron 10 μg del ADN a transfectar. La mezcla de ADN y parásitos se transfirió a una cubeta de electroporación Gene Pulser® Cuvette, 4 mm gap (Bio-Rad) para a continuación, mediante el empleo de un electroporador ECM 630 de BTX configurado con los siguientes parámetros: 1,7 KV, 25 Ω y 25 μF , proceder a la electroporación. Tras ello, las células fueron transferidas a un frasco de cultivo con 12 ml de medio fresco para finalmente transferir el contenido del frasco a una placa de 24 pocillos (0,5 ml por pocillo) y permitir la recuperación de las células a 37°C y 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió a la selección de los transfectantes mediante la adición de 1 ml de medio con los antibióticos adecuados, a cada pocillo de la placa.

En el caso de los tripomastigotes procíclicos, se recogieron por centrifugación (1400g, 10 minutos y 4°C) 20×10^6 parásitos a partir de un cultivo en fase logarítmica y el pellet se lavó dos veces con el tampón ZPFM (Tabla C2) previamente enfriado y centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente el pellet fue resuspendido de nuevo en ZPFM frío a una concentración de 4×10^7 parásitos/ml y se añadieron 10 μg del ADN a transfectar. La mezcla de ADN y parásitos se transfirió a una cubeta de electroporación Disposable Cuvettes Plus™, 2 mm gap (BTX) y se incubó 5 minutos en hielo. Seguidamente, mediante el empleo de un electroporador ECM 630 de BTX configurado con los siguientes parámetros: 1,6 KV, 25 Ω y 25 μF , se procedió a la electroporación. Tras ello, las células fueron transferidas a un frasco de cultivo con 12 ml de medio fresco para permitir la recuperación de las mismas a 28°C durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió a la selección de los transfectantes repartiendo los 12 ml de cultivo entre los pocillos de la primera fila de dos placas de 24 pocillos (0,5 ml por pocillo) y añadiendo 1 ml de medio condicionado (obtenido por filtración a partir de un cultivo en el que los parásitos han crecido a $7-9 \times 10^6$ parásitos/ml) con los antibióticos de selección apropiados al resto de pocillos de las dos placas. Finalmente se realizaron diluciones 1:2 en cada columna hasta llegar a la última fila.

C.2.1.3.2. Generación de líneas celulares de *Trypanosoma brucei*

Se ha proporcionado información general sobre todas las líneas celulares generadas en esta tesis a partir de las líneas parentales *Tb* BF y *Tb* PF en la tabla C1, así como el listado y breve descripción de los oligonucleótidos y plásmidos empleados en las tablas C6 y C7, respectivamente. A continuación se procederá a describir más en detalle el proceso de obtención de las diversas líneas celulares empleadas en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Líneas *Tb* BF CDA-RNAi, *Tb* BF CDA-RNAi(2), *Tb* PF CDA-like-RNAi y *Tb* PF CDA-like RNAi(2). Con la intención de reducir la expresión de *TbCDA* y *TbCDA-like* se empleó la estrategia de generar un ARN de interferencia con una estructura de tallo-lazo. Para ello, el fragmento amplificado por PCR en cada caso se clonó en el vector pGR19 (Clayton, Estevez et al. 2005) en sentidos opuestos y separados por una región de ADN llamada *stuffer* que permite la generación de esa estructura tallo-lazo. En el caso de las líneas *Tb* BF CDA-RNAi y *Tb* PF CDA-like-RNAi(2) se emplearon los oligonucleótidos VCA167 – VCA168 para amplificar un fragmento de 392 bp de la secuencia codificante de *TbCDA* comprendida entre las posiciones 123 y 515 del gen y AMB19 – AMB21 para amplificar un fragmento de 503 bp localizado entre las posiciones 1229 y 1732 de la secuencia codificante de *TbCDA-like*. El producto de PCR se digirió primero con las enzimas de restricción *ApaI* y *HindIII* y se clonó en pGR19 dando lugar a los plásmidos pGRV183 (*TbCDA*) y pGRA10 (*TbCDA-like*), que tras el clonaje en sentido opuesto del mismo producto de PCR previamente digerido con *HpaI* y *BamHI*, darían lugar a los plásmido pGRV184 (*TbCDA*) y pGRA11 (*TbCDA-like*) que se linearizaron con *NotI* para transfectar las líneas parentales de *T. brucei*. Para *Tb* BF CDA-RNAi(2) y *Tb* PF CDA-like-RNAi los oligonucleótidos AMB1 – AMB2 y AMB16 – AMB17 permitieron la amplificación de un fragmento de 489 bp comprendido entre la posición 316 de la secuencia del gen *TbCDA* y 256 de su 3'UTR (región no traducida o *untranslated region*) y un fragmento de 518 bp comprendido entre las posiciones 184 y 702 de la secuencia codificante del gen *TbCDA-like* respectivamente, que fueron clonados en pGEM-T para dar lugar a pGRA1 (*TbCDA*) y pGRA6 (*TbCDA-like*) que fueron digeridos con *ApaI* y *HindIII* para liberar los fragmentos que se clonaron en pGR19 obteniéndose los plásmidos pGRA2 (*TbCDA*) y pGRA7 (*TbCDA-like*). Finalmente pGRA1 y pGRA6 fueron digeridos con *HpaI* y

BamHI y los fragmentos liberados se clonaron en pGRA2 y pGRA7 en sentido opuesto generándose así pGRA3 (TbCDA) y pGRA8 (TbCDA-like) que fueron linearizados con NotI para transfectar *Tb* BF y *Tb* PF.

Líneas *Tb* BF/PF CDA-OE, *Tb* PF CDA-c-myc, *Tb* PF CDA-like-OE. Con el objetivo de realizar diversos estudios de localización intracelular y viabilidad celular en condiciones de altos niveles de expresión de TbCDA y TbCDA-like, se generaron líneas que sobreexpresan la proteína nativa o una proteína de fusión a c-myc. Para la obtención de las líneas *Tb* BF/PF CDA-OE la secuencia codificante de *TbCDA* fue amplificada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos VCA165 – VCA166 y dicho fragmento se clonó en pGEM-T generándose el plásmido pGRV181, que fue digerido con NdeI y BamHI y el fragmento liberado, clonado en pGRV23b (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2012) obteniéndose pGRV192 que fue linearizado con NotI y transfectado en *Tb* BF y *Tb* PF. Para la expresión de una copia ectópica de TbCDA fusionada a c-myc, se emplearon los oligonucleótidos VCA165 – VCA179b que permitieron amplificar la secuencia codificante de *TbCDA* sin codón de parada y su posterior clonaje en pGEM-T para dar lugar al plásmido pGRV193a, que fue sometido a digestión con las enzimas de restricción NdeI y HpaI de manera que el inserto liberado fue finalmente clonado en pGRV33 (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2012) obteniéndose así el plásmido pGRV193, que permite la expresión de una copia ectópica de la proteína fusionada a c-myc en el extremo C-terminal. pGRV193 fue finalmente digerido con NotI y transfectado en la forma procíclica de *T. brucei* para obtener la línea *Tb* PF CDA-c-myc. Finalmente, para la generación de la línea *Tb* PF CDA-like-OE, se emplearon los oligonucleótidos AMB12 – AMB43 para amplificar la secuencia codificante de *TbCDA-like* que posteriormente fue clonada en pGEM-T generándose así el plásmido pGRA12a, de modo que el inserto liberado tras digerir con NdeI y BglIII fue clonado en pGRV23b (tras un paso previo en el que se había clonado c-myc en dicho vector) obteniéndose el plásmido pGRA12 que permite la expresión de TbCDA-like fusionada a c-myc en su extremo N-terminal.

Línea *Tb* BF *DUT-KO+DCTD*. Con el objetivo de comprobar si la expresión de la DCTD humana era capaz de revertir el fenotipo del *knock-out* de la *TbdUTPasa* en la forma sanguínea de *T. brucei*, se llevó a cabo la síntesis de ADNc a partir de ARN total procedente de células HeLa para proceder a la amplificación por PCR de la secuencia codificante correspondiente a *HsDCTD*. El producto de PCR fue digerido con NdeI y

BamHI y clonado en pGRV23b (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2012) obteniéndose el plásmido pGRV23b+DCTD que fue linearizado con NotI y empleado para transfectar la línea *Tb* BF *DUT*-KO (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013) obteniéndose así la línea *Tb* BF *DUT*-KO+DCTD.

Líneas *Tb* PF *CDA-like* N-ter KI y *Tb* PF *CDA-like* C-ter KI. Con la intención de realizar estudios de localización intracelular e interacción de TbCDA-like con ARN se obtuvieron 2 líneas *knock-in* (KI) para TbCDA-like que expresan la proteína fusionada a 6 c-mycs en el extremo N-terminal de la secuencia o fusionada a 12 c-mycs en el extremo C-terminal de la secuencia, desde el propio locus endógeno. Para *Tb* PF *CDA-like* N-ter KI se emplearon los oligos AMB28 – AMB29 para amplificar un fragmento de 432 bp de la región N-terminal de la secuencia codificante de TbCDA-like (desde la posición 1 hasta la 420). Dicho fragmento se clonó en pGEMT para obtener el plásmido pGRA18, el cual fue digerido con AvrII y BamHI para liberar el fragmento de TbCDA-like que fue finalmente clonado en el plásmido pNAT (Alsford y Horn 2008) para expresar la proteína fusionada a 6 c-mycs en el extremo N-terminal desde el locus endógeno, obteniéndose de este modo el plásmido pGRA21 que fue linearizado mediante digestión con KpnI para la posterior transfección de las formas procíclicas de *T. brucei*. En el caso de la línea *Tb* PF *CDA-like* C-ter KI se emplearon los oligos AMB30 – AMB31 para amplificar un fragmento de 536 bp de la región C-terminal de la secuencia codificante de TbCDA-like (posiciones 1241 hasta 1764) y clonarlo en pGEMT para obtener el plásmido pGRA19. Se emplearon las enzimas de restricción HindIII y XbaI para digerir pGRA19 y el fragmento liberado se clonó en pNAT (Alsford y Horn 2008) para expresar la proteína fusionada a 12 c-mycs en el extremo C-terminal de la secuencia. Se obtuvo así el plásmido pGRA20 que fue digerido con BlnI y empleado para transfectar los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*.

Líneas *Tb* BF/PF *CDA-like*-sKO. Los oligos AMB22 – AMB23 se usaron para amplificar un fragmento de 461 bp de la 5'UTR del gen *TbCDA-like* que se clonó en pGEMT para obtener el plásmido pGRA13. Posteriormente, se utilizaron las enzimas de restricción NotI y XhoI para liberar el fragmento de la 5'UTR y clonarlo en el plásmido pGRA15 (que a su vez procede de cambiar el gen de resistencia de blasticidina por el de higromicina en pHD887 (Helfert, Estevez et al. 2001)) y obteniéndose pGRA16. Por otra parte, se amplificó por PCR un fragmento de 454 bp de la 3'UTR del gen *TbCDA-like* utilizando los oligos AMB24 – AMB25 y se clonó en pGEMT para obtener el

plásmido pGRA14, que fue digerido con *StuI* y *NheI* para liberar el fragmento de la 3'UTR que finalmente se clonó en pGRA16 para generar pGRA17. Por último pGRA17 se digirió con *NotI* para liberar el *cassette* con los fragmentos de la 5'UTR y 3'UTR de *TbCDA-like* flanqueando el gel de resistencia a higromicina y se transfectaron las líneas *Tb BF* y *Tb PF*.

C.2.2. Purificación y caracterización *in vitro* de dos citidina desaminasas recombinantes de *T. brucei*

C.2.2.1. Construcción de plásmidos

Para purificar TbCDA se empleó la estrategia de expresar la proteína fusionada a una cola de histidinas (His-TbCDA). Se llevó a cabo la amplificación por PCR de la secuencia codificante de *TbCDA* con los oligonucleótidos VCA165 – VCA166 y se clonó en pGEM-T para obtener el plásmido pGRV181, que posteriormente fue digerido con *NdeI* y *BamHI* y el inserto liberado se clonó en pET-28a obteniéndose el plásmido pGRV182 que permitió la expresión de la proteína de fusión en *E. coli* BL21(DE3).

En el caso de TbCDA-like se siguió la misma estrategia y se emplearon los oligos AMB12 – AMB13 para amplificar la secuencia codificante de *TbCDA-like* a partir del ADN genómico de tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* 427. El producto de PCR se clonó en pGEMT para dar lugar al plásmido pGRA4, que posteriormente fue digerido con *HindIII* y *NdeI* para liberar el fragmento con la secuencia codificante para TbCDA-like y éste se clonó en pET28a para obtener pGRA5. Finalmente *E. coli* BL21(DE3) se transformó con pGRA5 para expresar TbCDA-like fusionada a una cola de histidinas en el extremo N-terminal (His-TbCDA-like).

C.2.2.2. Expresión de His-TbCDA y His-TbCDA-like

Para la purificación de His-TbCDA, la expresión a 37°C durante 4 horas en bacterias *E. coli* BL21(DE3) fueron las condiciones seleccionadas. En primer lugar, se

creció una colonia de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pGRV182 en 10 ml de medio LB con kanamicina 50µg/ml a 37°C y en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se utilizó este cultivo para inocular otro de 50 ml que se dejó crecer hasta que las bacterias alcanzaron una densidad óptica de 0,6 a 600nm de longitud de onda. En ese momento, se inoculó un cultivo de 2 L de LB con kanamicina (dilución 1:50) y cuando las bacterias alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6 se procedió a inducir la expresión de His-TbCDA mediante la adición al medio de IPTG a 1 mM (concentración final) y el cultivo se mantuvo en agitación a 37°C durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron centrifugando a 8000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el pellet de bacterias se almacenó a -80°C.

En el caso de His-TbCDA-like no fue posible obtener proteína en fracción soluble pero en cualquier caso procedemos a describir el procedimiento seguido para inducir su expresión para la posterior purificación en condiciones desnaturalizantes para la obtención de un anticuerpo policlonal. Concretamente, se creció una colonia de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pGRA5 en 100 ml de medio LB con kanamicina 50µg/ml a 37°C y en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se inoculó en un volumen final de 2 L de LB con kanamicina (50µg/ml) y se midió la DO₆₀₀ hasta que el cultivo alcanzó un valor de 0,6, momento en el que se adiciona IPTG a una concentración final de 1 mM. Transcurridas 5 horas en agitación a 37°C se recogieron las células mediante centrifugación durante 15 minutos a 8000 rpm y 4°C. El pellet de bacterias se almacenó a -80°C.

C.2.2.3. Purificación de His-TbCDA recombinante

El pellet de bacterias obtenido tras inducir la expresión de His-TbCDA (apartado C.2.2.2.), fue resuspendido en 20 ml de tampón FPLC-A (Tabla C2), sonificado 8 veces durante 30 segundos con ciclos del 50% y sometido a 30 minutos de centrifugación a 13000 rpm y 4°C. El sobrenadante filtrado se cargó en el sistema de FPLC (Pharmacia) donde previamente se había acoplado una columna HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) cargada con Ni²⁺ y equilibrada con tampón FPLC-A (Tabla C2). Para la elución de His-TbCDA se empleó un gradiente lineal de tampón FPLC-B (Tabla C2). Las distintas fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE para

combinar aquellas con mayor concentración de proteína que se pasaron por una columna PD10 (GE Healthcare) para cambiar el tampón en el que se encontraban por tampón de almacenamiento (TbCDA) (Tabla C2) y guardar la proteína purificada en alícuotas a -80°C.

C.2.2.4. Caracterización enzimática de His-TbCDA

La determinación de la actividad citidina desaminasa se llevó a cabo mediante un ensayo descrito previamente (Vincenzetti, Cambi et al. 1996) y basado en la medida del descenso de absorbancia que se produce a 282 nm, como consecuencia de la desaminación del anillo de citosina.

Concretamente, una concentración de 0,125 μ M de TbCDA fue incubada en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) DTT 1mM (Tabla C2) con diferentes concentraciones de los distintos sustratos ensayados: citidina, desoxicitidina y 5-metil-2'-desoxicitidina, en un volumen final de 1 ml, empleando un sistema de “stopped flow” (Hi-Tech Scientific), acoplado a un espectrofotómetro (Cary 50). El cálculo de los diferentes parámetros cinéticos se realizó a partir de las medidas de Δ DO/min obtenidas experimentalmente para cada una de las concentraciones de sustrato ensayadas.

C.2.3. Estudios celulares a partir de *T. brucei* para la caracterización de la citidina desaminasa-like

C.2.3.1. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS) y tinción con DAPI

El análisis del ciclo celular por citometría de flujo se llevó a cabo en las líneas *Tb* PF, *Tb* PF CDA-like-RNAi y *Tb* PF CDA-like-OE empleando yoduro de propidio para el marcaje del ADN celular. Tras la inducción del RNAi o la sobreexpresión mediante la adición de doxiciclina (DOX) 1 μ g/ml, se tomaron muestras cada 48 horas durante 6 días. En cada caso, se recogieron 1×10^7 células centrifugando 10 minutos a 1000g y 4°C

y se lavó el pellet dos veces con 5 ml de PBS 1X. Finalmente, se fijaron los parásitos durante toda la noche a -20°C en una solución de etanol 70% y PBS 1X 30%. Al día siguiente, los parásitos se volvieron a recoger por centrifugación a 1000g y 4°C durante 10 minutos y se volvieron a lavar dos veces con PBS 1X. Tras los lavados, se resuspendió el pellet en 0,5 ml de PBS 1X y se incubó 30 minutos a 37°C con yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ y RNasa A (Sigma-Aldrich) $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$. La medición de las muestras se realizó con un citómetro FACScaliburTM (Becton Dickinson). Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el software FlowJo (Tree Star Inc.).

Complementariamente, se realizó también el estudio del ciclo celular en las líneas *Tb* PF, *Tb* PF CDA-like-RNAi y *Tb* PF CDA-like-OE mediante tinción con DAPI para analizar el número y morfología de núcleos y kinetoplastos por microscopía de fluorescencia (al menos 100 células por condición). De nuevo se tomaron muestras cada 48 horas durante los 6 días siguientes a la inducción del RNAi o la sobreexpresión mediante la adición de DOX $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ al medio. En cada caso, se recogieron 1×10^6 parásitos y se fijaron durante 20 minutos, sobre portas previamente tratados con Poli-L-lisina, con p-formaldehído 4% en PBS 1X. Las muestras se lavaron dos veces con solución de lavado (PBS-Tween[®] 20 0,2%) y se deshidrataron con metanol durante 1 minuto. Finalmente se procedió al montaje utilizando ProLongTM Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen). Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio Zeiss Axio Imager A1 y para el análisis se empleó el software Fiji (versión 1.5e; ImageJ) (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012).

C.2.3.2. Análisis metabolómico

Los estudios metabolómicos fueron realizados por Metabolon Inc. sobre la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi tras 6 días de inducción con DOX respecto a la línea parental de tripomastigotes procíclicos. Se analizaron 4 réplicas biológicas diferentes y, en cada caso, se recogieron 1×10^9 células que se lavaron con medio fresco sin SBF a 1400g y 4°C . Los pellet se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

Las muestras se enviaron a Metabolon Inc., donde identificaron 565 metabolitos diferentes. Brevemente, las muestras se prepararon según el sistema de MicroLab

STAR[®] y se analizaron mediante diversos métodos de espectrometría de masas, concretamente: cromatografía líquida de fase reversa y ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem ((RP)/UPLC-MS/MS) con ionización por electrospray (ESI) en modo de polarización positivo o negativo y cromatografía de interacción hidrofílica de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HILIC/UPLC-MS/MS) con ESI en modo de polarización negativo.

C.2.3.3. Cuantificación de los niveles de ribonucleótidos intracelulares

La determinación de los ribonucleótidos trifosfato (rNTPs) se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico en un sistema HPLC (Pharmacia). Se recogieron 1×10^8 células para cada condición: *Tb* PF, *Tb* PF CDA-like-RNAi (sin inducir y tras 2 días de inducción con DOX) y *Tb* PF CDA-like-OE (sin inducir y tras 2 días de inducción con DOX). Tras lavar con PBS 1X se resuspendió el pellet en 125 μ l de agua a 4°C y se añadieron 125 μ l de ácido perclórico 0,4 N. Se incubaron 5 min en hielo y se centrifugaron 10 minutos a 16000g y 4°C. Finalmente se tomaron 125 μ l del sobrenadante a los que se adicionaron 125 μ l de tampón fosfato amónico 0,5 M pH 3,4 y se cargó la muestra en una columna Partisphere 5 μ m SAX (Hichrom). La separación de los diferentes rNTPs tuvo lugar en condiciones isocráticas de elución con tampón fosfato amónico 0,5 M pH 3,4. Para la cuantificación de los nucleótidos se cargaron soluciones de concentración conocida de cada rNTP y se realizó una recta patrón para cada uno de ellos.

C.2.3.4. Determinación de la actividad de unión a ARN mediante *Orthogonal Organic Phase Separation* (OOPS)

Para determinar si TbCDA-like presenta actividad de unión a ARN se empleó la técnica de OOPS (*Orthogonal Organic Phase Separation*) basada en el método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo para la extracción de ARN (Queiroz, Smith et al. 2019). Para cada muestra, se recogieron 2×10^8 células y se lavaron 2 veces con PBS

1X durante 10 minutos a 1400g y 4°C. A continuación el pellet se resuspendió en 400 µl de PBS 1X de los cuales 200 µl se almacenaron como control y los otros 200 µl se sometieron a cross-link con luz UV a 254 nm (800 mJ/cm²). Tras centrifugar las muestras se resuspendió el pellet en 1 ml de TRIzol y se incubó 5 minutos a RT, tras lo cual, se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezclaron por inversión y se centrifugaron 10 minutos a 12000g y 4°C. Una vez separadas las diferentes fases (orgánica, acuosa e interfase), se guardaron 100 µl de la fase orgánica de cada muestra como control. Por otra parte, las interfases se sometieron a 2 extracciones adicionales con TRIzol y cloroformo. Tanto la fase orgánica como la interfase se sometieron a precipitación con 9 volúmenes de metanol durante 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 16000g y 4°C.

El pellet de las muestras procedentes de la fase orgánica se resuspendió en 40 µl de tampón de carga para proteínas (Tabla C2). Por otro lado, los pellet procedentes de la interfase se resuspendieron en 100 µl de tampón de digestión con RNasa A (Tabla C2), se incubaron 15 minutos a 95°C. A continuación las muestras se dejaron enfriar, se adicionaron 5 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubaron 3 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se procedió a la extracción de las proteínas presentes en la interfase con metanol y se prepararon las muestras para SDS-PAGE.

Por otra parte, para demostrar que la presencia de TbCDA-like en la interfase se debe a su interacción con ARN, tras la digestión de 3 horas con RNasa A se adicionaron otros 5 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incuban durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se adicionan 500 µl de TRIzol y 100 µl de cloroformo, se centrifuga 10 minutos a 12000g y 4°C y finalmente, tanto la interfase como la fase orgánica se someten a precipitación con metanol y se preparan las muestras para SDS-PAGE.

C.2.3.5. Análisis de la expresión génica mediante NGS (*Next-generation transcriptome sequencing*) RNA-seq

La preparación de las librerías y la secuenciación Illumina se llevó a cabo por parte de la unidad de genómica del IPBLN. Brevemente, se extrajo ARN total procedente de la línea parental de tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* así como de

las líneas *Tb* PF CDA-like-RNAi y *Tb* PF CDA-like-OE tras 2 días de inducción del RNAi o la sobreexpresión respectivamente, mediante el kit RNeasy Mini Kit (QUIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se determinó mediante Bioanalyzer RNA 6000 Nano chip electrophoresis (Agilent Technologies). La construcción de librerías de PolyA se realizó de acuerdo al Truseq® stranded RNA kit (Illumina) empleando 100 ng de ARN total para cada muestra. La calidad y la distribución de tamaños de las librerías se validó mediante el Bioanalyzer High Sensitivity assay (Agilent Technologies) y la concentración se midió con un fluorímetro Qubit®. Las librerías finales se diluyeron y desnaturalizaron de acuerdo con las recomendaciones de la guía Illumina NextSeq 500 library preparation. Las librerías se secuenciaron por ambos extremos generando fragmentos de 75 bp mediante el empleo de un secuenciador NextSeq 500 en configuración High Output (150 ciclos) obteniéndose una media de 38,33 millones de lecturas por muestra.

El análisis transcriptómico se llevó a cabo por parte de la unidad de bioinformática del IPBLN mediante el protocolo miARma-Seq (Andres-Leon, Nunez-Torres et al. 2016). En primer lugar, los archivos de fastq se analizaron mediante el software FastQC (Andrews 2010) para determinar los posibles errores de secuenciación y determinar los indicadores de calidad. Posteriormente, las lecturas obtenidas se alinearon con el genoma de referencia (*Trypanosoma brucei* (427) TriTrypDB versión 49 del 2018) mediante homología de secuencia a través del software HISAT2 (Kim, Langmead et al. 2015). Así pues, las lecturas se asociaron a los diferentes genes obteniéndose los valores sin normalizar para cada gen.

Para el análisis de la expresión diferencial se utilizó el paquete de edgeR (Nikolayeva y Robinson 2014). Los genes con bajo nivel de expresión fueron eliminados y los restantes se normalizaron con el método TMM (*trimmed of M-values*) (Robinson y Oshlack 2010). Se calcularon las RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas), las CPM (cuentas por millón) y las log₂-CPM (logaritmo en base 2 de las CPM) para cada gen en cada muestra. Los genes diferencialmente expresados (DEG) se determinaron comparando las 3 réplicas de cada condición eliminando el efecto de la DOX. Así pues, todos los genes con un FDR < 0,01 (*false discovery rate*) se consideraron DEG y los valores de log₂FC se emplearon para evaluar la significancia del cambio en la expresión de cada gen en las diferentes muestras.

C.2.4. Técnicas inmunológicas

C.2.4.1. Obtención y purificación de anticuerpos policlonales

C.2.4.1.1. Obtención y purificación de anti-TbCDA

Para la obtención de un anticuerpo policlonal frente a TbCDA se inmunizó un conejo de la cepa *New Zealand White* con TbCDA recombinante purificada (Material y métodos C.2.2.3.). Para la primera inmunización se inyectó una emulsión (v/v) con unos 400 µg de proteína en 0,5 ml de PBS 1X y Adyuvante Completo de Freund (Sigma) (ratio 1:1). La segunda y tercera inmunización se realizaron a intervalos de dos semanas, mientras que la cuarta se realizó un mes más tarde, inyectando en cada caso una emulsión con 0,5 ml de proteína purificada en PBS 1X y Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma) (ratio 1:1 en v/v). Extracciones de sangre (≈20 ml) fueron realizadas una semana después de cada inmunización a excepción de la cuarta inmunización tras la cual se procedió a desangrar al animal para obtener alrededor de 75 ml de sangre.

Para separar el suero se incubó la sangre a temperatura ambiente durante 2 horas y después 20 minutos a 37°C. Finalmente se incubó 4 horas a 4°C y se centrifugó 10 minutos a 2500g. El sobrenadante obtenido se almacenó en alícuotas con azida sódica 0,02% a 4°C y -80°C.

La purificación del anticuerpo anti-TbCDA se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad frente a la proteína purificada gracias al empleo de una resina Affi-gel 10 (Bio-Rad) que tiene capacidad para unir ligandos con aminas primarias. En primer lugar se lavó la resina 2 veces con 20 volúmenes de agua bidestilada y a continuación 2 veces con 20 volúmenes de tampón de adherencia (Tabla C2) para finalmente incubarla con 1,2 mg de proteína purificada en 3 ml de tampón de adherencia durante toda la noche a 4°C en el rotor orbital. Al día siguiente se centrifugó 1 minuto a 2000 rpm y se procedió a lavar la resina con 20 volúmenes de tampón de bloqueo (Tabla C2) centrifugando de nuevo. La resina se resuspendió en 2 ml de tampón de bloqueo y se incubó 1 hora a 4°C en el rotor orbital. Posteriormente la resina

se lavó 2 veces con 20 volúmenes de las siguientes soluciones: PBS 1X, tampón de elución (Tabla C2) y Tris-HCl 100 mM pH 8. Con la resina resuspendida en 1 ml de Tris-HCl 100 mM pH8, se transfirió a una columna Poly-Prep® Chromatography Column (Bio-Rad) y se lavó de nuevo con 20 volúmenes de esta misma solución en la que se encuentra la resina. A continuación se lavó la resina con 20 volúmenes de PBS-500 (Tabla C2) y después con 20 volúmenes de PBS 1X. Seguidamente se recircularon 2 veces 10 ml del suero y se lavó la resina con 20 volúmenes de PBS 1X, PBS-250 (Tabla C2) y PBS-500. Finalmente se procedió a la elución del anticuerpo circulando 5 volúmenes de tampón de elución (Tabla C2) y se ajustó el pH de las alícuotas obtenidas hasta aproximadamente 7,5 mediante la adición de Tris-HCl 1 M pH 9,5. Se adicionó azida sódica 0,02% para su conservación.

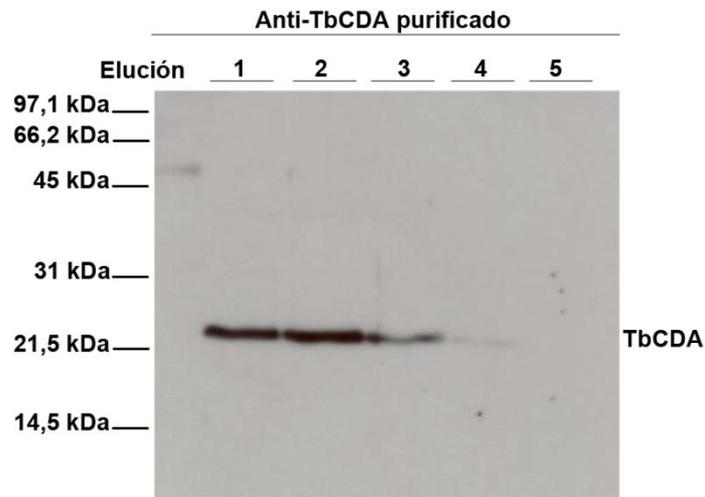


Figura C1. Chequeo del anticuerpo anti-TbCDA purificado. Se cargaron extractos de parásitos de la forma procíclica que sobreexpresan TbCDA (5×10^6 parásitos en cada carril) para chequear las 5 alícuotas obtenidas tras el proceso de purificación de anti-TbCDA. Se empleó una dilución 1:5000 de anti-TbCDA. TbCDA: 21 kDa.

C.2.4.1.2. Obtención y purificación de anti-TbCDA-like

El pellet de bacterias obtenido tras inducir la expresión de His-TbCDA-like (Material y métodos C.2.2.2.), se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis (Tabla C2) y se sonicó 4 veces durante 40 segundos con ciclos del 50%. El extracto al completo se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con Ni Sepharose™ High Performance

affinity media (GE Healthcare), una resina cargada con iones níquel divalentes que permite llevar a cabo cromatografía de afinidad para purificar proteínas fusionadas a histidina, previamente equilibrada con tampón de lisis. Posteriormente la resina se lavó con tampón de lisis y tampón de lavado (Tabla C2) y se procedió a la elución de la proteína mediante el empleo de altas concentraciones de imidazol (tampón de elución, Tabla C2). Las distintas fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y la concentración de proteínas cuantificada mediante el método de Bradford.

Para obtener la proteína purificada se empleó la estrategia de electroelución mediante el uso del sistema Protean® II Xi Cell System (Bio-Rad) realizando la separación en un gel de acrilamida 10% a 200V durante 5 horas. A continuación las bandas correspondientes a TbCDA-like se cortaron del gel y la proteína se aisló mediante un sistema Electro-Eluter 422 (Bio-Rad) a 30mA durante 5 horas a temperatura ambiente. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig.C2) y se empleó el método de Bradford para cuantificar la concentración de proteína.

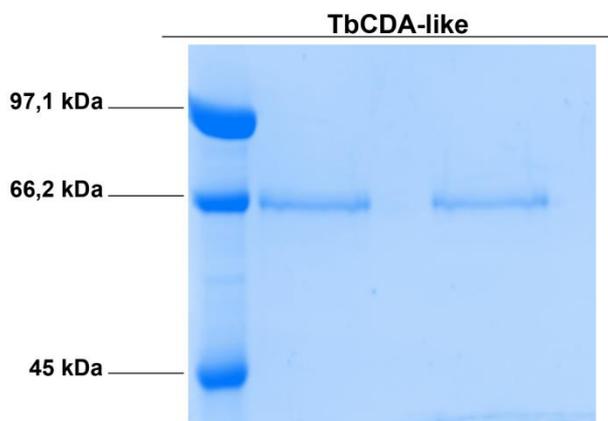


Figura C2. Comprobación de la pureza de TbCDA-like tras la electroelución. SDS-PAGE para chequear que las fracciones de TbCDA-like obtenidas tras la electroelución no presentan contaminación con ninguna otra proteína (His-TbCDA-like, 68 kDa).

Para la obtención de un anticuerpo policlonal frente a TbCDA-like se inmunizó un conejo de la cepa *New Zealand White* con TbCDA-like purificada en condiciones desnaturalizantes. Para la primera inmunización se inyectó una emulsión (v/v) con unos 400 μ g de proteína en 0,5 ml de PBS 1X y Adyuvante Completo de Freund (Sigma)

(ratio 1:1). La segunda y tercera inmunización se realizaron a intervalos de dos semanas, mientras que la cuarta se realizó un mes más tarde, inyectando en cada caso una emulsión con 0,5 ml de proteína purificada en PBS 1X y Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma) (ratio 1:1 en v/v). Extracciones de sangre (≈ 20 ml) fueron realizadas una semana después de cada inmunización a excepción de la cuarta inmunización tras la cual se procedió a desangrar al animal para obtener alrededor de 75 ml de sangre.

Para separar el suero se incubó la sangre a temperatura ambiente durante 2 horas y después 20 minutos a 37°C. Finalmente se incubó 4 horas a 4°C y se centrifugó 10 minutos a 2500g. El sobrenadante obtenido se almacenó en alícuotas con azida sódica 0,02% a 4°C y -80°C.

Con la intención de aislar las IgGs presentes en el suero obtenido, se procedió a la purificación del mismo mediante cromatografía de afinidad gracias al empleo de una resina unida a proteína A (protein A sepharose CL-4B, GE Healthcare) que presenta lugares de unión a la región Fc de las IgGs. Para ello, se lava la resina con 4 volúmenes de agua y a continuación con tampón fosfato 20 mM pH 7, se carga la resina en la columna y se equilibra con 10 volúmenes de tampón fosfato 20 mM pH 7. A continuación se hacen pasar por la resina 6 volúmenes del suero obtenido tras la inmunización y se vuelve a lavar la resina con 10 volúmenes de tampón fosfato. Para finalizar, se eluyeron las IgGs adheridas a la resina haciendo circular 10 volúmenes de tampón de elución (glicina 100 mM pH 3) y se procedió a ajustar el pH de las fracciones eluidas mediante la adición de Tris-HCl 1M pH 9,5. Se adicionó azida sódica 0,02% para su conservación. La especificidad del anticuerpo se demostró incubando éste con un exceso de 10 veces de TbCDA-like purificada durante toda la noche. Al día siguiente, se empleó el sobrenadante de dicha incubación para la realización de un Western-blot frente a la línea parental de tripomastigotes procíclicos (Fig. C3).

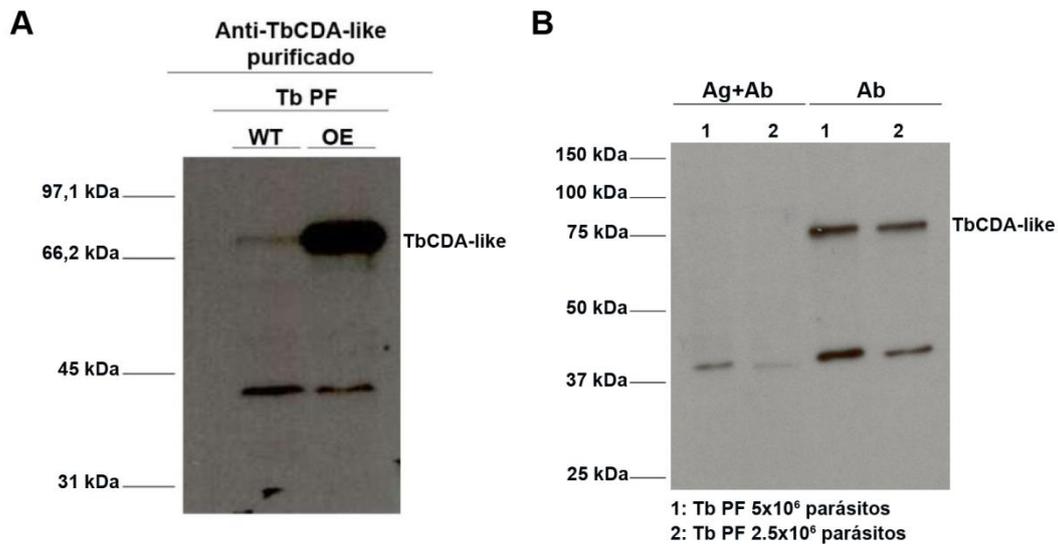


Figura C3. Chequeo del anticuerpo anti-TbCDA-like purificado frente a proteína A. (A) Se cargaron extractos de parásitos de la forma procíclica tanto de la línea parental (WT) como de la línea que sobreexpresa TbCDA-like (OE) (5×10^6 parásitos en cada calle) para chequear el anticuerpo tras el proceso de purificación. (B) Western-blot que muestra la especificidad del anticuerpo. Se incubó el extracto de parásitos de la línea parental de tripomastigotes procíclicos (Tb PF) con el sobrenadante procedente de la incubación del anticuerpo con la proteína purificada (Ag+Ab), o con el anticuerpo anti-TbCDA-like (Ab). Se empleó una dilución 1:1000 de anti-TbCDA-like. Ag (antígeno), Ab (anticuerpo). TbCDA-like: 68 kDa.

C.2.4.2. Generación de extractos de *T. brucei* y western-blot

La generación de extractos totales de parásitos se realizó a partir de 5×10^6 parásitos por muestra, obtenidos a partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento. Los parásitos se recogieron por centrifugación a 1400g durante 10 minutos y el pellet se lavó con PBS 1X para después resuspenderlo en tampón de lisis (Tabla C2). Finalmente se desnaturalizaron las proteínas calentando 5 minutos a 99°C.

Los extractos totales obtenidos se sometieron a análisis mediante SDS-PAGE para separar las proteínas en base a su peso molecular en geles de acrilamida del 8-12% a 150 – 200V durante 60-90 minutos en tampón SDS *running* (Tabla C2). A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, GE Healthcare) previamente activada en metanol, entre dos papeles Whatman de 3 mm. La

transferencia tuvo lugar a 4°C empleando un sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 100V durante 45-50 minutos en tampón de transferencia (Tabla C2). Para llevar a cabo la visualización de los marcadores de peso molecular (SDS-PAGE Standard Low Range, Bio-Rad), se tiñó la membrana con Rojo Ponceau durante 1 minuto y seguidamente se lavó con solución de lavado (PBS 1X Tween® 20 0,1%). Finalmente la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS 1X Tween® 20 0,1%, leche en polvo desnatada 5%) y después se incubó a 4°C durante toda la noche con la dilución adecuada de anticuerpo primario en solución de bloqueo. Tras lavar la membrana con solución de lavado (x3) se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:40 de anticuerpo secundario. Finalmente, la membrana se volvió a lavar con solución de lavado (x3) y se procedió a la visualización de las proteínas mediante el kit ECL® Select (GE Healthcare) empleando películas autorradiográficas Hyperfilm® ECL (GE Healthcare).

C.2.4.3. Análisis mediante inmunofluorescencia

Para determinar la localización intracelular de TbCDA, DCTD y TbCDA-like, se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia para los cuales, se recogieron 1×10^7 parásitos centrifugando 10 minutos a 1400g y posteriormente se incubaron durante 15 minutos con MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) en 1 ml de medio de cultivo sin SBF a 37°C o 28°C según si se está trabajando con formas sanguíneas o procíclicas, respectivamente. La fijación se llevó a cabo sobre portas previamente tratados con Poli-L-lisina, durante 20 minutos con p-formaldehído 4% en PBS 1X. Posteriormente los portas se lavaron dos veces en agitación con solución de lavado (PBS-Tween® 20 0,2%) y se permeabilizó la muestra durante 75 minutos a temperatura ambiente con NP-40 1% en solución de bloqueo (Blocking Reagent (Roche) 1% en solución de lavado. Tras lavar una vez para detener la permeabilización, se llevó a cabo la incubación con la solución de anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se emplearon como anticuerpos primarios: anti-TbCDA (1:100 para formas procíclicas y 1:50 para sanguíneas), anti-TbCDA-like (1:25), monoclonal anti-DCTD humana (1:100) y monoclonal anti-c-myc (1:100). A continuación se lavaron las muestras seis veces durante 5 minutos con solución de lavado y se incubaron durante 1

hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario. Se utilizaron monoclonales de cabra anti-IgG de conejo o de ratón acoplados al fluorocromo Alexa Fluor[®] 488 (1:40). Finalmente la muestra se deshidrató con metanol durante 1 minuto y se procedió al montaje utilizando ProLong[™] Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen).

La adquisición de las imágenes se realizó en un microscopio Widefield Olympus mediante el software Cell-R IX81 capturando 30 - 40 capas para cada imagen. Para la deconvolución de las imágenes se empleó el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging) y para el análisis se utilizó el software Fiji (versión 1.5e; ImageJ) (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012). Para los estudios de colocación se empleó el *plugin* JACoP (Bolte y Cordelieres 2006).

Paralelamente, para los estudios de cuantificación del daño en ADN genómico en las formas procíclicas de *T. brucei*, se empleó un anticuerpo anti- γ H2A (1:500) (Glover y Horn 2012). La preparación de las muestras se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente y para la adquisición de imágenes se empleó un microscopio Zeiss Axio Imager A1 y se analizaron mediante el software Fiji (versión 1.5e; ImageJ) (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012).

C.2.4.4. Análisis de la localización de TbCDA-like en condiciones de estrés nutricional

Para determinar si TbCDA-like se relocaliza en gránulos de estrés en condiciones de estrés nutricional, se emplearon tanto la línea parental *Tb* PF como la línea *Tb* PF CDA-like N-ter KI y se recogieron $2,5 \times 10^7$ células en fase logarítmica de crecimiento. Tras realizar 2 lavados con PBS 1X, los parásitos se mantuvieron en cultivo durante 60, 120 ó 180 minutos en PBS 1X. Transcurrido el tiempo indicado se realizó una inmunofluorescencia tal y como se ha descrito en el apartado C.2.4.3. empleando los anticuerpos anti-TbCDA-like (1:25) para la línea parental o anti-c-myc (1:100) para la línea KI. Respecto al estudio del área y número de gránulos por célula, se empleó el software Fiji/ImageJ fijando un tamaño mínimo de partícula de $0,05 \mu\text{m}^2$. Se emplearon

19-21 células por condición y el análisis se realizó sobre la proyección z de las imágenes que se obtuvo por el método de suma de capas.

Los estudios de colocalización de TbCDA-like con TbDhh1, TbDRBD3 y TbScd6 en la línea *Tb* PF *CDA-like* N-ter KI, se realizaron según lo descrito en el apartado C.2.4.3. empleando como anticuerpos primarios los policlonales anti-TbDhh1, anti-TbDRBD3 o anti-TbScd6 y el monoclonal anti-c-myc para la visualización de TbCDA-like. Se emplearon como anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor[®] 594 y anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor[®] 488. El grado de colocalización se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de solapamiento de Manders, ambos calculados con el *plugin* JACoP (Bolte y Cordelieres 2006) del software Fiji/ImageJ en, al menos, 10 células por condición. El coeficiente M1 indica el grado de solapamiento de TbCDA-like sobre TbDhh1, TbScd6 o TbDRBD3 mientras que M2 indica lo contrario.

RESULTADOS

D. RESULTADOS

D.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CITIDINA DESAMINASA DE *Trypanosoma brucei* (TbCDA)

D.1.1. Identificación de un ortólogo de la citidina desaminasa en *T. brucei*

Con objeto de identificar ortólogos de la CDA humana en *Trypanosoma brucei*, se empleó dicha secuencia para realizar una búsqueda en la base de datos del genoma de *T. brucei* (GeneDB), obteniéndose como resultado una proteína anotada como CDA putativa (TbCDA) (Tb927.9.3000) compuesta por 182 aminoácidos y con una masa molecular estimada de 19,17 kDa. La secuencia se alineó con ortólogos caracterizados de organismos eucariotas y procariotas mediante el empleo de ClustalOmega (Goujon, McWilliam et al. 2010, Sievers, Wilm et al. 2011, McWilliam, Li et al. 2013).

En el alineamiento, que fue visualizado en JalView con el esquema de colores de Clustal, se incluyeron los siguientes organismos: *Homo sapiens*, *B. subtilis*, *E. coli* y *A. thaliana* (Fig. D1). Los resultados muestran que en la secuencia de TbCDA están conservados los motivos responsables de la interacción con el zinc necesaria para la catálisis (Conticello 2008, Prohaska, Bennett et al. 2014). Destacar el ácido glutámico en posición 72 (Glu72) análogo al Glu67 en la CDA humana y que juega un importante papel durante la catálisis (Chung, Fromme et al. 2005), la prolina 112 (Pro112) y la tríada de cisteínas (Cys70-Cys113-Cys116) característica que se coordinan directamente con el ión de zinc en las CDAs tetraméricas (Johansson, Mejlhede et al. 2002). El alineamiento muestra también otros residuos conservados en CDAs tetraméricas o diméricas tales como Phe42, Asn60, Glu62, Ala71 y Phe158 implicados en la unión con el sustrato, así como Ser40, Arg117, Gln118, Glu122 y Leu154 necesarios para estabilizar las interacciones entre las distintas subunidades que constituyen el tetrámero o el dímero (según se trate de una CDA tetramérica o dimérica), así como para estabilizar interacciones dominio-dominio en las CDAs diméricas (Johansson, Mejlhede et al. 2002). La Tyr39 está conservada en las CDAs tetraméricas y es importante para la estabilización de la estructura cuaternaria (Micozzi, Pucciarelli et al. 2010). Así mismo,

el grupo NH de la Tyr66 se une mediante enlace mediado por puente de hidrógeno con el 5'-OH del sustrato (Chung, Fromme et al. 2005) estando también conservado este residuo en las CDAs tetraméricas.

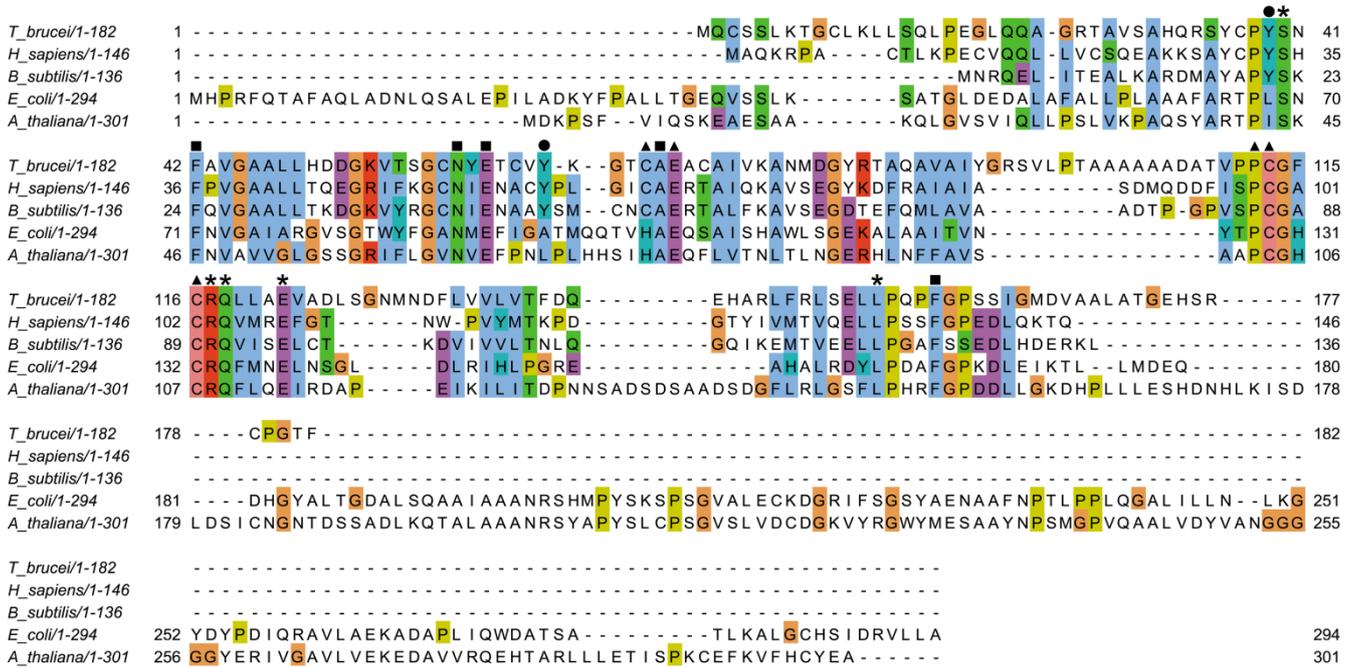


Figura D1. Alineamiento de los ortólogos de citidina desaminasa de diversos organismos incluyendo *Trypanosoma brucei*. El alineamiento se realizó utilizando ClustalOmega y fue posteriormente visualizado en JalView. Los aminoácidos implicados en la coordinación con el ion de zinc están destacados con triángulos (prolina (Pro112) y 3 cisteínas (Cys70-Cys113-Cys116)), aquellos implicados en la unión al sustrato están indicados con cuadrados, los aminoácidos que estabilizan las interacciones entre subunidades o dominios están marcados con asteriscos y los residuos de tirosina conservados en las CDAs tetraméricas están indicados con círculos. *Trypanosoma brucei* (XP_803607.1), *Homo sapiens* (NP_001776.1), *Bacillus subtilis* (KOS70912.1), *Escherichia coli* (KHJ23847.1) y *Arabidopsis thaliana* (CAA06460.1).

D.1.2. Expresión de la proteína recombinante TbCDA en el sistema heterólogo *Escherichia coli*

A partir de ADN genómico de *T. brucei* y mediante el empleo de cebadores específicos (Tabla C6), se llevó a cabo la amplificación por PCR de la secuencia

codificante de *TbCDA* para su posterior clonaje en el vector de expresión pET-28a (Novagen) que permite la obtención de proteína recombinante fusionada a una cola de 6 histidinas en el extremo amino-terminal. El vector resultante tras el clonaje (pGRV182) fue empleado para transformar diferentes cepas de *E. coli*, como *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) RP o *E. coli* BL21(DE3) pLys, las cuales presentan una copia lisogénica del gen que codifica para la T7 RNA polimerasa cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor *T7lac* y permite regular la expresión de genes recombinantes en bacterias.

La inducción de la expresión de His-TbCDA se llevó a cabo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron 5 horas en agitación a 37 °C, momento en el que las bacterias se recogieron por centrifugación para la posterior preparación de extractos.

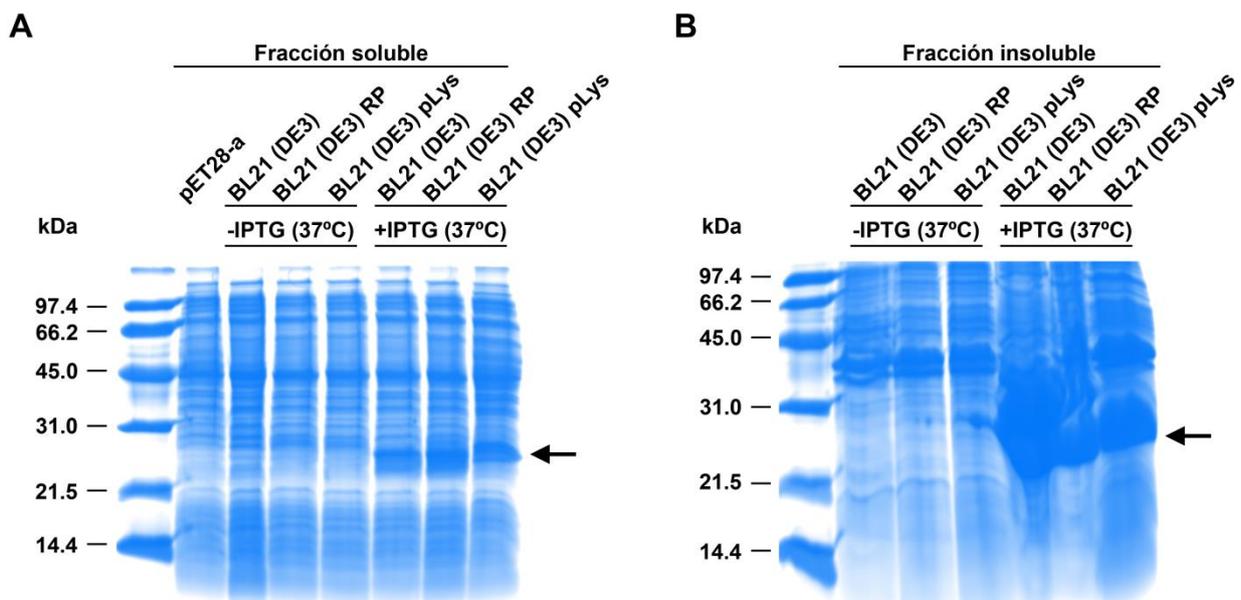


Figura D2. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de TbCDA en *E. coli* BL21(DE3). Prueba de expresión de His-TbCDA en distintas cepas de *E. coli* a 37°C durante 5 horas. Los extractos, que se separaron en fracción soluble (A) e insoluble (B) se obtuvieron a partir de cultivos en los que se indujo la expresión de His-TbCDA mediante la adición de IPTG (+IPTG). Como control se emplearon cultivos a los que no se adicionó IPTG (-IPTG) así como extractos de bacterias transformadas con el vector pET28-a vacío. Se emplearon geles de acrilamida al 15%. La flecha indica la posición de His-TbCDA (21,3 kDa).

La expresión de His-TbCDA (21,3 kDa) en las condiciones experimentales condujo a la obtención de proteína en fracción soluble en todas las cepas ensayadas.

D.1.3. Purificación de TbCDA recombinante e identificación mediante huella de masa peptídica

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo a partir de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con pGRV182 induciendo la expresión con IPTG 1 mM durante 5 horas a 37 °C tal y como ha sido descrito previamente en la presente Tesis Doctoral (Material y métodos C.2.2.3).

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a níquel a partir del extracto obtenido tras la sonicación del pellet de bacterias recogido después de la inducción. Se empleó una columna HiTrap Chelating HP-Ni²⁺ (GE Healthcare) acoplada a un sistema FPLC (Pharmacia) lográndose la elución de la proteína mediante la aplicación de un gradiente lineal de imidazol (20 – 500 mM). Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE combinándose aquellas con mayor concentración de proteína (Fig. D3A), para finalmente sustituir el tampón por uno de almacenamiento mediante columnas PD-10 (GE Healthcare) (Fig. D3B) y guardar la proteína a -80 °C hasta su utilización. La tabla D1 representa el rendimiento del proceso de purificación calculado a partir de los valores de actividad específica obtenidos espectrofotométricamente determinando la disminución de absorbancia producida cuando el anillo de Cyt se desamina a Ura (Vincenzetti, Cambi et al. 1996).

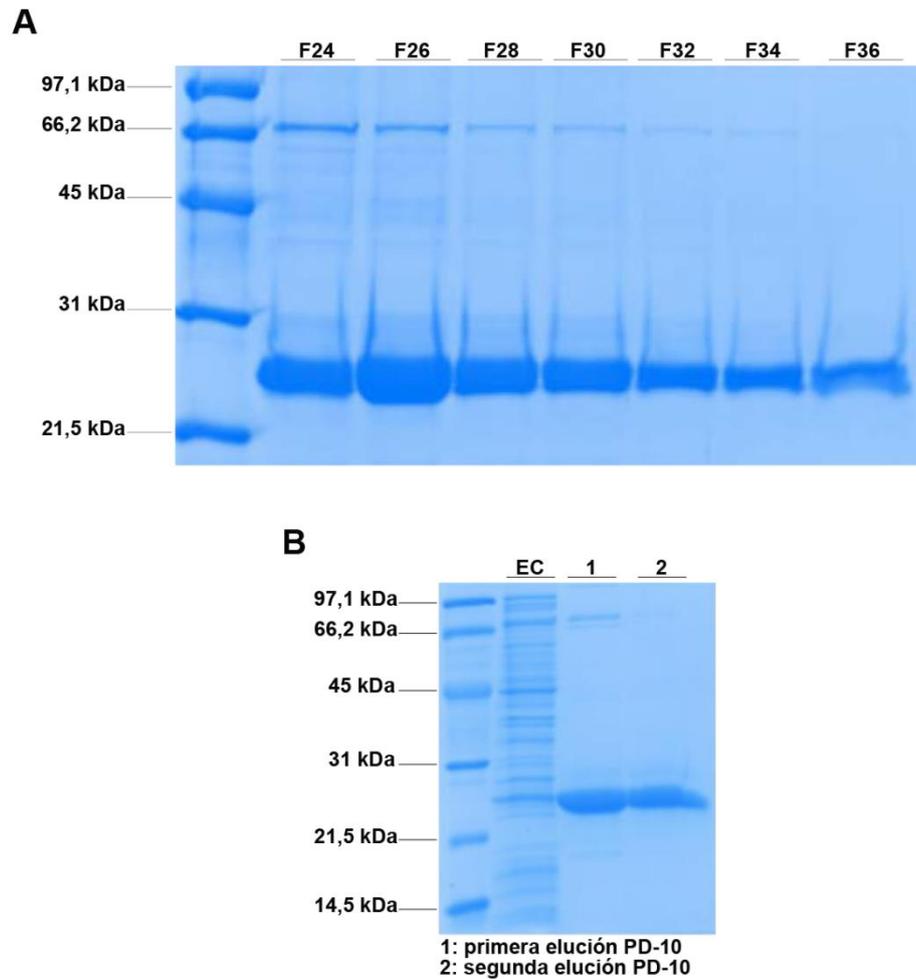


Figura D3. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de TbCDA. (A) Fracciones (F) de proteína purificada seleccionadas tras la cromatografía de afinidad a níquel. (B) Gel de acrilamida comparando el extracto crudo (EC) con las 2 eluciones realizadas con la PD-10.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Ae ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Atotal ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Grado de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	235,80	0,71	166,65	1,00	100,00
Afinidad a níquel + PD10	11,50	22,70	261,05	32,12	63,84

Tabla D1. Rendimiento del proceso de purificación de TbCDA. Datos referentes a la purificación a partir de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con pGRV182. Ae: actividad específica. Atotal: actividad total.

Con el fin de verificar que la proteína purificada es His-TbCDA, se llevó a cabo la identificación por huella de masa peptídica (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF) en el servicio de proteómica del IPBLN. La banda de tamaño esperado obtenida tras la purificación de la proteína fue analizada mediante espectrometría de masas tipo MALDI TOF/TOF. La identificación de las proteínas a partir de las masas de los péptidos identificados en el espectro (Fig. D4 y Tabla D2), se realizó usando las bases de datos de *T. brucei* (Tbrucei_927) y en SwissProt frente a todos los organismos empleando MASCOT (*Matrix Science*) como motor de búsqueda. El resultado reveló la identificación de una proteína de 19,2 kDa anotada como CDA en la base de datos de *T. brucei* con una cobertura de secuencia del 47,3%.

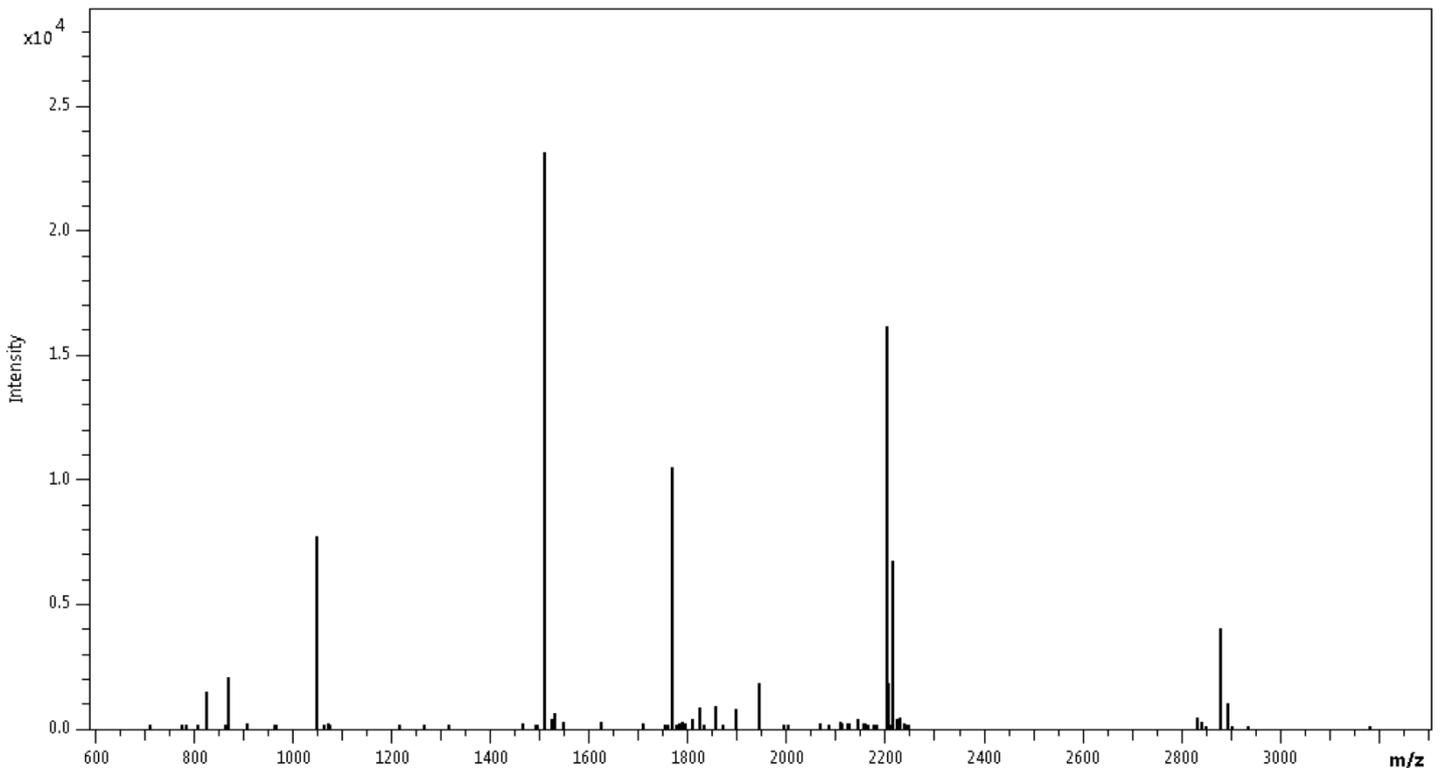


Figura D4. Espectro de masas obtenido para la identificación de TbCDA. La proteína fue digerida con tripsina para posteriormente recoger los péptidos digeridos y realizar una extracción del gel con TFA y AcN. La muestra fue depositada en una placa AnchorChip (Bruker), cristalizada con CHCA y analizada en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF (UltrafleXtreme de Bruker) obteniéndose el correspondiente espectro de masas.

<i>m/z</i>	$\Delta m/z$ [ppm]	<i>z</i>	<i>P</i>	Rango	Secuencia	Modificaciones
2069,1811	30,89	1	1	8-26	TGCLKLLSQLPEGLQQAGR	Carbamidometil: 3
1509,9008	41,37	1	0	13-26	LLSQLPEGLQQAGR	
1856,9808	39,65	1	1	79-95	ANMDGYRTAQAVAIYGR	
1872,9726	37,66	1	1	79-95	ANMDGYRTAQAVAIYGR	Oxidación: 3
1049,6168	40,94	1	0	86-95	TAQAVAIYGR	
2203,1512	39,84	1	0	96-117	SVLPTAAAAAADATVPPCGFCR	Carbamidometil: 18, 21
2880,5727	40,50	1	0	150-177	LSELLPQPFPGSSIGMDVA ALATGEHSR	
2896,5617	38,24	1	0	150-177	LSELLPQPFPGSSIGMDVA ALATGEHSR	Oxidación: 16

Tabla D2. Valor *m/z* y secuencia de los péptidos identificados en la secuencia de TbCDA.

D.1.4. Determinación de la masa molecular y de la conformación nativa TbCDA

Para determinar el estado oligomérico de la proteína, una muestra en solución de TbCDA purificada fue sometida a un análisis por espectrometría de masas aplicando un método lineal entre 3-90 kDa y utilizando el *Protein std II* de Bruker como estándares para la calibración. El espectro reveló un pico mayoritario con un valor *m/z* de 21192,059 que corresponde con la masa teórica de His-TbCDA (21334,2 Da) y un pico de *m/z* 42568,411 cuya fragmentación correspondía a TbCDA, sugiriendo la presencia de una estructura cuaternaria dimérica de la proteína en solución (Fig. D5).

Sin embargo, no pudieron identificarse estados oligoméricos mayores probablemente debido a que las interacciones entre las diferentes subunidades son de naturaleza iónica de modo que estructuras triméricas o tetraméricas podrían haber sido inestables tras la ionización y por tanto indetectables.

Para confirmar de manera definitiva si la conformación nativa de TbCDA es dimérica o tetramérica se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel empleando una columna SuperdexTM – 200 10/300 GL y se determinó en primer lugar el volumen de elución de los estándares de peso molecular conocido (Sigma-Aldrich) y posteriormente el de la proteína purificada.

La masa molecular estimada de la citidina desaminasa de *T. brucei* en base a su secuencia es de 19,17 kDa y sin embargo la cromatografía de exclusión molecular reveló la presencia de un pico mayoritario correspondiente a 77,7 kDa indicando que TbCDA pertenece a la clase homotetramérica dentro de la familia de las CDAs lo cual además concuerda con lo observado en la secuencia de aminoácidos ya que las CDAs tetraméricas se coordinan con el ión zinc mediante tres cisteínas, como es el caso de TbCDA, HsCDA o BsCDA; mientras que las CDAs diméricas como EcCDA o AtCDA, se coordinan con el ion zinc mediante una histidina y 2 cisteínas (Fig. D1) (Betts, Xiang et al. 1994, Johansson, Mejlhede et al. 2002, Johansson, Neuhard et al. 2004, Micozzi, Pucciarelli et al. 2010).

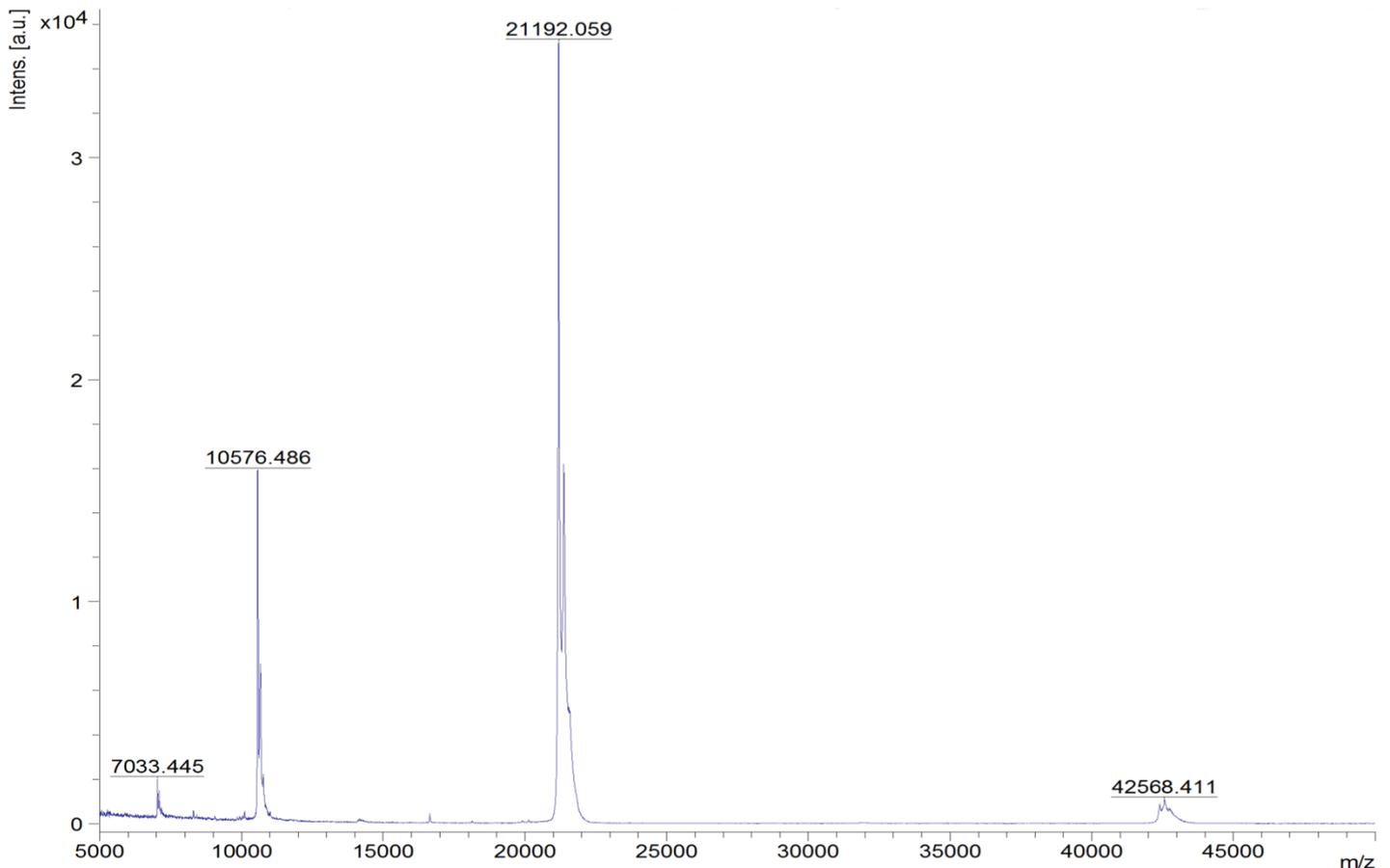


Figura D5. Espectro de masas para la determinación de la conformación nativa de TbCDA. El espectro revela la presencia de un pico mayoritario con un valor m/z de 21192,059 que corresponde con la masa teórica de His-TbCDA y un pico de m/z 42568,411 que sugiere que la estructura de TbCDA en solución es un dímero.

D.1.5. Caracterización cinética de TbCDA

La determinación de los parámetros cinéticos de TbCDA se realizó espectrofotométricamente mediante la monitorización del descenso de la absorbancia que se produce cuando el anillo de Cyt se desamina a Ura (Vincenzetti, Cambi et al. 1996).

La enzima sigue una cinética de Michaelis-Menten (Fig. D6) de modo que a partir de los valores de $\Delta DO/\text{min}$ obtenidos experimentalmente y mediante un ajuste de regresión no lineal de los datos a la ecuación de Michaelis, se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para los sustratos ensayados: Ctd, dCtd y 5-Met-dCtd (cuya desaminación genera dThd). Posteriormente se llevó a cabo el cálculo de la constante catalítica (k_{cat}) a partir de los valores de V_{max} para poder obtener el valor de la constante de especificidad (k_{cat}/K_m) (Tabla D3). La Tabla D4 refleja los parámetros cinéticos publicados para las CDAs de diversos organismos, siendo estos del mismo orden de magnitud que los obtenidos para la de *T. brucei*. La enzima no mostró actividad frente a dCMP ni dCTP.

	TbCDA				
	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat} / K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	V_{max}/K_m
Desoxicitidina	52,3 \pm 4,5	34,9 \pm 0,8	745,6 \pm 17,6	14,3	0,67
Citidina	199,5 \pm 9,0	126,1 \pm 3,4	2690,4 \pm 72,0	13,5	0,63
5-metil-2'- desoxicitidina	24,5 \pm 3,3	5,9 \pm 0,2	125,6 \pm 4,8	5,1	0,24

Tabla D3. Parámetros cinéticos para distintos sustratos de TbCDA determinados espectrofotométricamente a 282nm.

	HsCDA			AtCDA			EcCDA			BsCDA		
	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m									
Desoxicitidina	39	45,5	1,17	75	49	0,65	60	444	7,4	236	230	0,97
Citidina	39	68,3	1,75	150	59.5	0,39	110	147	1,33	216	184	0,85

Tabla D4. Parámetros cinéticos publicados para diferentes CDAs. Los valores de K_m se expresan en μM . Los valores de V_{max} se expresan en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Consultar referencia (Vincenzetti, Cambi et al. 1996) para HsCDA, (Vincenzetti, Cambi et al. 1999) para AtCDA y EcCDA y (Johansson, Neuhard et al. 2004) para BsCDA.

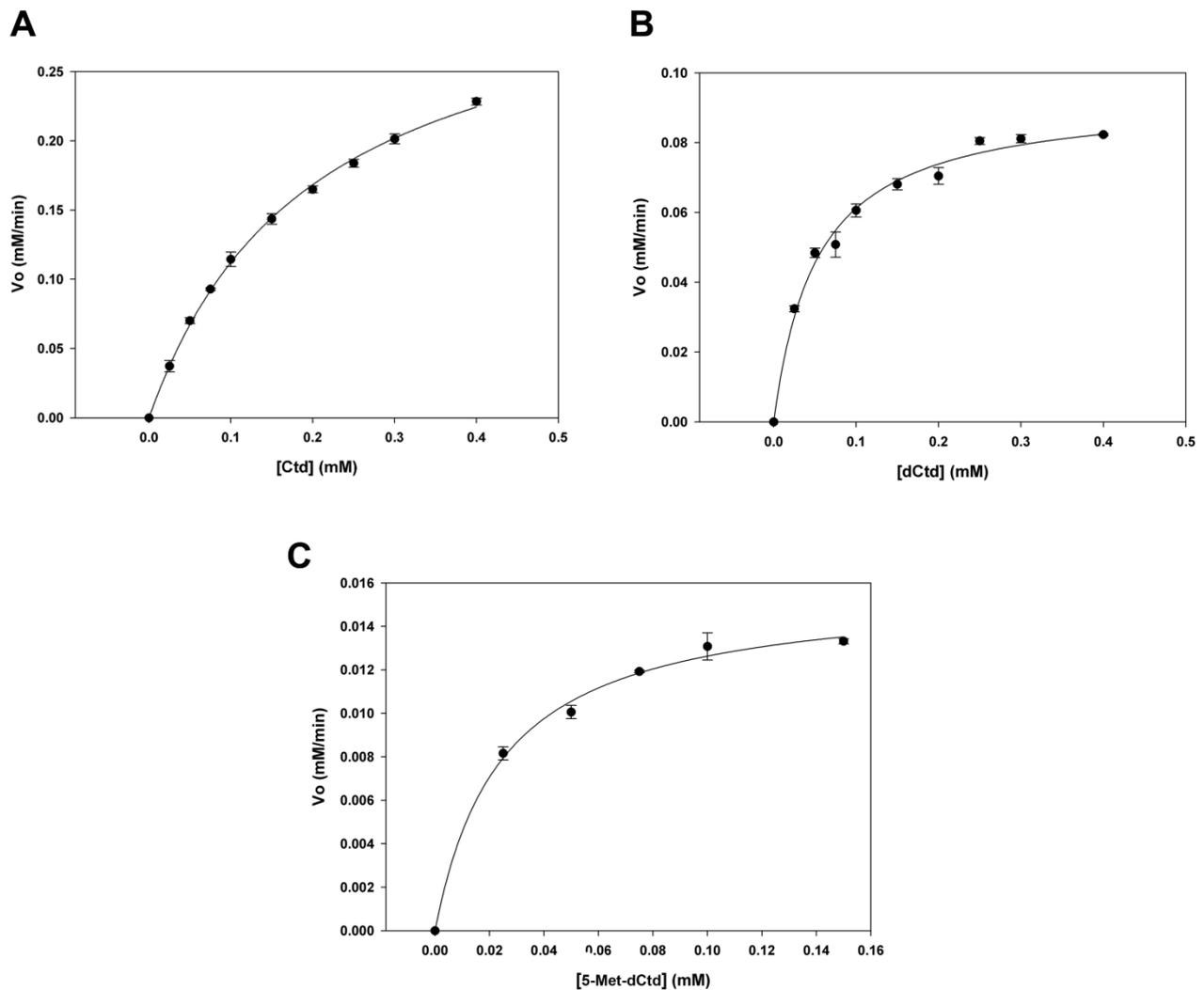


Figura D6. Representaciones de Michaelis-Menten para los distintos sustratos ensayados frente a TbCDA. (A) Citidina (Ctd), (B) desoxicitidina (dCtd) y (C) 5-metil-2'-desoxicitidina (5-Met-dCtd).

La 5-Met-dCtd es el sustrato frente al que la enzima mostró la mayor afinidad, obteniéndose valores de K_m del mismo orden que para HsCDA (Zauri, Berridge et al. 2015), seguido por dCtd y Ctd, mientras que los valores de V_{max} siguen el orden contrario siendo más eficiente para la Ctd seguido por dCtd y 5-Met-dCtd. Los valores de k_{cat}/K_m son muy similares para Ctd y dCtd y algo menores para 5-Met-dCtd que probablemente en condiciones fisiológicas no es el principal sustrato para TbCDA.

D.1.6. Papel de TbCDA y TbdUTPasa en la provisión de dUMP para la síntesis de dTMP en *T. brucei*

D.1.6.1. La deficiencia de TbCDA puede ser contrarrestada mediante la adición de altas concentraciones de nucleósidos pirimidínicos

Como ya se ha mencionado en la introducción, *T. brucei* expresa una única TK1 y es una enzima esencial cuya inhibición provoca una importante reducción de los niveles de dTTP (Valente, Timm et al. 2016). El papel esencial de la enzima no reside en el salvamento de dThd, sino en la fosforilación de dUrd para la síntesis de dUMP (Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016, Valente, Timm et al. 2016). Un interrogante que se plantea como consecuencia de esta observación es cual la procedencia de la dUrd y la contribución de TbTK al pool total de dUMP intracelular.

Para comprobar si TbCDA juega un papel esencial en la provisión de dUrd y en la síntesis de dUMP, se llevó a cabo la reducción de los niveles de enzima en tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*, mediante la técnica de interferencia mediada por ARN (RNAi). Para tal fin, un fragmento de 392 bp de la secuencia codificante del gen *TbCDA* fue amplificado por PCR y clonado en orientaciones opuestas y separadas por una secuencia de DNA denominada *stuffer*, en el vector pGR19. Esta secuencia *stuffer* de DNA es la responsable de la formación de un ARN con estructura tallo-lazo. El sistema es inducible mediante la adición de tetraciclina o alguno de sus derivados (como la doxiciclina) al medio, ya que el promotor que regula la transcripción se encuentra reprimido por el represor de tetraciclina. La Figura D7A muestra el limitado

efecto de este sistema sobre la proliferación de la línea RNAi obtenida (*Tb* BF CDA-RNAi), confirmándose por western-blot que los niveles de expresión de TbCDA no estaban siendo eficientemente reducidos (Fig. D7B).

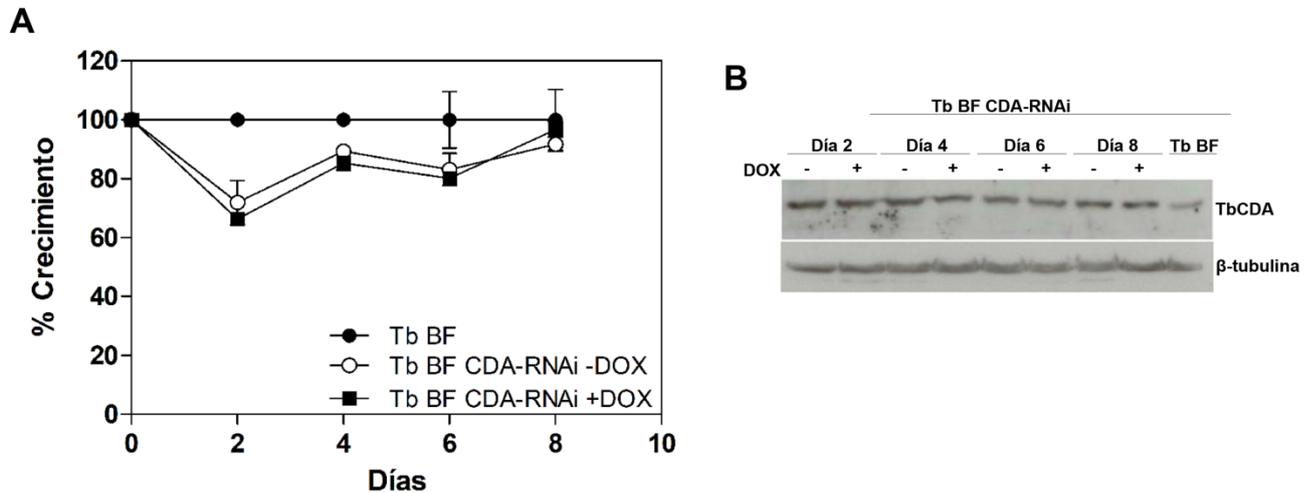


Figura D7. Efecto del primer RNAi frente a TbCDA sobre la proliferación de *T. brucei* in vitro. (A) Curva de crecimiento de las líneas parental (*Tb* BF) y RNAi frente a TbCDA (*Tb* BF CDA-RNAi) con o sin doxiciclina (+/- DOX) (1 μ g/ml). (B) Seguimiento de los niveles de TbCDA por western-blot a partir de extractos de *Tb* BF CDA-RNAi +/-DOX y de *Tb* BF en cada uno de los puntos de la curva de crecimiento. En cada carril se cargaron 5×10^6 parásitos. Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA (1:500) y anti- β -tubulina (1:5000) como control de carga.

A la vista de los resultados se decidió llevar a cabo la construcción de un segundo sistema de RNAi. Para esta construcción se empleó una región de 489 bp que comprendía el final de la secuencia codificante de *TbCDA* y el principio de la 3' UTR a menudo implicada en la estabilización y en la regulación del *splicing* y la traducción del ARNm (Clayton 2019). En este caso se observó un fenotipo estable de pérdida de viabilidad de aproximadamente un 40% respecto a la línea parental (Fig. D8A) en medio HMI-9 libre de pirimidinas, así como un silenciamiento eficiente de la proteína mediante western-blot (Fig. D8B). Posteriormente, con la intención de determinar si efectivamente TbCDA juega un papel relevante en la provisión de dUMP, vía formación de dUrd que posteriormente será fosforilada por TbTK, se decidió complementar el medio con distintas concentraciones de dThd o dUrd. En ambos casos

se produjo una reversión del fenotipo restaurándose el crecimiento a niveles similares a los de la línea parental manteniéndose la eficiencia del RNAi (Fig. D8C-F).

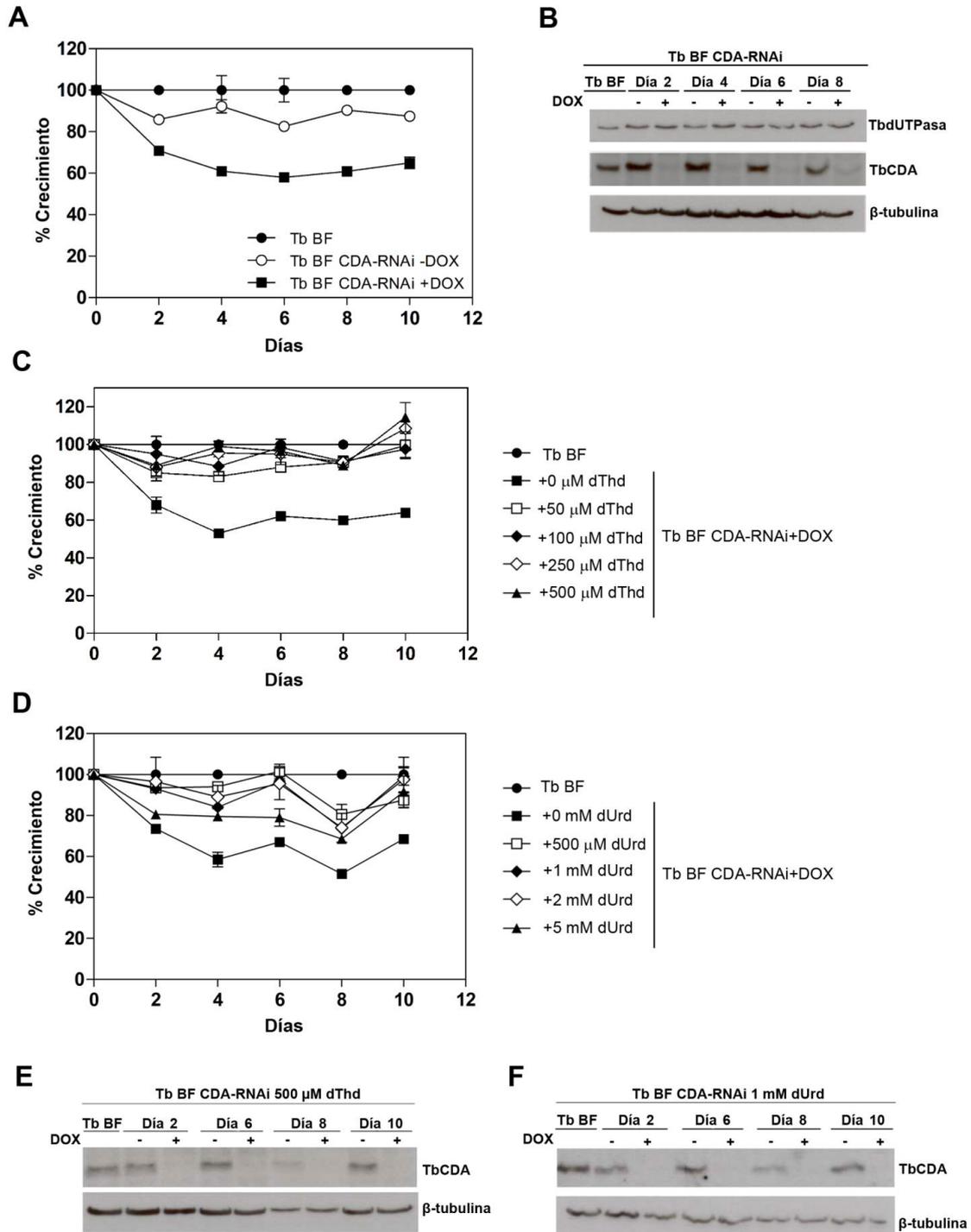


Figura D8. Efecto del segundo RNAi frente a TbCDA sobre la proliferación de *T. brucei* *in vitro* y efecto de la complementación con diferentes nucleósidos. (A) Curvas de crecimiento de las líneas parental (*Tb* BF) y RNAi frente a TbCDA (*Tb* BF CDA-RNAi) con o sin doxiciclina (+/- DOX) (1 µg/ml) en medio HMI-9 sin pirimidinas suplementado con un 10% de SBF. (B) Seguimiento de los niveles de TbCDA y TbdUTPasa por western-blot a partir de extractos de *Tb* BF CDA-RNAi +/-DOX y de *Tb* BF en cada uno de los puntos de la curva de crecimiento. (C-D) Curvas de crecimiento de *Tb* BF y *Tb* BF CDA-RNAi en medio HMI-9 sin pirimidinas suplementando con un 10% de FBS y en presencia de diferentes concentraciones de (C) timidina (dThd) o (D) desoxiuridina (dUrd). (E-F) Western-blot que demuestra que la reducción de los niveles de TbCDA se mantuvo estable durante la complementación con dThd o dUrd. En cada carril se cargaron 5×10^6 parásitos. Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA (1:500), anti-TbdUTPasa (1:75000) y, como control de carga, anti-β-tubulina (1:5000).

D.1.6.2. La dUTPasa de *T. brucei* no juega un papel relevante en la síntesis de dUMP

T. brucei posee una dUTPasa dimérica, una enzima esencial que cataliza la hidrólisis del dUTP o dUDP para generar dUMP. Las líneas de tripomastigotes sanguíneos KO para la dUTPasa (*Tb* BF *DUT*-KO) son auxótrofas para dThd (Fig. D9A) (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013) y por ello se ha propuesto un papel dual para la enzima. Por una parte, estaría implicada en la provisión de dUMP para la síntesis de dTMP y por otra, sería la encargada de mantener un correcto balance dUTP/dTTP para controlar la incorporación de Ura en el ADN (Castillo-Acosta, Estevez et al. 2008) (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013).

El papel esencial de TbCDA en la síntesis de dUrd y dUMP plantea una serie de incógnitas en relación a cuál sería el papel que juega la TbdUTPasa en la síntesis de timidilato. Es evidente que la presencia de dUTPasa no es suficiente para contrarrestar la ausencia de TbCDA, Para analizar esta aparente contradicción, como primera aproximación, se decidió comprobar si la expresión de la TbdUTPasa aumenta para compensar la reducción de los niveles de TbCDA, al estar afectada la síntesis de dUMP a través de la fosforilación de dUrd. Sin embargo, la figura D8B muestra que no existe alteración en los niveles de TbdUTPasa tras la inducción del RNAi frente a TbCDA, sugiriendo que es posible que esta enzima no esté implicada en la generación de dUMP.

Adicionalmente, si el papel esencial de la TbdUTPasa está relacionado con la síntesis de dUMP, la sobreexpresión de la DCTD humana en la línea *Tb* BF *DUT-KO* debería restaurar el crecimiento de forma similar a lo que ocurre con la dThd al generar directamente el dUMP para la síntesis de timidilato. La línea *Tb* BF *DUT-KO* disponible en el laboratorio fue transfectada con la construcción pGRV23b + DCTD que permite la sobreexpresión de la DCTD humana tras inducción con doxiciclina. Sin embargo, como se observa en la figura D9B, las células que expresan la DCTD humana mueren rápidamente al igual que ocurre con la línea *Tb* BF *DUT-KO* en ausencia de dThd. Un análisis mediante inmunofluorescencia reveló que la localización de la DCTD humana expresada ectópicamente en *T. brucei* es citosólica (Fig. D3E). Todas estas observaciones unidas al hecho de que TbcDA es esencial, apoyan la noción de que el papel principal de la TbdUTPasa y lo que justificaría su carácter esencial, es la retirada del exceso de dUTP para evitar su incorporación masiva al ADN. De tener un papel en la provisión de dUMP para la síntesis de dTMP, sería minoritario y no esencial. Por consiguiente, la línea *Tb* BF *DUT-KO* es auxótrofa para dThd porque la expansión del pool intracelular de dThd contribuiría a generar niveles elevados de dTTP contribuyendo así a normalizar el ratio dUTP/dTTP y evitando la incorporación excesiva del dUTP en el ADN, evento que es altamente citotóxico (Castillo-Acosta, Estevez et al. 2008).

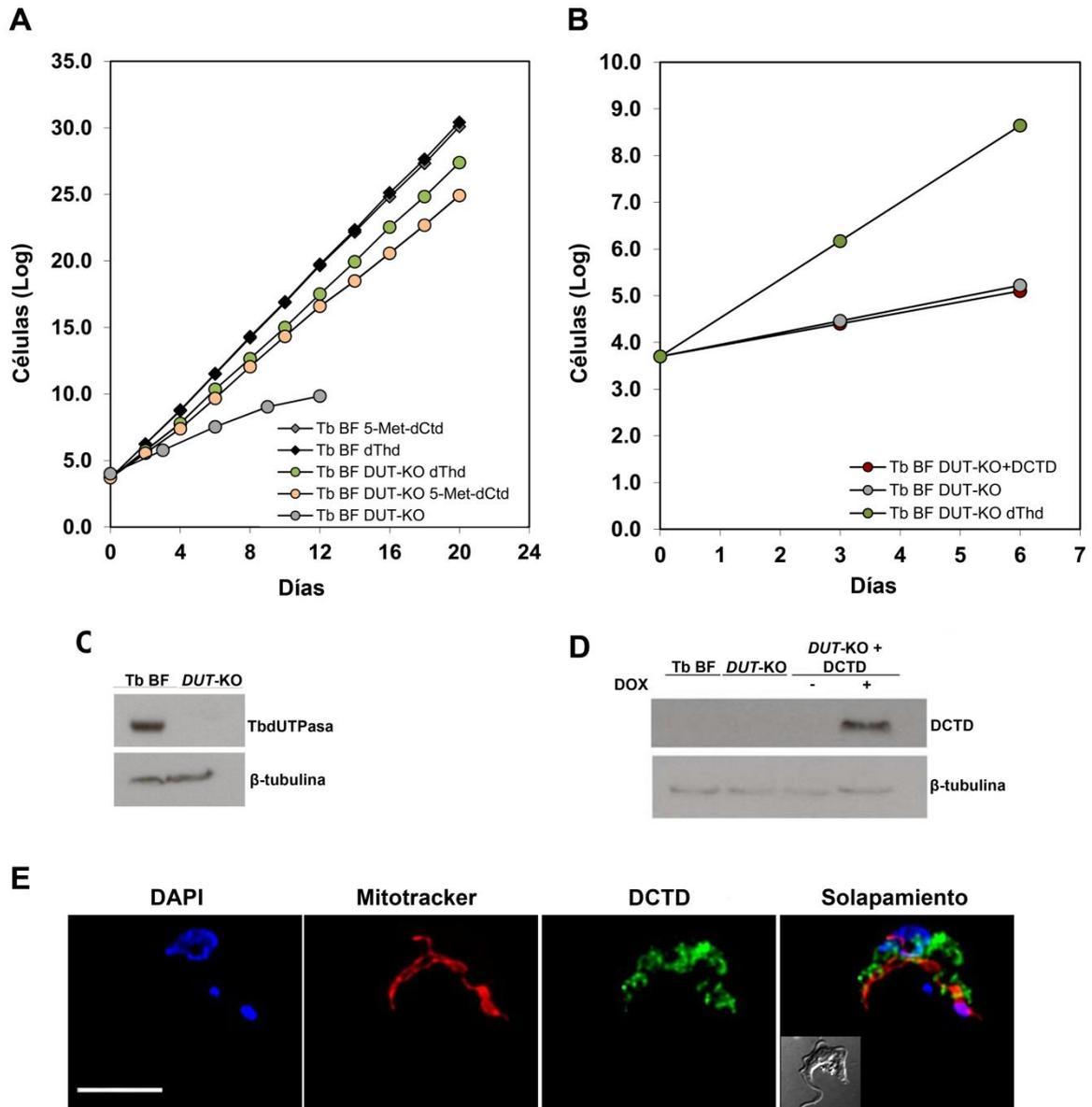


Figura D9. Expresión de la DCTD humana en la línea KO para la TbdUTPasa. (A) Curva de crecimiento de la línea parental (*Tb BF*) y de *Tb BF DUT-KO* en presencia de timidina (dThd) 600 μ M o 5-metil-2'-desoxicitidina (5-Met-dCtd) 2 mM en HMI-9 sin pirimidinas suplementado con un 10% de SBF. (B) Curva de crecimiento de *Tb BF DUT-KO* en presencia o ausencia de dThd 600 μ M así como de la línea *Tb BF DUT-KO* que expresa de manera ectópica la DCTD humana. (C-D) El análisis por western-blot demuestra que la línea *Tb BF DUT-KO* no expresa la TbdUTPasa y que las células expresan la DCTD humana tras la adición de doxiciclina 1 μ g/ml al medio. Se emplearon los anticuerpos anti-TbdUTPasa (1:75000), anti-DCTD (1:1000) y anti- β -tubulina (1:5000). Se cargaron 5×10^6 parásitos en cada carril. (E) Localización subcelular de la DCTD humana expresada ectópicamente en tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei* analizados por inmunofluorescencia. Se emplearon los anticuerpos anti-

DCTD policlonal y secundario anti-IgG monoclonal conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. Las mitocondrias se marcaron con MitoTracker Red CMXRos y los núcleos y kinetoplastos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Olympus IX81 y deconvolucionadas con el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging). Las imágenes se analizaron con el software FiJi/ImageJ. Barra, 10 μm .

TbCDA es capaz de desaminar eficientemente el sustrato 5-Met-dCtd (Tabla D4), siendo el producto de esta reacción la dThd, de modo que si la línea *Tb* BF *DUT*-KO es auxótrofa para dThd, la suplementación con 5-Met-dCtd en medio libre de otras pirimidinas debería ser suficiente para mantener el crecimiento *in vitro*. Efectivamente, tal y como se muestra en la figura D9A, tripomastigotes sanguíneos KO para la TbdUTPasa crecen de forma similar con 5-Met-dCtd 2 mM y dThd 600 μM . Esta observación confirma que TbCDA es capaz de desaminar análogos de nucleósidos en *T. brucei* y que juega un papel esencial en la síntesis de dTMP.

D.1.7. Localización intracelular de TbCDA

En organismos eucariotas la localización intracelular de CDA varía. HsCDA presenta una localización fundamentalmente nuclear, determinada por inmunofluorescencia en diversos tipos celulares (The Human protein Atlas (Uhlen, Fagerberg et al. 2015)) (Somasekaram, Jarmuz et al. 1999), habiéndose incluso establecido que los primeros 27 aminoácidos de su secuencia contienen una señal de localización nuclear constituida por 2 secuencias de aminoácidos básicos separados por una región espaciadora (**KRPACTLKPECVQQLLVCSQEAKK**) (Somasekaram, Jarmuz et al. 1999). En otros organismos es exclusivamente citosólica como ocurre con la CDA de *A. thaliana* o *Glycine max* (Chen, Herde et al. 2016), pasando por organismos como el molusco *Haliothis diversicolor supertexta*, donde la proteína se localiza mayoritariamente en el citosol aunque una pequeña proporción se concentraría en el núcleo (Wu, Wu et al. 2009).

El análisis de la localización subcelular de TbCDA se llevó a cabo tanto en parásitos sanguíneos (Fig. D10B) como procíclicos (Fig. D10A) de *T. brucei*, mediante

inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo policlonal anti-TbCDA generado en el laboratorio. En ambos casos se confirmó que la localización de la proteína es mitocondrial, tanto para las líneas parentales como para las líneas que sobreexpresan TbCDA. Además, se generó una línea de tripomastigotes procíclicos que sobreexpresan TbCDA fusionada a c-myc en su extremo C-terminal, confirmándose por microscopía de fluorescencia empleando un anticuerpo monoclonal anti-c-myc, que la proteína se localiza en la mitocondria del parásito (Fig. D10A). Esta observación constituye la primera descripción de un ortólogo mitocondrial de HsCDA implicado en la ruta de salvamento de pirimidinas. El análisis de colocalización fue llevado a cabo a partir de las señales del MitoTracker y del Alexa Fluor® 488, obteniéndose una colocalización positiva con un coeficiente de Pearson de $0,9 \pm 0,024$ para la línea que sobreexpresa y $0,85 \pm 0,063$ para la línea parental.

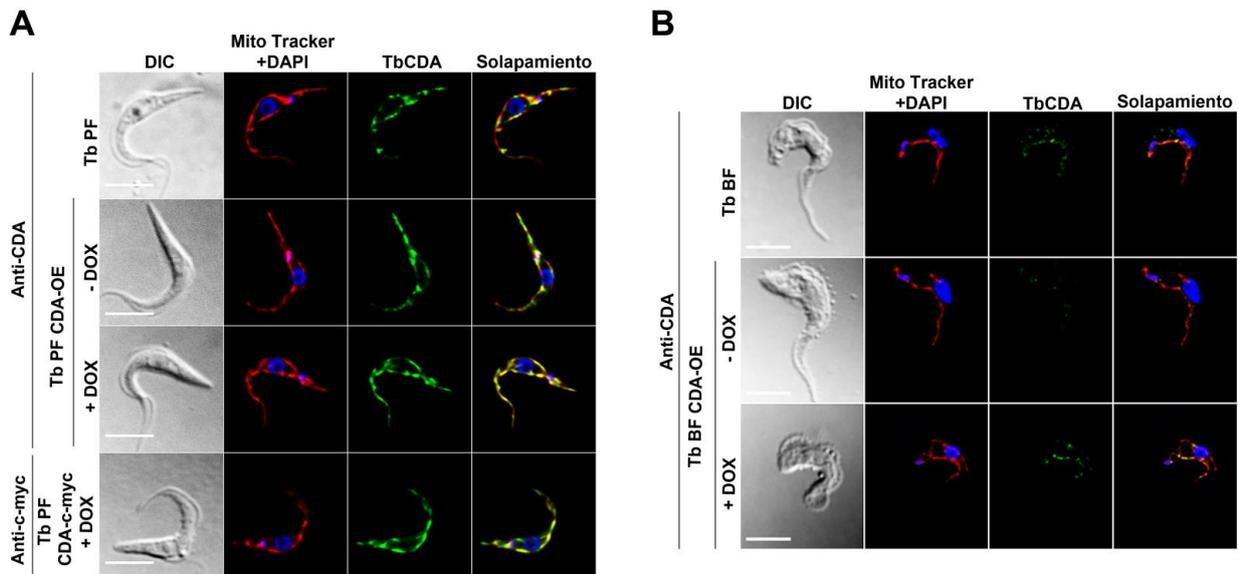


Figura D10. Localización intracelular de TbCDA. Inmunofluorescencia mostrando la localización de TbCDA en (A) tripomastigotes procíclicos (*Tb* PF) y formas procíclicas que sobreexpresan TbCDA (*Tb* PF CDA-OE) o TbCDA fusionada a c-myc (*Tb* PF CDA-c-myc) y (B) tripomastigotes sanguíneos (*Tb* BF) y formas sanguíneas que sobreexpresan TbCDA (*Tb* BF CDA-OE). Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA policlonal y un secundario anti-IgG monoclonal conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. Las mitocondrias se marcaron con MitoTracker Red CMXRos y los núcleos y kinetoplastos con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Olympus IX81 y deconvolucionadas con el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging). Las imágenes se analizaron con el software FiJi/ImageJ. Barra, 10 μ m.

La figura D11A-D demuestra que la sobreexpresión de TbCDA es estable a lo largo del tiempo y que la intensidad de fluorescencia es claramente superior en las células inducidas tras la adición de DOX al medio. Así mismo, el análisis mediante western-blot evidencia que los niveles de expresión de TbCDA en la forma procíclica del parásito son dos veces superiores respecto a la forma sanguínea (Fig. D11E-F).

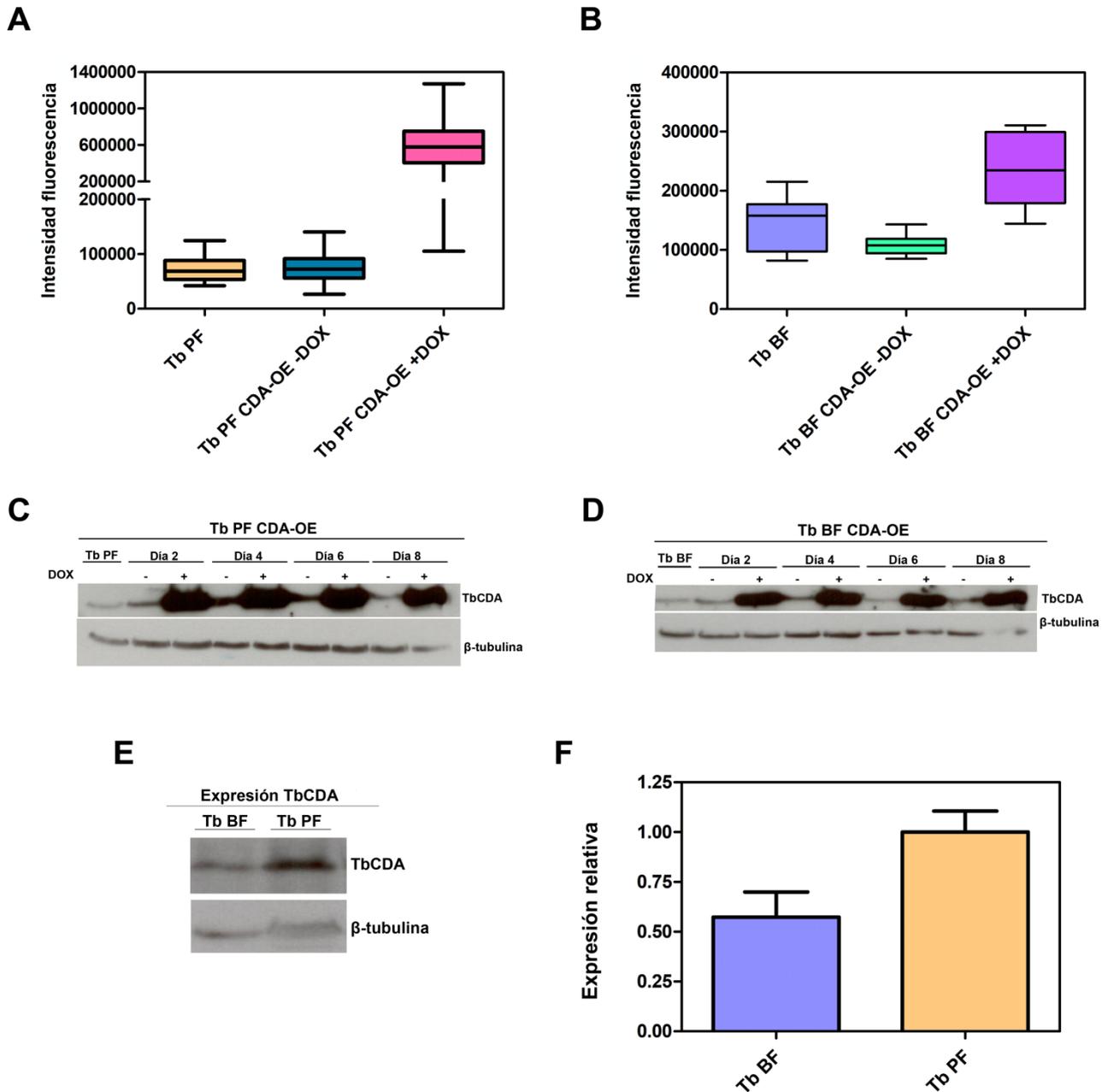


Figura D11. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia y los niveles de expresión de TbCDA. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las líneas parentales y los mutantes

que sobreexpresan TbCDA en (A) las formas procíclicas y (B) las formas sanguíneas del parásito. Las cajas representan los rangos intercuartil (RIQ) y los bigotes representan los valores máximos y mínimos. (C) Western-blot a partir de extractos de *Tb* PF y *Tb* PF CDA-OE ± DOX y (D) *Tb* BF y *Tb* BF CDA-OE ± DOX que muestran que la sobreexpresión de TbCDA es estable a lo largo de 8 días tras la adición de DOX (1 µg/ml). (E) Western-blot representativo de los niveles de expresión de TbCDA en *Tb* BF y *Tb* PF. En cada carril se cargaron 5×10^6 parásitos. Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA (1:500) y anti-β-tubulina (1:5000) como control de carga. (F) Cuantificación del western-blot que muestra los niveles de expresión de TbCDA en *Tb* BF y *Tb* PF. Las barras de error muestran la desviación estándar de 3 réplicas biológicas. Tanto la cuantificación del western-blot como la de la fluorescencia se realizaron empleando el software FiJi/ImageJ.

D.2. CARACTERIZACIÓN DE UNA CITIDINA DESAMINASA-LIKE EN *Trypanosoma brucei* (TbCDA-like)

D.2.1. Identificación de una citidina desaminasa-like de función desconocida en *T. brucei*

Con el fin de identificar y caracterizar otras potenciales citidina desaminasas presentes en *T. brucei*, se realizó una búsqueda en la base de datos TriTrypDB *Kinetoplastid Informatics Resources* y se identificó una proteína putativa identificada como “A distinct subfamily of CDD/CDA-like deaminases” (TbCDA-like) (Tb927.10.8850) cuya secuencia consta de 585 aminoácidos y una masa molecular estimada de 65,89 kDa. La proteína se caracteriza por presentar en la región C-terminal de la secuencia un dominio CDA del tipo Cys-X-Glu-X₂₄₋₃₆-Pro-Cys-X-X-Cys constituido en *T. brucei* por las cisteínas Cys483, Cys524 y Cys527, así como el residuo de ácido glutámico Glu485 y la prolina Pro523. Así mismo, la región N-terminal contiene un dominio de dedos de zinc catalogado como motivo CCCH no convencional del tipo Cys-X₅-Cys-X₅-Cys-X₃-His (Kramer, Kimblin et al. 2010) y este motivo podría sugerir que TbCDA-like puede actuar sobre ácidos nucleicos. En la secuencia de *T. brucei* las cisteínas son Cys210, Cys216 y Cys222 y la histidina His226.

El ortólogo de esta proteína presente en *Leishmania major* Friedlin (LmjF36.5940) se ha postulado como el representante de un nuevo grupo que constituye una rama divergente dentro del clado de las proteínas tipo CDA en el que se incluye la proteína TbCDA-like de *T. brucei* y que está presente en organismos eucariotas tales como kinetoplastidos, algas clorofitas, estramenopilos (Stramenopiles) o heterokontos (Heterokonta) y alveolados como *Perkinsus marinus*, sin que se hayan identificado por el momento ortólogos en mamíferos (Iyer, Zhang et al. 2011).

Posteriormente se realizó una búsqueda en la base de datos de familias de proteínas Pfam (*The protein families database*) (Mistry, Chuguransky et al. 2021), partiendo de la secuencia de *T. brucei*, con el objetivo de estudiar en mayor profundidad la familia a la que pertenece esta TbCDA-like. Dicha búsqueda confirmó que esta familia está incluida dentro de la superfamilia de las CDAs y que está constituida por 94 secuencias de proteínas distribuidas entre organismos eucariotas como se ha indicado anteriormente. Todas ellas contienen un dominio CDA anotado como LmjF365940-deam en referencia a la proteína de *L. major* como representante del grupo. Así mismo se identifican 4 grupos de arquitecturas de dominios (Fig. D12), en uno de los cuales se incluyen 21 secuencias entre las que se encuentran las proteínas de kinetoplastidos que se caracterizan por presentar un dominio tipo C3H1 de dedos de zinc además de una inserción de un motivo tipo C2C2 dentro del dominio desaminasa (Iyer, Zhang et al. 2011).

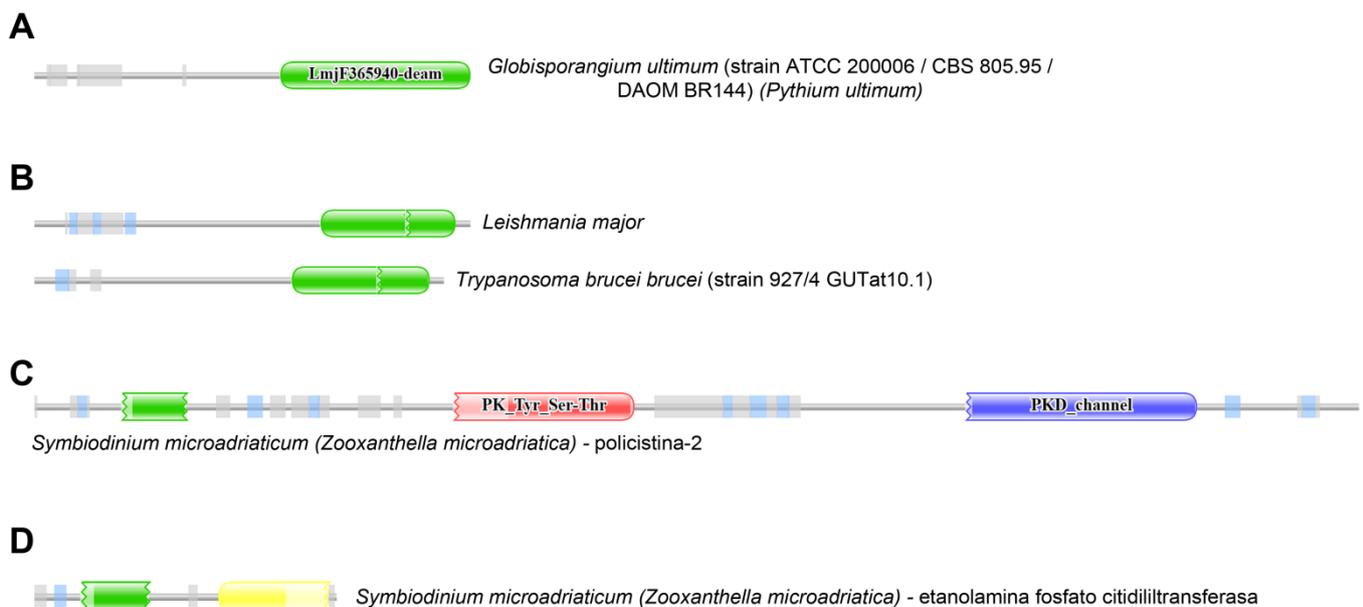


Figura D12. Arquitecturas de dominios incluidas dentro del grupo de las CDA-like representadas por la proteína de *L. major* (LmjF36.5940). El análisis de la TbCDA-like de *T. brucei* realizado empleando la base de datos Pfam reveló la existencia de 4 arquitecturas de dominios dentro de esta familia de desaminasas-like. (A) Arquitectura constituida por 50 secuencias de proteínas representadas por una proteína no caracterizada de *Globisporangium ultimum* (UniProtKB-K3X7R0). (B) Arquitectura constituida por 21 secuencias pertenecientes principalmente a kinetoplástidos que se caracterizan por presentar un dominio C3H1 de dedos de zinc además de una inserción de un motivo tipo C2C2 dentro del dominio desaminasa. En este grupo encontramos la CDA-like de *T. brucei* (Tb927.10.8850/ UniProtKB-Q38A89) y *L. major* (LmjF36.5940/ UniProtKB-Q4Q0G6). (C) Grupo constituido únicamente por la policistina-2 de *Symbiodinium microadriaticum* (UniProtKB-A0A1Q9E3B0). (D) Grupo constituido únicamente por la etanolamina-fosfato citidililtransferasa de *S. microadriaticum* (UniProtKB-A0A1Q9E3H3). En verde se resalta el dominio CDA anotado como LmjF365940-deam en referencia a la CDA-like de *L. major*. En rojo se resalta el dominio protein kinasa (tirosina y serina/treonina kinasa). En azul se resalta el dominio PKD (*Polycystin cation channel*). En amarillo se resalta el dominio citidililtransferasa-like (CTP transferasa-like). Los bordes serrados hacen referencia a dominios que no están completamente conservados en el extremo N-terminal, C-terminal o ambos. También se destacan en color gris regiones identificadas como “desordenados” en Pfam y en color azul claro regiones de baja complejidad. Esta figura se ha creado con la herramienta “*Generate domain images*” de Pfam.

Se emplearon 10 secuencias de proteínas CDA-like de kinetoplástidos para hacer un alineamiento utilizando la herramienta ClustalOmega (Goujon, McWilliam et al. 2010); (Sievers, Wilm et al. 2011); (McWilliam, Li et al. 2013) que fue posteriormente visualizado en JalView con el esquema de colores de Clustal (Fig. D13).

En el alineamiento se observa cómo el dominio CDA está perfectamente conservado en todas las secuencias analizadas. Así mismo, el dominio de dedos de zinc CCCH o C3H1 no se observa en el alineamiento para *Leishmania infantum*. Es interesante resaltar los residuos Cys424, Cys426, Cys461 y Cys46 (numeración de *T. brucei*) que podrían constituir la inserción C2C2 que mencionan Iyer et al. como un dominio con capacidad para quelar zinc. Los residuos Cys130, Cys134, Cys143, Cys145 e His149 se disponen de manera que recuerda a un dominio de zinc finger sin llegar a serlo y podría ser el motivo por el que Iyer et al. sugieren que las CDA-like de kinetoplástidos presentan más de un dominio CCCH en su secuencia.

Figura D13. Alineamiento de los ortólogos de citidina desaminasa like de kinetoplástidos incluyendo *Trypanosoma brucei*. El alineamiento se realizó utilizando ClustalOmega y fue posteriormente visualizado en JalView. Los aminoácidos que forman el núcleo del dominio desaminasa están destacados con triángulos, los residuos del dominio CCCH de dedos de zinc están indicados con cuadrados y las cisteínas que podrían constituir el dominio C2C2 que se coordinaría con zinc están marcadas con círculos. *Strigomonas culicis* (UniProtKB – S9TLD4), *Leptomonas pyrrhocoris* (UniProtKB – A0A0M9G3M3), *Leishmania braziliensis* (UniProtKB – A4HQB2), *Leishmania major* (UniProtKB – Q4Q0G6), *Leishmania infantum* (UniProtKB – A4IE07), *Trypanosoma brucei* (UniProtKB – Q38A89), *Trypanosoma theileri* (UniProtKB – A0A1X0NLM5), *Trypanosoma cruzi* Dm28c (UniProtKB – V5B3J9), *Trypanosoma conorhini* (UniProtKB – A0A422Q7Q1), *Trypanosoma rangeli* SC588 (UniProtKB – A0A061J7V9).

Tal y como se observa en el alineamiento, la secuencia está muy conservada en kinetoplástidos, especialmente el extremo C-terminal donde se encuentra el dominio desaminasa.

D.2.2. Purificación de TbCDA-like recombinante

Para la purificación de TbCDA-like recombinante se abordaron diferentes estrategias. En primer lugar, se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pGRA5 (Tabla C7) que permite la expresión de TbCDA-like fusionada a 6 histidinas en su extremo N-terminal. Para la inducción de la expresión se empleó IPTG 1mM y se testaron diferentes tiempos y temperaturas observándose en todos los casos una completa ausencia de TbCDA-like en la fracción soluble (Fig. D14).

A continuación, se procedió a expresar His-TbCDA-like en las cepas *E. coli* BL21(DE3) pLysS, *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL y *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RP pero nuevamente, no fue posible obtener proteína en la fracción soluble. Finalmente, se optó por expresar His-TbCDA-like en la cepa *E. coli* Artic Express (DE3) que se caracteriza por expresar las chaperonas Cpn10 y Cpn60 de *Oleispira antarctica*. En este caso, sí obtuvo proteína en la fracción soluble pero en cantidades insuficientes como para llevar a cabo el proceso de purificación (Fig. D14).

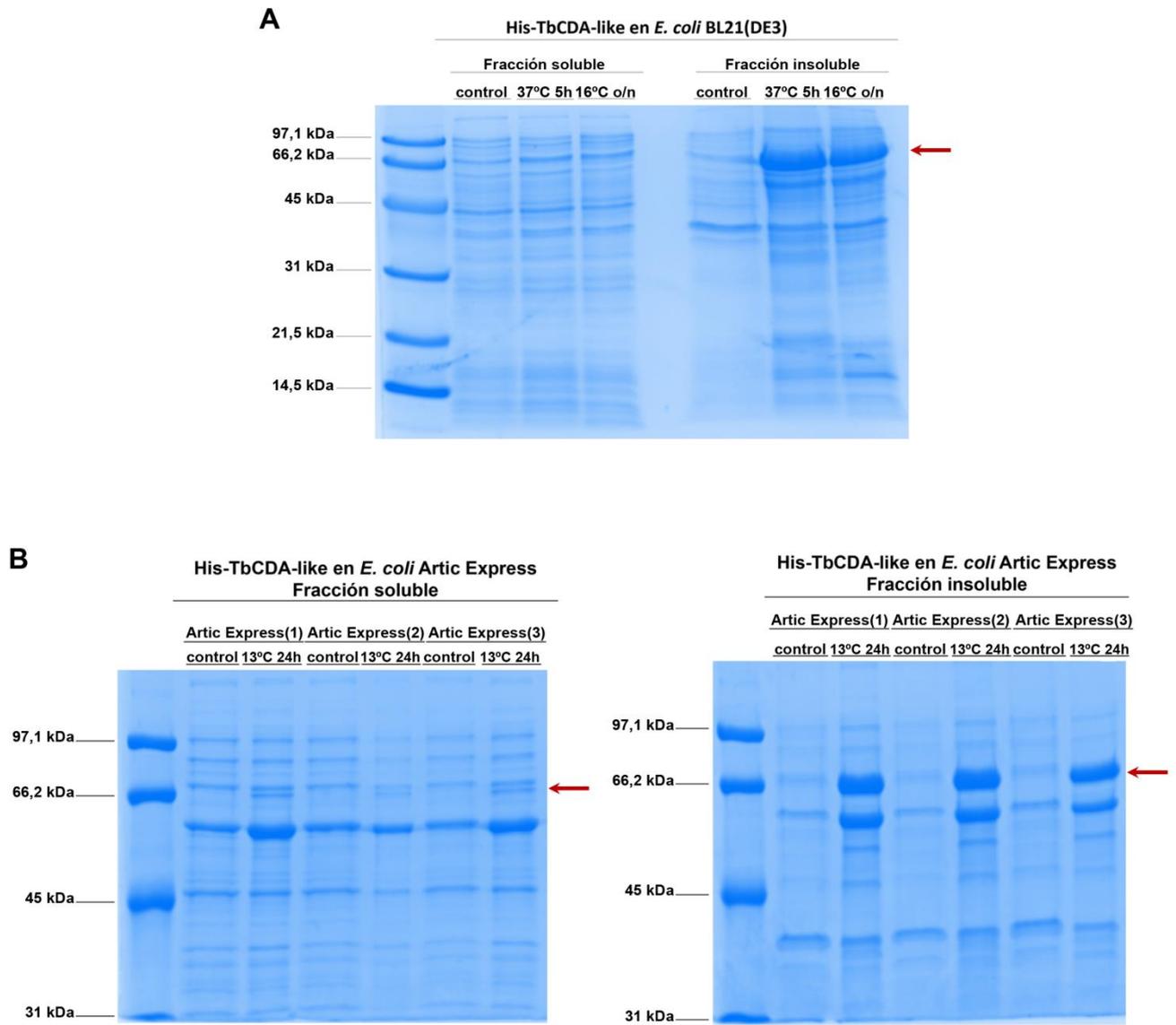


Figura D14. Geles representativos de la expresión de His-TbCDA-like en *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* Artic Express (DE3). (A) SDS-PAGE en el que se muestra la expresión de His-TbCDA-like en la fracción soluble e insoluble de *E. coli* BL21(DE3) tras inducir su expresión con IPTG 1 mM durante 5 horas a 37°C o durante toda la noche a 16°C. Se muestran los carriles control procedentes del cultivo al que no se adcionó IPTG. (B) SDS-PAGE en los que se muestra la expresión de His-TbCDA-like en la fracción soluble e insoluble de 3 colonias diferentes de *E. coli* Artic Express (DE3) tras inducir su expresión con IPTG 1mM durante 24 horas a 13°C. Se muestran los carriles control procedentes del cultivo al que no se adcionó IPTG. Las flechas en rojo señalan la altura a la que debe aparecer la banda correspondiente a His-TbCDA-like (68 kDa). o/n: *overnight*.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió cambiar la estrategia para tratar de aumentar la cantidad de proteína presente en la fracción soluble. Concretamente, se generó una construcción para expresar TbCDA-like fusionada a MBP (*Maltose Binding Protein*) en el extremo N-terminal y dicha proteína se expresó en *E. coli* BL21(DE3). En este caso, sí se aprecia una banda del tamaño correspondiente a TbCDA-like en la fracción soluble pero de nuevo la cantidad de proteína era insuficiente (Fig. D15).

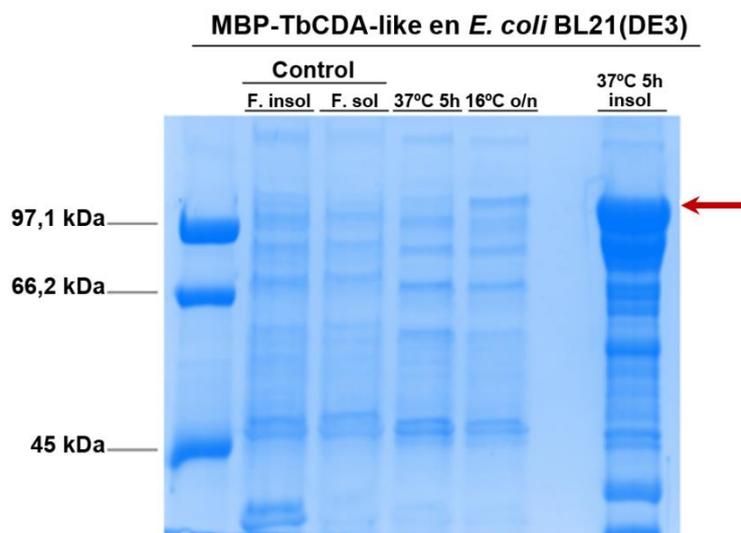


Figura D15. Gel representativo de la expresión de MBP-TbCDA-like en *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE en el que se muestra la expresión de MBP-TbCDA-like en la fracción soluble e insoluble de *E. coli* BL21(DE3) tras inducir su expresión con IPTG 1 mM durante 5 horas a 37°C o durante toda la noche a 16°C. Se muestran los carriles control procedentes de un cultivo al que no se adicionó IPTG. La flecha en rojo señalan la altura a la que debe aparecer la banda correspondiente a MBP-TbCDA-like (109,5 kDa). o/n (*overnight*) F. insol (fracción insoluble), F. sol (fracción soluble).

En cambio, la expresión de MBP-TbCDA-like en *E. coli* Artic Express (DE3) sí nos permitió obtener una mayor cantidad de proteína en la fracción soluble. Sin embargo, el rendimiento del proceso de purificación resultó ser muy bajo. Este hecho así como las dificultades obtenidas para intentar eliminar las chaperonas inherentes a la cepa *E. coli* ArticExpress (DE3), nos llevó a expresar MBP-TbCDA-like en *E. coli* K12 TB1. En esta última cepa los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con *E. coli* ArticExpress (DE3) (Fig. D16) lo que hizo prácticamente imposible el diseño de ensayos de actividad con proteína recombinante.

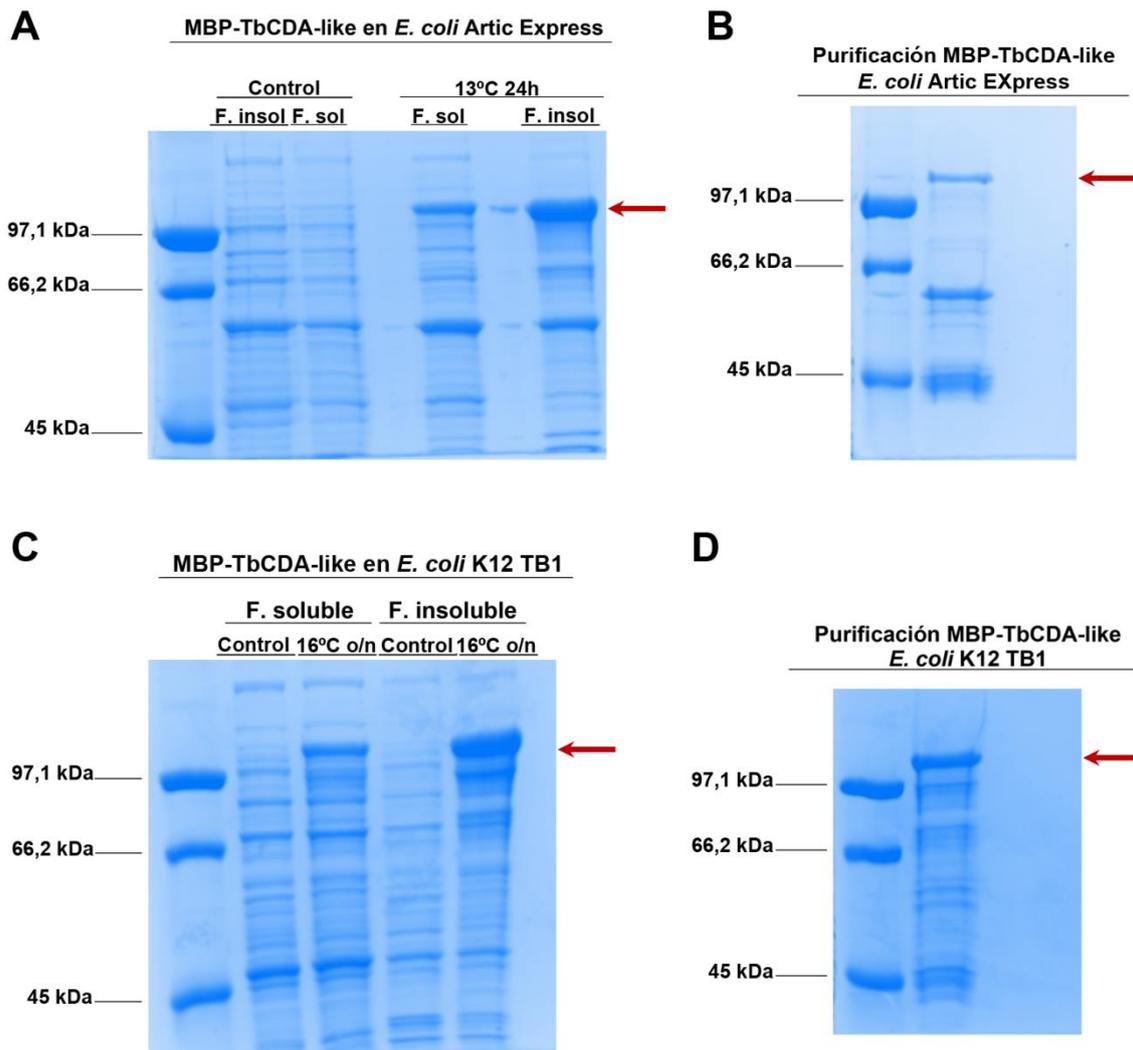


Figura D16. Geles representativos de la expresión de MBP-TbCDA-like en diferentes cepas de *E. coli* y del resultado de la purificación. (A) SDS-PAGE en el que se muestra la expresión de MBP-TbCDA-like en la fracción soluble e insoluble de *E. coli* Artic Express (DE3) tras inducir su expresión con IPTG 1 mM durante 24 horas a 13°C. Se muestran los carriles control procedentes del cultivo al que no se adcionó IPTG. (B) SDS-PAGE representativo de los diferentes intentos de purificación de MBP-TbCDA-like a partir de *E. coli* Artic Express (DE3) mediante el empleo de una resina de amilosa. (C) SDS-PAGE en el que se muestra la expresión de MBP-TbCDA-like en la fracción soluble e insoluble de *E. coli* K12 TB1 tras inducir su expresión con IPTG 1mM durante toda la noche a 16°C. Se muestran los carriles control procedentes del cultivo al que no se adcionó IPTG. (D) SDS-PAGE representativo de los diferentes intentos de purificación de MBP-TbCDA-like a partir de *E. coli* K12 TB1 mediante el empleo de una resina de amilosa. Las flechas en rojo señalan la altura a la que debe aparecer la banda correspondiente a MBP-TbCDA-like (109,5 kDa). o/n (*overnight*) F. insol (fracción insoluble), F. sol (fracción soluble).

D.2.3. Papel de TbCDA-like en la viabilidad celular de *T. brucei*

D.2.3.1. La deficiencia y la sobreexpresión de TbCDA-like afectan a la tasa de proliferación de *T. brucei*

Con el objetivo de determinar si TbCDA-like es una enzima esencial, se estudiaron los efectos tanto de la deficiencia como la sobreexpresión de la misma sobre la proliferación de *T. brucei*. En el primer caso, se emplearon dos RNAi diferentes para cuyo diseño se amplificaron 518 bp de la región N-terminal de la secuencia codificante del gen *TbCDA-like* y 517 bp de la región C-terminal, respectivamente. Dichos fragmentos se clonaron en orientaciones opuestas separados mediante la secuencia *stuffer* de ADN en el vector pGRA19 para posteriormente transfectar los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. En el caso de la sobreexpresión, la forma procíclica del parásito fue transfectada con una copia inducible del gen *TbCDA-like* fusionada en el extremo N-terminal con el epítipo c-myc. Ambos sistemas son inducibles por DOX puesto que el promotor que regula la transcripción se encuentra reprimido por el represor de tetraciclina. La figura D17A demuestra cómo el RNAi dirigido frente a la región C-terminal presenta un importante fenotipo de pérdida de viabilidad con un descenso en el crecimiento de hasta un 80% respecto a la línea parental que, sin embargo, no está acompañado de la correspondiente reducción de los niveles de expresión de TbCDA-like tal y como se demuestra mediante western-blot (Fig. D17C). Así mismo el RNAi diseñado frente a la región N-terminal de la proteína es claramente *leaky* y presenta un fenotipo algo más moderado con un crecimiento de aproximadamente el 60% respecto a la línea parental (Fig. D17B), confirmándose la eficiente reducción de los niveles de TbCDA-like mediante western-blot (Fig. D17D). Por otra parte, la figura D17E pone de manifiesto el efecto dramático que tiene la inducción de la sobreexpresión de TbCDA-like. Concretamente, la inducción con DOX causa una pérdida de viabilidad de hasta un 90% respecto a la línea no inducida y la parental. Es necesario destacar cómo disminuye la sobreexpresión de la proteína tras 6 días de inducción lo que va acompañado de una reversión del fenotipo de pérdida de

viabilidad hasta el punto de igualarse el crecimiento con la línea parental a los 12-14 días (Fig. D17E-F).

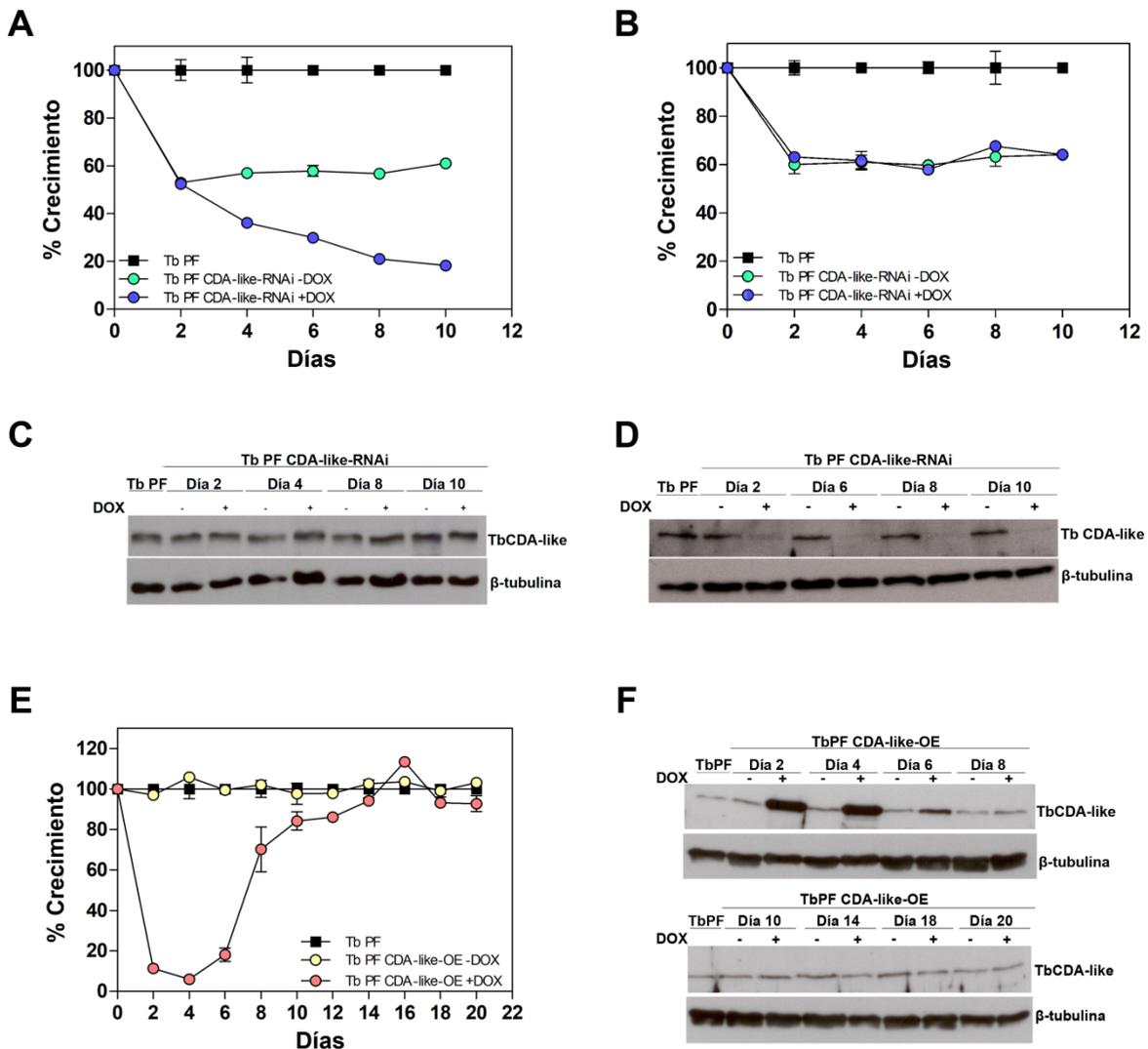


Figura D17. Curvas de crecimiento del RNAi y la sobreexpresión de TbCDA-like en tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. (A) Curva de crecimiento de la línea parental (*Tb PF*) y del primer y (B) segundo RNAi frente a TbCDA-like (*Tb PF CDA-like-RNAi*) con o sin doxiciclina (+/- DOX) (1 μ g/ml). (C) Seguimiento de los niveles de TbCDA-like mediante Western-blot a partir de extractos de *Tb PF* y *Tb PF CDA-like-RNAi* \pm DOX (primer RNAi). (D) Western blot que demuestra la eficiente reducción de los niveles de TbCDA-like tras la inducción mediante la adición de DOX (1 μ g/ml) del segundo RNAi. Se emplearon extractos de *Tb PF* y *Tb PF CDA-like-RNAi* \pm DOX (segundo RNAi). (E) Curva de crecimiento de *Tb PF* y de la línea que sobreexpresa TbCDA-like (*Tb PF CDA-like-OE*) con o sin DOX (1 μ g/ml). (F) Western-blot que demuestra cómo la sobreexpresión de TbCDA-like disminuye a partir del día

6 de la curva. En cada carril se cargaron 5×10^6 parásitos. Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA-like (1:2500) y como control de carga anti- β -tubulina (1:5000).

Dado que la técnica de RNAi no permite silenciar la expresión de la proteína por completo, nos propusimos obtener líneas celulares de tripomastigotes sanguíneos y procíclicos KO para *TbCDA-like* mediante doble reemplazamiento alélico. Para ello, se emplearon dos *cassettes* con los genes de resistencia a higromicina y blasticidina, flanqueados por unos 450 bp de las UTRs situadas en 5' y 3' respecto del gen *TbCDA-like* para que tenga lugar la recombinación. La selección de los transfectantes se lleva a cabo mediante la adición de higromicina o blasticidina al medio. En el caso de los tripomastigotes procíclicos, la obtención de la línea celular sKO en la que se reemplazó uno de los alelos por el gen de resistencia a higromicina fue posible y se observó un fenotipo de pérdida de viabilidad del 20% respecto a la línea parental (Fig. D18B). Igualmente, en las formas sanguíneas también se consiguió reemplazar con éxito el primer alelo del gen *TbCDA-like* y en este caso se observó una pérdida de viabilidad de aproximadamente el 40% respecto a la línea parental (Fig. D18A). Tras varios intentos para reemplazar el segundo alelo por el gen de resistencia a blasticidina, no fue posible obtener la línea dKO ni en las formas procíclicas ni en las sanguíneas, sugiriendo que se trata de una enzima esencial en ambos casos. Posteriormente se intentó obtener el dKO en una línea de tripomastigotes procíclicos sKO para *TbCDA-like* que expresaba una copia ectópica inducible de la misma. Sin embargo, tampoco fue posible obtener el dKO probablemente porque la sobreexpresión de TbCDA-like es muy tóxica para la célula. De hecho, en las formas sanguíneas de *T. brucei* no fue posible sobreexpresar la proteína ni en la línea parental ni en la línea sKO para *TbCDA-like*. La figura D15C-D muestra cómo la expresión de TbCDA-like se reduce a la mitad en las líneas sKO de tripomastigotes sanguíneos y procíclicos.

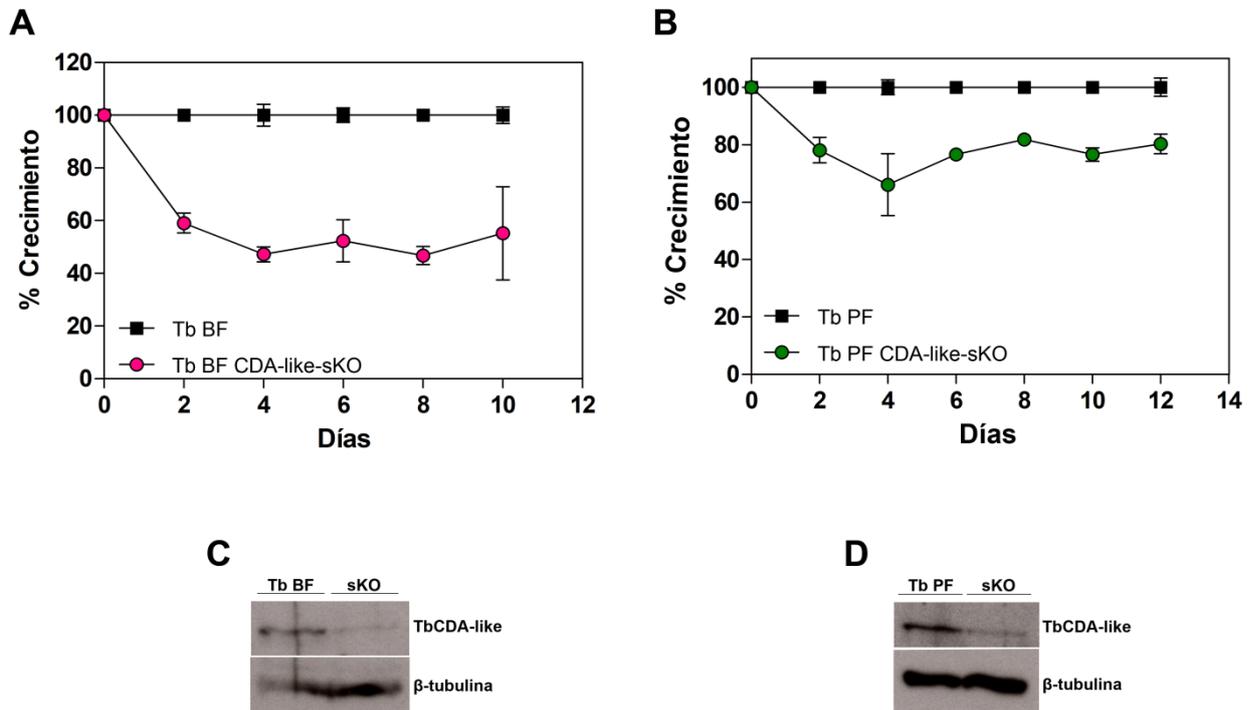


Figura D18. Curvas de crecimiento de las líneas sKO para TbCDA-like en tripomastigotes sanguíneos y procíclicos. Curvas de crecimiento de las líneas parentales (*Tb BF* o *Tb PF*) y *single KO* (sKO) en (A) tripomastigotes sanguíneos (*Tb BF CDA-like-sKO*) o (B) tripomastigotes procíclicos (*Tb PF CDA-like-sKO*). (C) Western-blot que demuestra la reducción de los niveles de expresión de TbCDA-like en la línea *Tb BF CDA-like-sKO* respecto a la línea parental *Tb BF*. (D) Western-blot que muestra los reducidos niveles de expresión de TbCDA-like en *Tb PF CDA-like-sKO* respecto a la línea parental *Tb PF*. En cada carril se cargaron 5×10^6 parásitos. Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA-like (1:2500) y como control de carga anti- β -tubulina (1:5000).

Los datos presentados sugieren que TbCDA-like es una enzima esencial tanto en formas sanguíneas como procíclicas. Así mismo, se trataría de una enzima cuyos niveles de expresión están sometidos a un exhaustivo control puesto que tanto la deficiencia como la sobreexpresión afectan a la proliferación. Es de destacar que no se han descrito ortólogos de esta proteína en mamíferos lo que la convierte en una potencial diana farmacológica.

D.2.3.2. TbCDA-like juega un papel importante en la progresión del ciclo celular de las formas procíclicas de *T. brucei*

Dado el fenotipo de pérdida de viabilidad observado tanto en la línea RNAi como en la que sobreexpresa TbCDA-like en los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, se analizó la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) con el fin de esclarecer el mecanismo implicado. En primer lugar, se llevó a cabo el análisis sobre la línea *Tb* PF CDA-like-OE tras 2, 4 y 6 días de inducción de la sobreexpresión mediante la adición de DOX al medio. Los parásitos fijados se marcaron con yoduro de propidio de manera que tras 2 días de sobreexpresión ya se observa una gran acumulación de células en fase sub-G1 (del 0% al 35,6%; $p < 0,001$) acompañado de una drástica bajada del número de células en fase G1 (del 46,06% al 15,34%; $p < 0,001$), figura D19A. Estos resultados parecen indicar la presencia de daño y fragmentación en el ADN. De hecho, si observamos la progresión del ciclo durante los 6 días de inducción de la sobreexpresión de TbCDA-like (Fig. D19B) y los histogramas de cada línea (Fig. D19D), podemos concluir que el fenotipo observado a los días 2 y 4 de sobreexpresión de TbCDA-like se corresponde con un ciclo celular aberrante, mientras que a partir del día 6 los parásitos dejan de sobreexpresar la proteína y empiezan a crecer con normalidad y a presentar un ciclo celular normal. También se observa un ligero descenso de células en fase G2/M (del 24,05% al 18%; $p < 0,05$) y una discreta acumulación en post-G2/M (del 0% al 5,56%; $p < 0,05$).

Para corroborar las observaciones realizadas mediante la técnica de FACS y profundizar en el análisis de la morfología e integridad del ADN del núcleo y el kinetoplasto, se recurrió a una tinción con DAPI tras 2 días de inducción de la sobreexpresión de TbCDA-like. En este caso se observó un significativo descenso en las poblaciones 1N1K (del 54,79% al 26,95%; $p < 0,001$) y 1N1K* (del 29,38% al 9,48%; $p < 0,001$), como cabría esperar ya que se corresponden con células que se encuentran en la fase G1, acompañado de una destacada acumulación de células 0N1K (del 0% al 25,60%; $p < 0,001$) llamadas *zoides* y que son el resultado de la progresión de la citoquinesis en ausencia de mitosis y se incluyen en la población sub-G1. Resulta también llamativa la acumulación de células XNXX (del 0% al 13,30%; $p < 0,001$) donde se engloban aquellas que presentan un número anormal de núcleos y

kinetoplastos entre las que encontramos algunas con varios núcleos concatenados, o bien con núcleos con un aspecto laxo que parecen dividirse pero sin llegar a separarse, así como núcleos cuyo aspecto parece fragmentado (Fig. D19C,E). Finalmente, también es reseñable la aparición de poblaciones 1N*1K (2,66%) donde el núcleo comienza a dividirse sin que lo haya hecho primero el kinetoplasto, 1N*1K* (2,55%) donde el núcleo comienza a dividirse sin que el kinetoplasto haya finalizado su división y 1N0K (2,37%) que es el resultado de la progresión de la mitosis sin que haya tenido lugar la segregación del kinetoplasto.

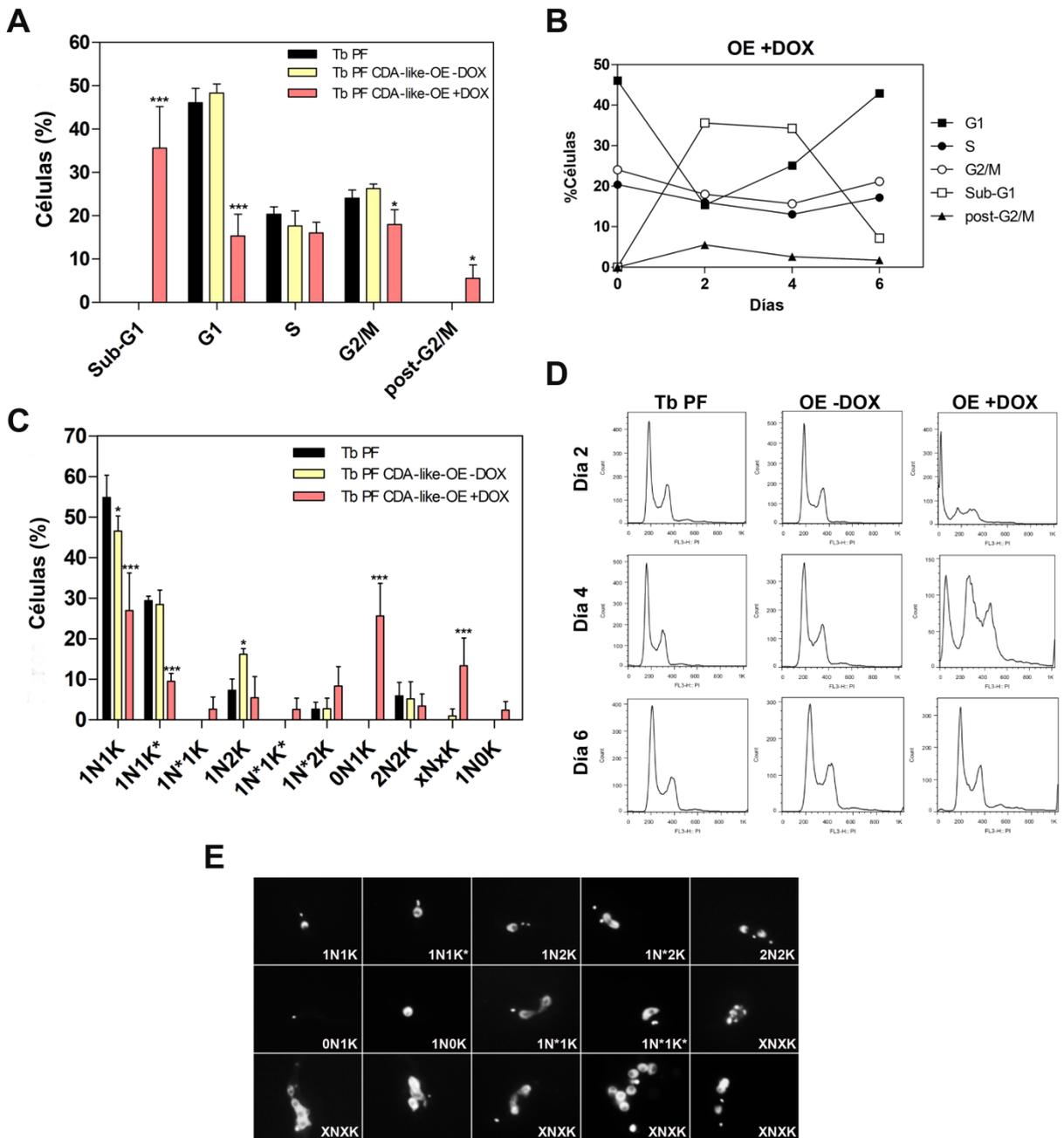


Figura D19. Alteración de la progresión del ciclo celular en respuesta a la sobreexpresión de TbCDA-like en formas procíclicas de *T. brucei*. (A) Gráfica que recoge los diferentes porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular (Sub-G1, G1, S, G2/M y post-G2/M) tras 2 días de inducción de la sobreexpresión y posterior tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo (FACS). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de 3 experimentos independientes. (B) Progresión del ciclo celular por FACS a los 2, 4 y 6 días de inducción de la sobreexpresión de TbCDA-like. Los datos corresponden a la media de 3 experimentos independientes. (C) Cuantificación de los núcleos (N) y kinetoplastos (K) tras 2 días de inducción de la sobreexpresión y posterior tinción con DAPI y visualización mediante microscopía de fluorescencia. Los asteriscos indican núcleos o kinetoplastos que están en división. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de aproximadamente 300 células procedentes de 3 experimentos independientes. (D) Histogramas que ilustran el perfil del ciclo celular en la línea parental (*Tb* PF) y en la línea que sobreexpresa TbCDA-like sin DOX y con DOX (OE \pm DOX) a los 2,4 y 6 días de inducción. (E) Imágenes representativas obtenidas con el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A1 tras la tinción con DAPI y que se corresponden con las diferentes poblaciones recogidas en (C). Los asteriscos representan diferencias significativas calculadas mediante el análisis de las varianzas (ANOVA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Así mismo, se empleó la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi para estudiar la progresión del ciclo celular tras 2,4 y 6 días de inducción del RNAi. En este caso no se observaron cambios significativos más allá de una ligera bajada en G1 respecto a la línea parental (del 50,23% al 44,68%; $p < 0,05$) tras 6 días de inducción (Fig. D20B). De nuevo en este caso se complementó el estudio del ciclo celular por FACS con tinción con DAPI a los 2 y 6 días de inducción del RNAi observándose tal y como muestra la figura D20C-D una bajada en el porcentaje de células 1N1K (del 56,707% al 46,10%; $p < 0,05$) y la aparición de poblaciones de células 0N1K o *zoides* (2,13% a los 2 días y 1,67% a los 6 días de inducción), 1N0K (0,57% tras 2 días de inducción), 2N1K (0,41% tras 2 días y 1,04% tras 6 días de inducción), así como una serie de poblaciones XNXXK de células con distribución anormal de núcleos y kinetoplastos (3,28% y 1,67% a los 2 y 6 días de inducción respectivamente).

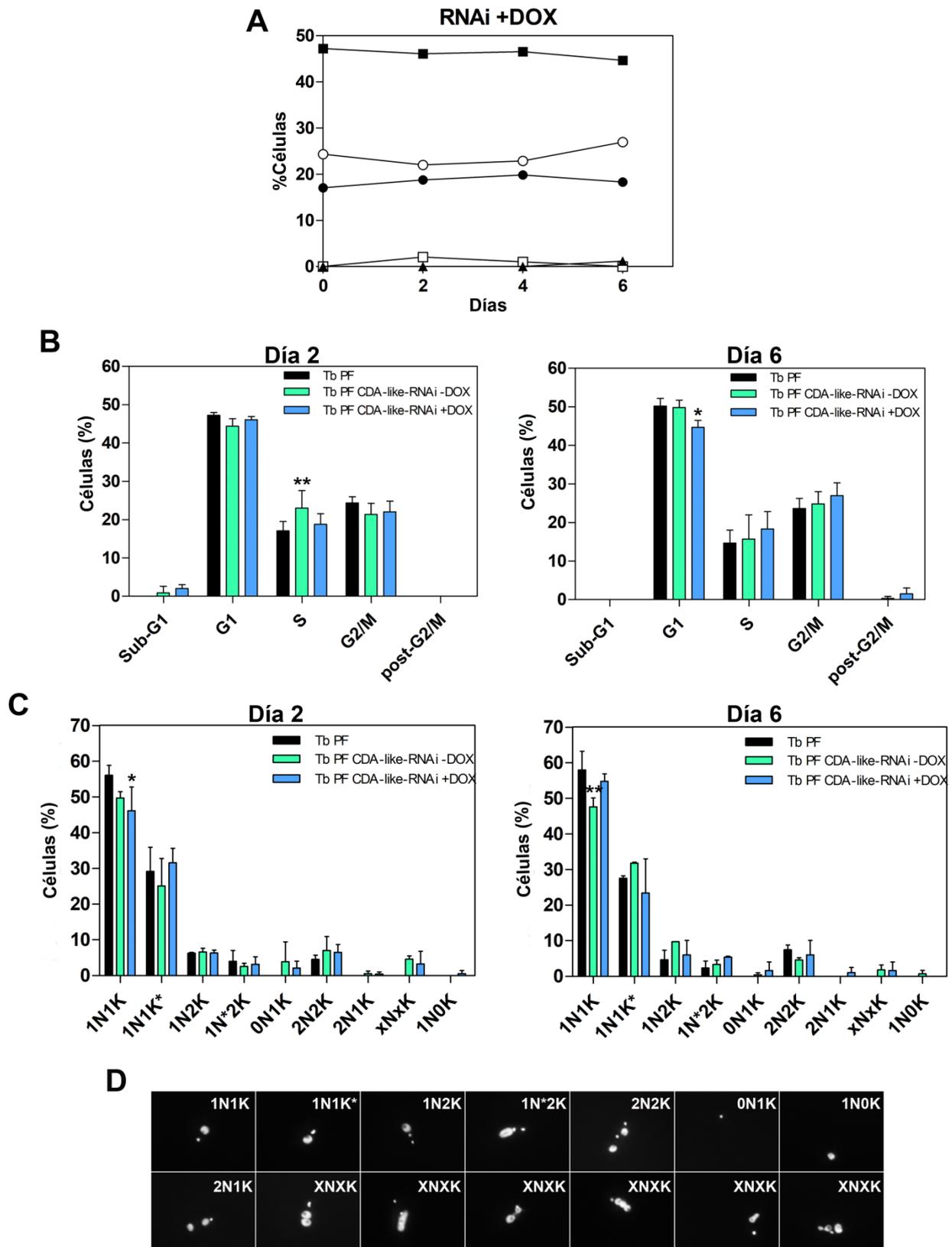


Figura D20. Alteración de la progresión del ciclo celular en la línea RNAi frente a TbCDA-like en formas procíclicas de *T. brucei*. (A) Progresión del ciclo celular por FACS a los 2, 4 y 6 días de inducción del RNAi frente a TbCDA-like. Los datos corresponden a la

media de 3 experimentos independientes. **(B)** Gráficas que recogen los diferentes porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular (Sub-G1, G1, S, G2/M y post-G2/M) tras tinción con yoduro de propido y análisis por citometría de flujo (FACS) a los 2 y 6 días de inducción del RNAi frente a TbCDA-like. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de 3 experimentos independientes. **(C)** Cuantificación de los núcleos (N) y kinetoplastos (K) mediante tinción con DAPI tras 2 y 6 días de inducción del RNAi y visualización mediante microscopía de fluorescencia. Los asteriscos indican núcleos o kinetoplastos que están en división. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de aproximadamente 300 células procedentes de 3 experimentos independientes. **(D)** Imágenes representativas obtenidas con el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A1 tras tinción con DAPI y que se corresponden con las diferentes poblaciones recogidas en (C). Los asteriscos representan diferencias significativas calculadas mediante el análisis de las varianzas (ANOVA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

D.2.3.3. Implicación de TbCDA-like en la integridad genómica de *T. brucei*

Tras la identificación de perturbaciones en la progresión del ciclo celular, se analizó si la sobreexpresión o la deficiencia de TbCDA-like producen daño en el ADN. Cuando se produce algún tipo de daño en el ADN como las roturas de doble cadena, se produce la activación de la reparación en respuesta al daño, siendo uno de los primeros eventos que tienen lugar en *Trypanosoma* spp., la fosforilación de la histona H2A en la posición Thr130 (identificada como γ H2A) que está implicada en la cascada de señalización en respuesta al daño en ADN y el arresto del ciclo celular. Así pues, la cuantificación de los foci de γ H2A en el núcleo ha sido descrita como un marcador de reparación del ADN (Glover y Horn 2012).

Concretamente, para analizar si la pérdida de viabilidad de las líneas *Tb* PF CDA-like-RNAi y *Tb* PF CDA-like-OE está relacionada con el daño en ADN, se realizó una inmunofluorescencia empleando un anticuerpo policlonal anti- γ H2A y anti-IgG de conejo como anticuerpo secundario, a los 2 y 4 días de inducción del RNAi o la sobreexpresión de TbCDA-like. Tras la cuantificación de entre 250 y 300 células por línea y condición, podemos concluir que la sobreexpresión de TbCDA-like produce un aumento significativo del número de células que presentan foci de γ H2A tanto a los 2 (32,86% más que la línea parental; $p < 0,05$) (Fig. D21A) como a los 4 días (32,49% más que la línea parental; $p < 0,001$) (Fig. D21B) de inducción. Además, dentro de la

población de células positivas para γ H2A, se produce un aumento considerable de la proporción de células con todo el núcleo marcado si lo comparamos con la línea parental (Fig. D21C-D). En el caso del RNAi, el aumento del número de células en cuyo núcleo se observan foci de γ H2A es discreto aunque no significativo, tanto a los 2 días (6,70% más que la línea parental; $p>0,05$) como a los 4 días (10,40% más que la línea parental; $p>0,05$) e igualmente va acompañado de un ligero aumento de la proporción de células cuyo núcleo se encuentra marcado por completo tras 2 días de inducción.

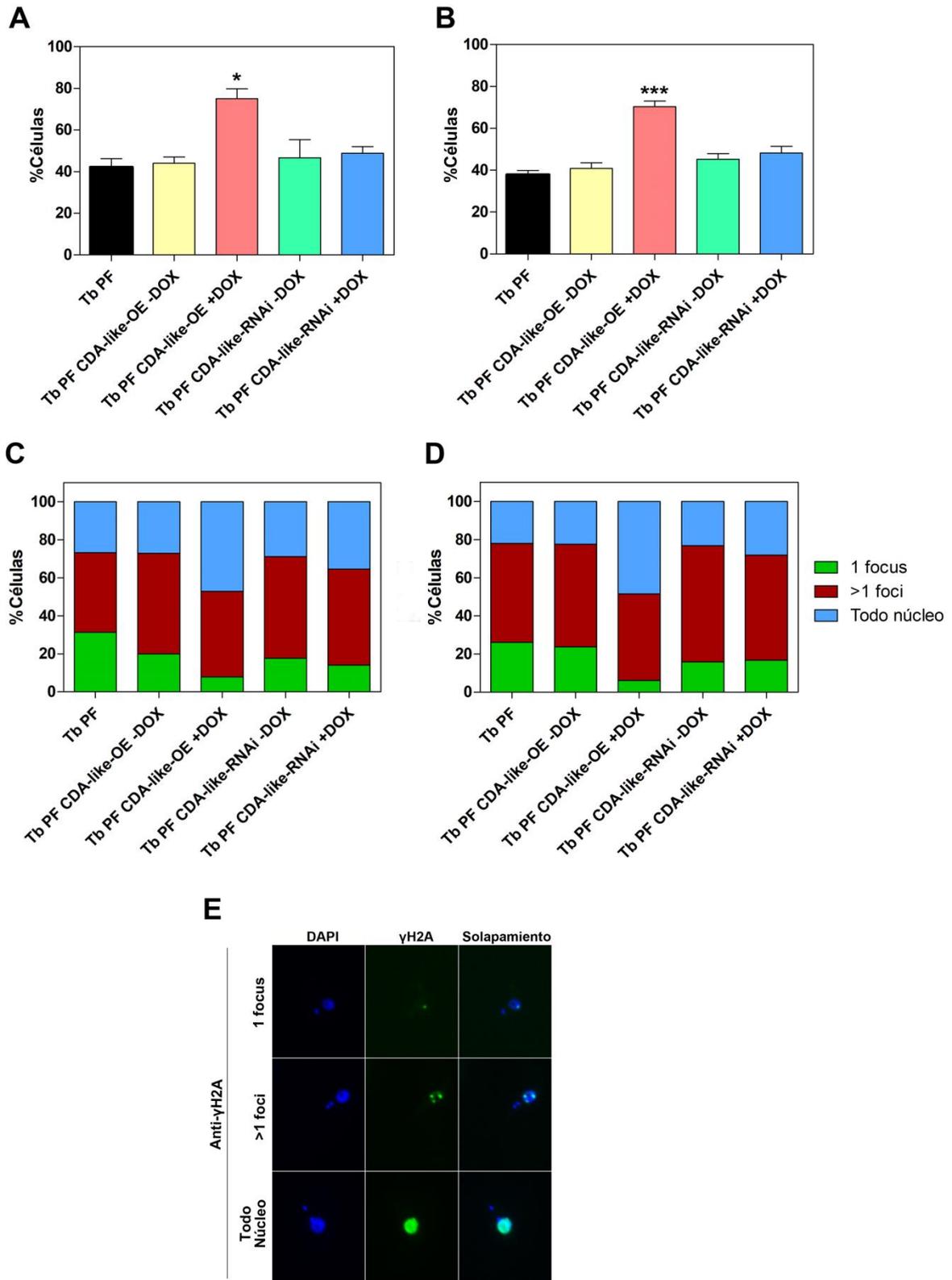


Figura D21. Respuesta al daño en ADN mediada por γ H2A en formas procíclicas RNAi o que sobreexpresan TbCDA-like. (A-B) La figura muestra el porcentaje de células positivas para γ H2A tanto en la línea parental (*Tb* PF) como en la sobreexpresión (*Tb* PF CDA-like-OE \pm DOX) y el RNAi (*Tb* PF CDA-like-RNAi \pm DOX) para TbCDA-like tras 2 (A) y 4 días (B) de

inducción con DOX 1µg/ml. Los datos se corresponden con la media (\pm SD) de 3 réplicas independientes. **(C-D)** Distribución del porcentaje de células que presentan 1 focus, >1 foci ó todo el núcleo marcado para γ H2A tras 2 **(C)** y 4 días **(D)** de inducción con DOX 1µg/ml. **(E)** Inmunofluorescencia que muestra imágenes representativas de núcleos con marcaje positivo para γ H2A con 1 focus, >1 foci ó todo el núcleo. Las Imágenes fueron obtenidas con el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A1 tras tinción con DAPI y marcaje con un anticuerpo policlonal anti- γ H2A (1:500). Los asteriscos representan diferencias significativas calculadas mediante el análisis de las varianzas (ANOVA). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

D.2.4. Papel de TbCDA-like en el metabolismo de nucleótidos y el perfil metabolómico de *T. brucei*

D.2.4.1. La deficiencia de TbCDA-like altera el perfil metabolómico de *T. brucei*

Con la intención de determinar el posible papel de TbCDA-like en el metabolismo de nucleótidos, así como obtener indicios acerca de su papel biológico a nivel global en el parásito, se llevó a cabo un análisis del perfil metabolómico en la línea celular *Tb* PF CDA-like-RNAi en la que la proteína presenta unos niveles de expresión reducidos. Así pues, mediante espectrometría de masas se identificaron 565 metabolitos diferentes de los cuales un total de 109 se encuentran significativamente alterados cuando comparamos la línea RNAi tras 6 días de inducción con DOX con respecto a la línea parental. Esta cifra se reduce cuando comparamos la misma línea con células sin inducir con DOX, de manera que en este caso únicamente 27 metabolitos se encuentran significativamente afectados. Muy probablemente esto se deba al hecho de que la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi es *leaky* y existe expresión constitutiva del RNAi en ausencia de doxiciclina. Dentro de estos 27 metabolitos afectados cabe destacar los metabolitos relacionados con el metabolismo de nucleótidos, algunos de los cuales se encuentran incrementados como el Hyp (2 veces), orotato (2,26 veces), CMP (2,8 veces), Cyt (1,42 veces) y citidina-5'-difosfocolina (1,5 veces). Por el contrario, los niveles de 2'-desoxiadenosina se encontraban reducidos 1,4 veces (Fig. D22A).

Si se analizan en detalle los 109 metabolitos que se alteran respecto a la línea parental, de nuevo observamos acumulación de algunos relacionados con el metabolismo de nucleótidos de pirimidina (orotato (1,93 veces), CMP (3,84 veces) y Cyt (1,58 veces)) y una pequeña bajada del dCMP (1,3 veces). Así mismo se observa alteraciones en algunos metabolitos implicados en el metabolismo de aminoácidos como la treonina, el glutamato, el aspartato, la histidina o la arginina (Fig. D22B-C), siendo muy llamativa también la modificación generalizada de los niveles de γ -glutamil aminoácidos, produciéndose una acumulación de la mayoría de ellos (Fig. D22D). Inicialmente se pensaba que los γ -glutamil aminoácidos eran la forma en que los aminoácidos se transportaban a través de las membranas celulares y que eran sintetizados por acción de la γ -glutamil transpeptidasa (GGT) que actuaría transfiriendo el grupo γ -glutamilo desde el glutatión a los diferentes aminoácidos (Griffith, Bridges et al. 1979, Bridges y Meister 1985). La GGT, que se encuentra anclada a la membrana de la célula, se postuló como la principal enzima implicada en un sistema de transporte de aminoácidos conocido como el ciclo del γ -glutamilo que comienza con la síntesis del glutatión. Sin embargo, a día de hoy esta teoría se considera errónea por diversos motivos (Bachhawat y Yadav 2018, Hanigan 2014).

En línea con lo expuesto anteriormente, los datos del presente estudio metabolómico muestran una clara alteración de los γ -glutamil aminoácidos mientras que los metabolitos implicados en el metabolismo del glutatión no se modifican a excepción de una acumulación del glutatión reducido (GSH) y el oftalmato.

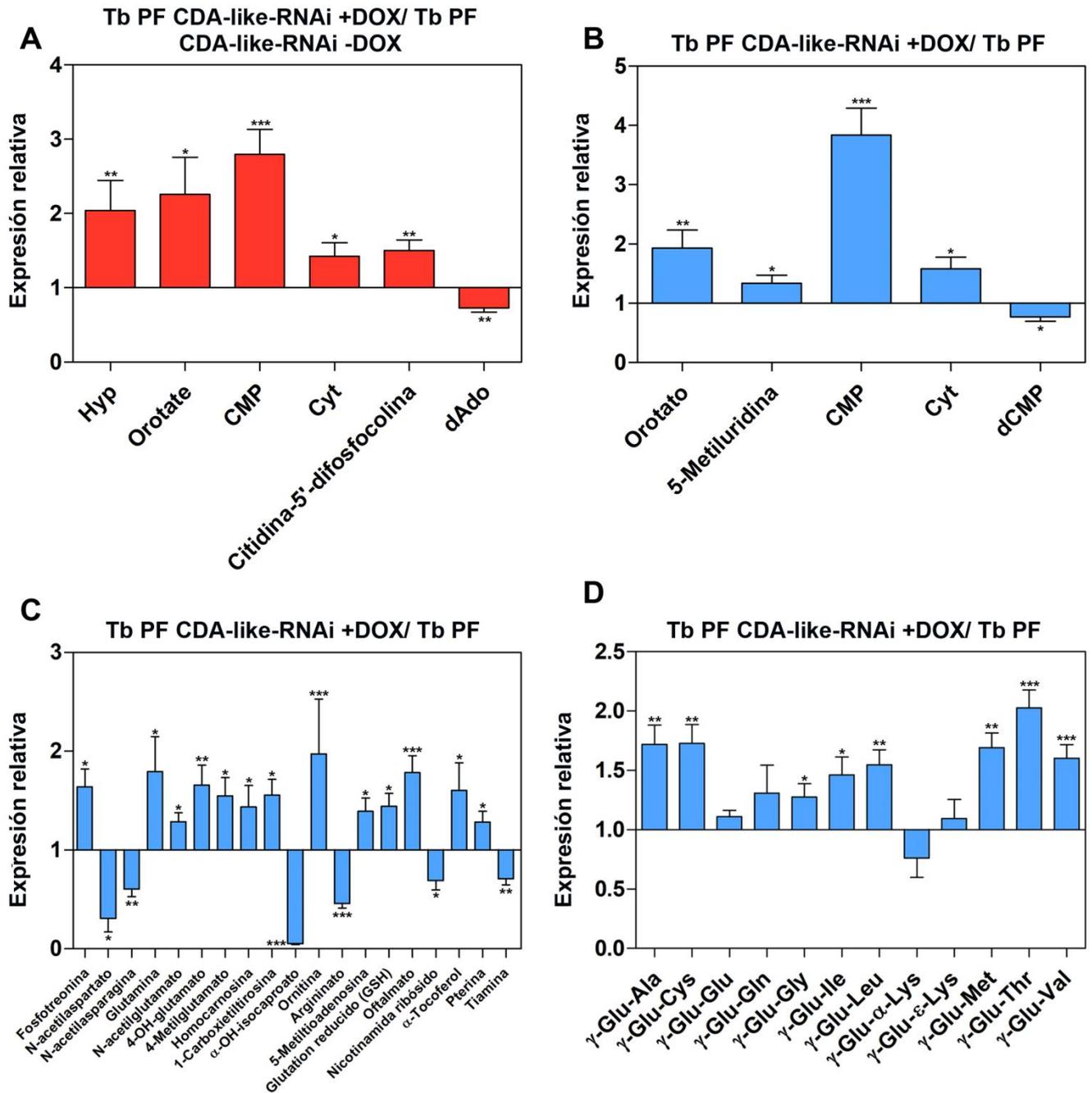


Figura D22. Principales metabolitos alterados a consecuencia de la deficiencia de TbCDA-like. La línea parental (*Tb* PF) y la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi se cultivaron en medio SDM-79 y la expresión del RNAi se indujo mediante la adición de DOX al medio (1 μ g/ml). Tras 6 días de inducción se recogieron las células y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Los perfiles metabolómicos se determinaron mediante espectrometría de masas. (A) Expresión relativa de los principales metabolitos alterados en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi tras inducción con DOX en comparación con la misma línea sin inducir. (B) Metabolitos implicados en el metabolismo de pirimidinas que se alteran significativamente en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi +DOX respecto a la línea *Tb* PF. (C) Principales metabolitos implicados en el

metabolismo de aminoácidos y del glutatión que se alteran en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi +DOX respecto a la línea *Tb* PF. **(D)** Alteración del perfil de γ -glutamil aminoácidos en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi +DOX respecto a la línea *Tb* PF. Las barras de error representan la desviación estándar (\pm SD) de 4 réplicas biológicas independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Welch (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Resulta también significativa la acumulación de diversas clases de lípidos en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi tras 6 días de inducción con DOX tales como los ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos ramificados, fosfolípidos, lisofosfolípidos, plasmalógenos y lisoplasmalógenos (Fig. D23). Los procesos apoptóticos y de estrés se han asociado a un incremento en la síntesis citosólica de lípidos (Taketo y Sonoshita 2002, Boren y Brindle 2012), de modo que dicho aumento podría ser debido a que la deficiencia de TbCDA-like produce un fenotipo de citotoxicidad que altera de forma generalizada el metabolismo de la célula.

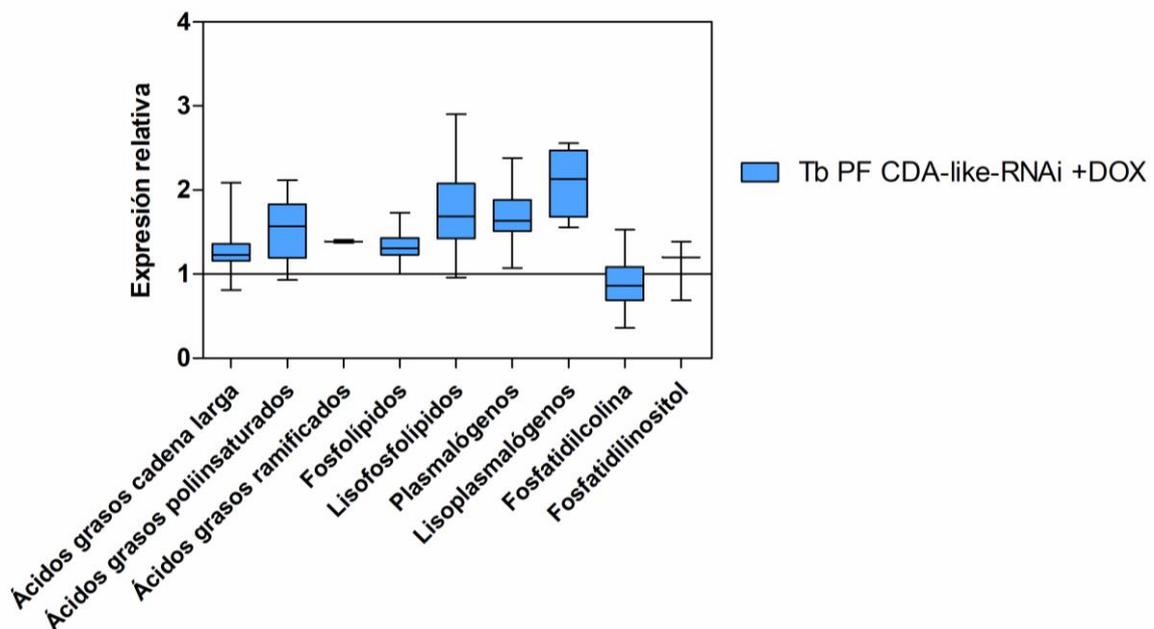


Figura D23. La deficiencia de TbCDA-like altera el perfil lipídico en la forma procíclica de *T. brucei*. La línea parental (*Tb* PF) y la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi se cultivaron en medio SDM-79 y la expresión del RNAi se indujo mediante la adición de DOX al medio (1 μ g/ml). Tras 6 días de inducción se recogieron las células y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Los perfiles metabolómicos se determinaron mediante espectrometría de masas. El gráfico muestra la expresión relativa de distintas clases de lípidos en la línea RNAi para TbCDA-like (*Tb* PF CDA-like-RNAi +DOX) en comparación con la línea parental (*Tb* PF). Las

barras de error representan la desviación estándar (\pm SD) de 4 réplicas biológicas independientes. Las cajas representan los rangos intercuartil (RIQ) y los bigotes representan los valores máximos y mínimos.

D.2.4.2. La deficiencia de TbCDA-like no puede ser compensada mediante la adición de nucleósidos o bases de pirimidina

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de metabolómica donde observamos una clara acumulación de CMP (~4 veces) en la línea RNAi para TbCDA-like con respecto a la línea parental, decidimos analizar si la adición al medio de diversas pirimidinas producía el rescate del fenotipo observado ante la deficiencia de TbCDA-like. Los parásitos se cultivaron en medio estándar SDM-79 así como en medio SDM-79 al que se adicionó dThd (0,6 mM), dUrd (1 mM), Urd (1 mM) o Ura (0,1 mM). En el caso de dThd se empleó una concentración suficientemente elevada como para que tenga lugar su transporte por difusión pasiva puesto que las formas procíclicas carecen de transportadores para dThd (Gudin, Quashie et al. 2006). La Urd es transportada a través de TbU2 mientras que el transporte de Ura tiene lugar mediante TbU1. Se emplearon concentraciones de 1 mM (Urd) y 0,1 mM (Ura) en concordancia con los datos publicados para dichos transportadores y para a su vez evitar la inhibición del crecimiento que tiene lugar por encima de dichos valores (Gudin, Quashie et al. 2006); (Ong, Sienkiewicz et al. 2013). Finalmente, en el caso de la dUrd se empleó una concentración elevada y no fisiológica como para que tenga lugar su difusión a través de la membrana de la célula.

En caso de que TbCDA-like tuviera actividad desaminasa sobre citosina o alguno de sus derivados, la deficiencia de la misma podría ser compensada por Ura, dado que éste entraría directamente a la ruta de metabolismo de pirimidinas vía UPRT para generar UMP, metabolito central de la ruta y a partir del cual se obtienen todos los demás nucleótidos de pirimidina. Así mismo, la suplementación con dUrd conduce a la obtención de dUMP vía fosforilación mediada por TK para dar finalmente dTMP por acción de la DHFR-TS. La suplementación con dThd generaría directamente dTMP tras ser fosforilada por TK mientras que la suplementación con Urd podría compensar una hipotética actividad desaminasa de TbCDA-like sobre Ctd (Fig. D24).

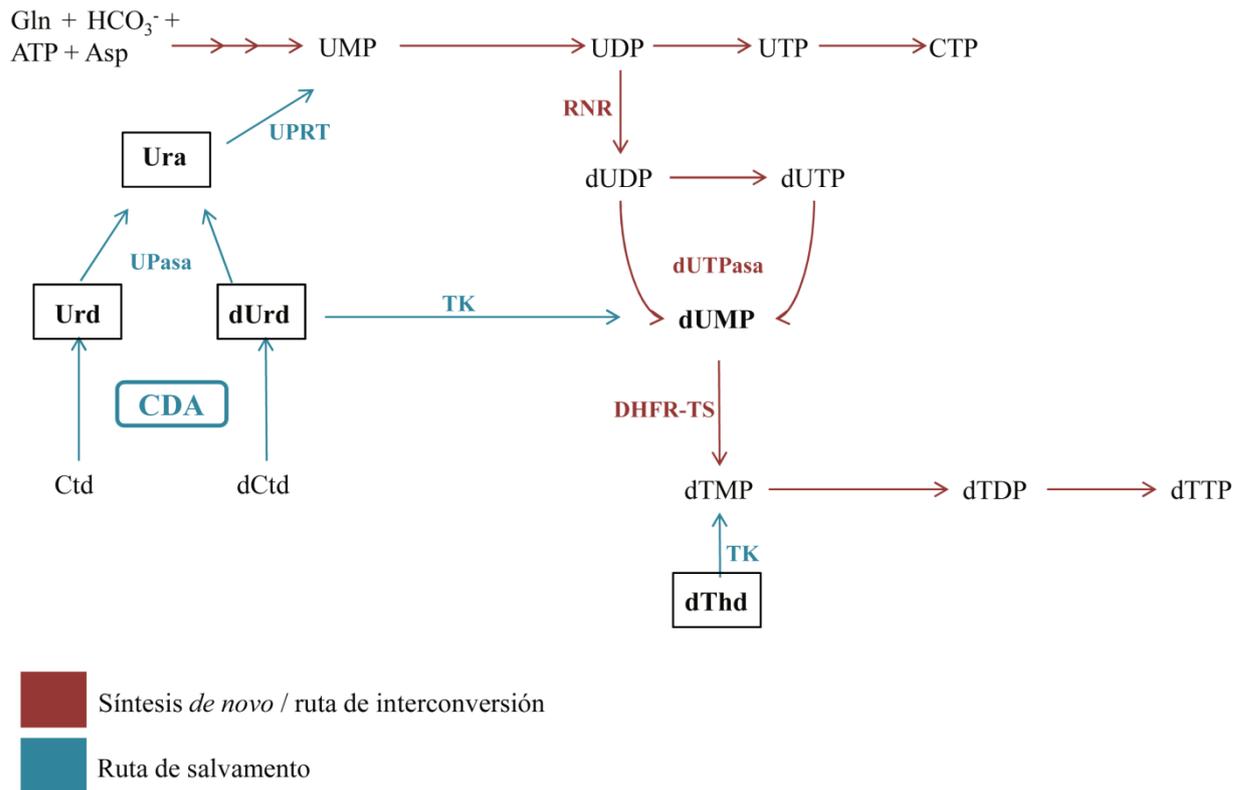


Figura D24. Esquema del metabolismo de pirimidinas en *T. brucei* destacando el papel de los diferentes nucleósidos y bases adicionados al medio. La figura muestra un esquema simplificado del metabolismo de pirimidinas en *T. brucei* resaltando el papel de las bases y nucleósidos que se adicionaron al medio para tratar de revertir el fenotipo del RNAi frente a TbCDA-like. El Ura entraría directamente a la ruta vía UPRT para generar UMP. La suplementación con dUrd conduce a la obtención de dUMP vía fosforilación mediada por TK para dar finalmente dTMP por acción de la DHFR-TS. La suplementación con dThd generaría directamente dTMP tras ser fosforilada por TK. La suplementación con Urd podría compensar una hipotética actividad desaminasa de TbCDA-like sobre Ctd.

A pesar de que la desaminación de Ctd y dCtd es función de TbCDA tal y como se ha descrito previamente en el apartado D.1, este hecho no implica que TbCDA-like no pueda presentar alguna actividad sobre dichos sustratos actuando por ejemplo en otro compartimento de la célula, dado que TbCDA es una enzima exclusivamente mitocondrial (Fig. D10).

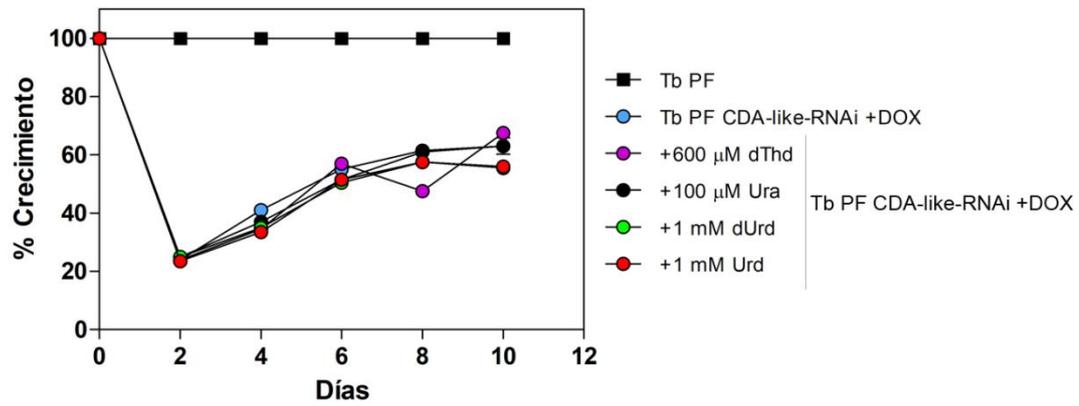
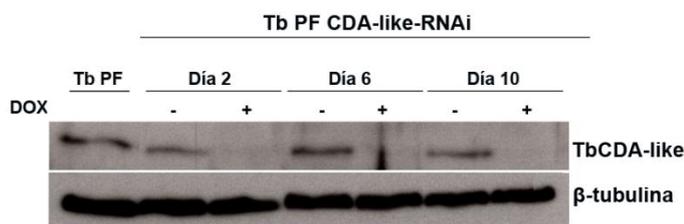
A**B**

Figura D25. Efecto de la complementación de diferentes nucleósidos y bases de pirimidina sobre el RNAi para TbCDA-like. (A) Curva de crecimiento de las líneas parental (*Tb* PF) y RNAi frente a TbCDA-like (*Tb* PF CDA-like-RNAi) con doxiciclina (+DOX) (1 μ g/ml) en medio SDM-79 sin pirimidinas suplementado con un 10% de SBF en presencia de diferentes concentraciones de timidina (dThd), uracilo (Ura), desoxiuridina (dUrd) o uridina (Urd). (B) Western-blot que muestra el silenciamiento efectivo de TbCDA-like durante la curva. En cada carril se cargaron 5×10^6 parásitos. Se emplearon los anticuerpos anti-TbCDA-like (1:2500) y anti- β -tubulina (1:5000), siendo este último el empleado como control de carga.

Tras analizar el crecimiento de la línea celular de *T. brucei* (forma procíclica) que expresa un RNAi frente a TbCDA-like, así como de la línea parental durante 10 días en medio SDM-79 suplementado con 10% de SBF en presencia o ausencia de las concentraciones anteriormente mencionadas de dThd, Urd, dUrd ó Ura (Fig. D25), observamos que en ninguno de los casos se produjo una reversión del fenotipo de pérdida de viabilidad.

D.2.4.3. Variaciones en los niveles de expresión de TbCDA-like alteran el perfil de ribonucleótidos

Teniendo en cuenta la evidente acumulación de CMP observada en la línea RNAi para TbCDA-like tras inducción con DOX durante 6 días, los resultados parecen indicar que TbCDA-like podría jugar algún papel en el metabolismo de pirimidinas en *T. brucei*. Por este motivo, decidimos llevar a cabo un estudio del perfil de ribonucleótidos (rNTPs) mediante cromatografía de intercambio iónico tanto en la línea parental *Tb* PF, como en las líneas sKO, RNAi y OE para TbCDA-like.

Los resultados revelaron que tras dos días de tratamiento con DOX, en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi se produce una discreta acumulación de CTP que se acompaña de una reducción del *pool* de UTP (Fig. D26). Por el contrario, el tratamiento con DOX también durante dos días en la línea *Tb* PF CDA-like-OE, produjo una significativa reducción del *pool* de CTP acompañada de una destacada acumulación de UTP (Fig. D26). Los resultados en la línea *Tb* PF CDA-like-sKO únicamente revelaron una ligera bajada en los niveles de UTP respecto a la línea parental en concordancia con lo observado en el RNAi (Fig. D26). Así pues, todo parece indicar que TbCDA-like estaría de alguna forma implicada en la desaminación de CTP o alguno de los derivados de Ctd puesto que por el momento no se ha descrito ninguna enzima con actividad desaminasa sobre el CTP sino específicamente sobre el dCTP (Li, Xu et al. 2003, Johansson, Fano et al. 2005).

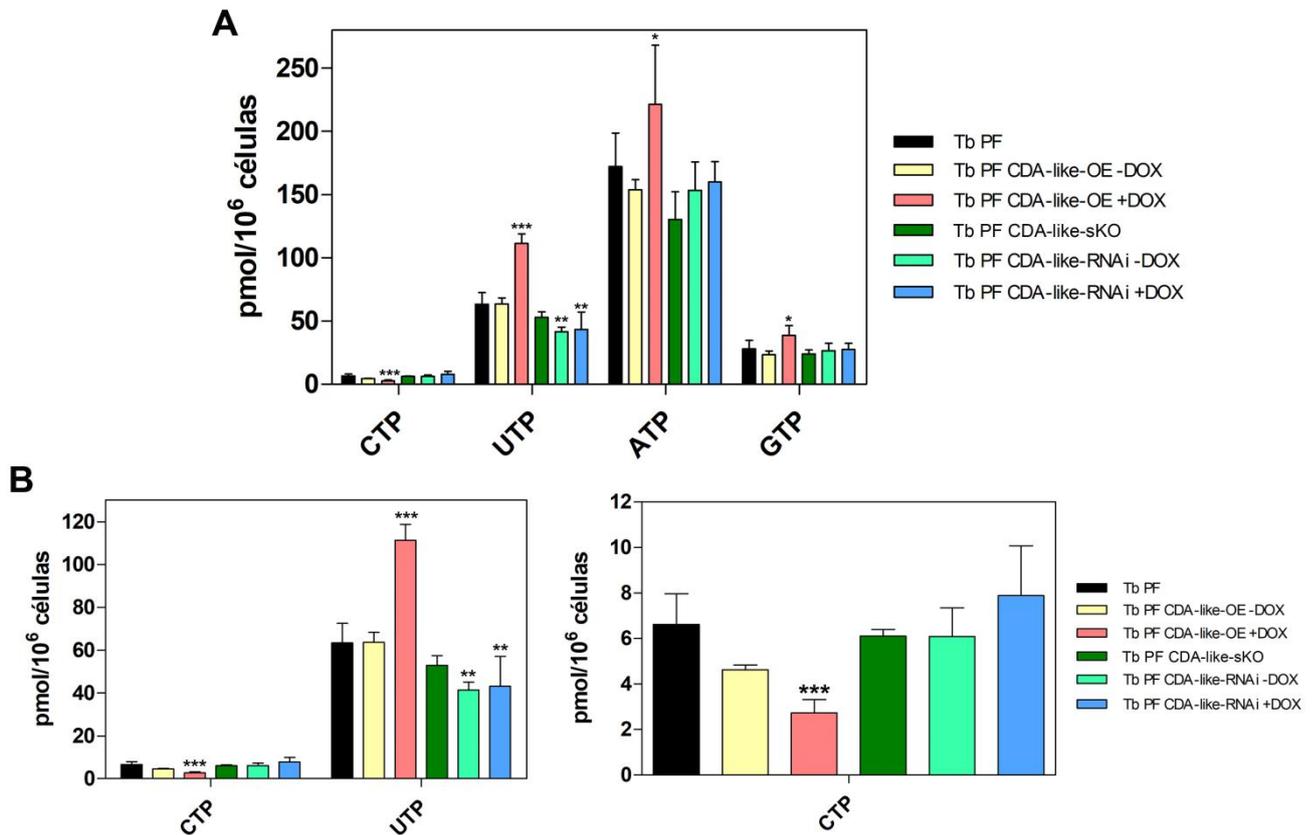


Figura D26. La sobreexpresión y el RNAi frente a *TbCDA-like* alteran el perfil de ribonucleótidos en *T. brucei*. (A) La gráfica muestra el nivel de los diferentes ribonucleótidos trifosfato en la línea parental (*Tb PF*) y las líneas RNAi (*Tb PF CDA-like-RNAi*), OE (*Tb PF CDA-like-OE*) y sKO (*Tb PF CDA-like-sKO*) frente a *TbCDA-like*. Los extractos se recogieron tras 2 días de inducción de la sobreexpresión o el RNAi con DOX 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las mediciones se realizaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Los datos se corresponden con la media ($\pm\text{SD}$) de 3 réplicas independientes. (B) Detalle de los niveles de CTP y UTP en las diferentes líneas. Mientras que la línea *Tb PF CDA-like-OE +DOX* muestra un significativo descenso en los niveles de CTP que se acompañan de una acumulación de UTP, en la línea *Tb PF CDA-like-RNAi +DOX* se produce una significativa bajada del UTP así como una discreta acumulación del CTP. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto a la línea *Tb PF* calculadas mediante el análisis de las varianzas (ANOVA) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Es también llamativo el hecho de que en la línea *Tb PF CDA-like-OE* tratada con DOX durante dos días se produce una cierta acumulación de ATP, acompañada de la aparición en el cromatograma de un pico que no se observa ni en la línea parental ni en la línea OE control sin DOX. Así mismo tampoco se observa en la línea *Tb PF CDA-*

like-RNAi \pm DOX. Podría tratarse de algún rNTP no canónico de ATP tal como el 2-oxo-ATP (Fig. D27F).

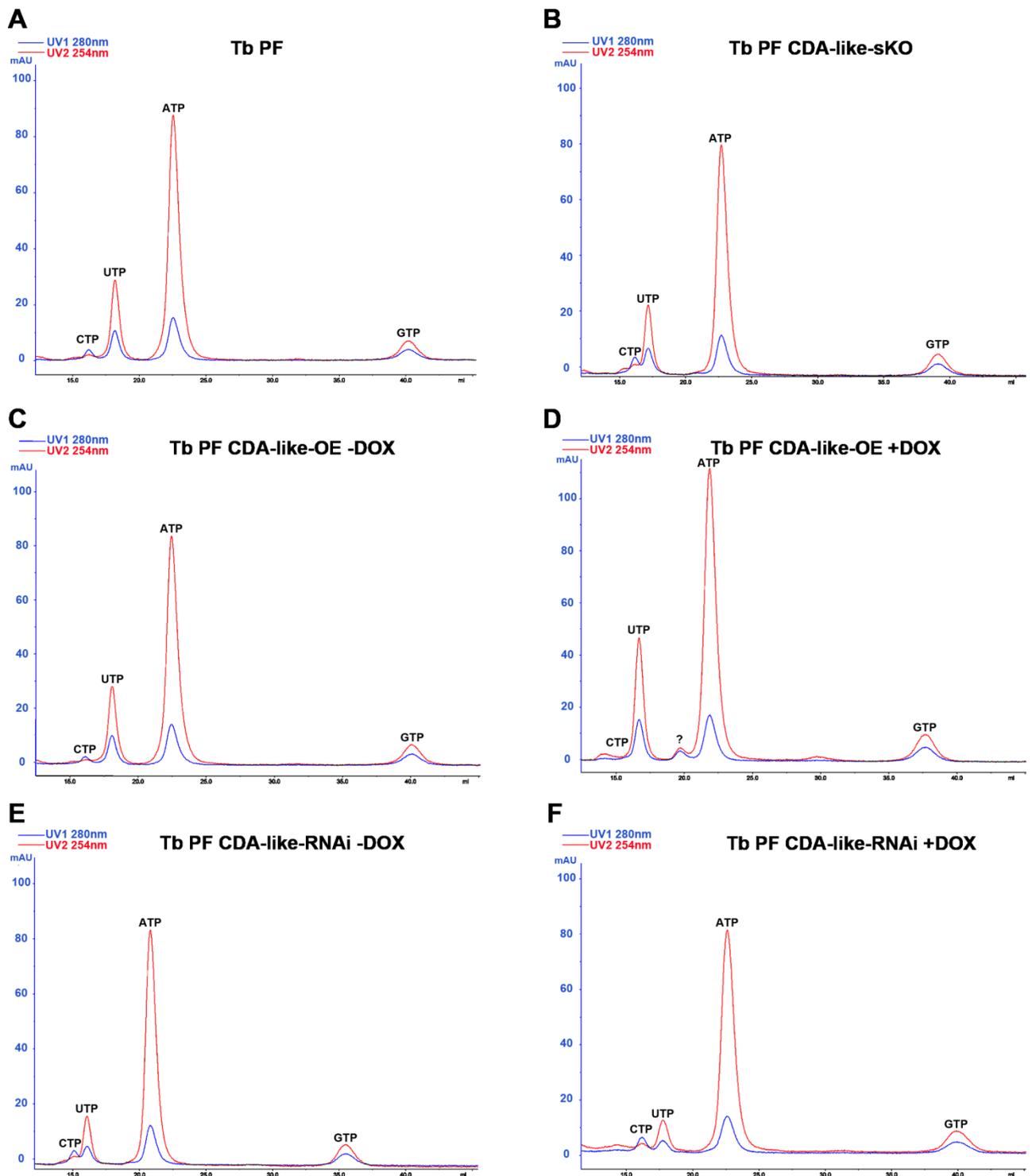


Figura D27. Cromatogramas representativos del perfil de ribonucleótidos de diferentes líneas de *T. brucei*. La imagen muestra los cromatogramas de las líneas *Tb* PF (A), *Tb* PF CDA-like-sKO (B), *Tb* PF CDA-like-RNAi -DOX (C) *Tb* PF CDA-like-RNAi +DOX (D), *Tb* PF CDA-like-OE -DOX (E) y *Tb* PF CDA-like-OE +DOX (F). Se observa cómo el pico del

CTP es más alto respecto al del UTP en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi +DOX en comparación con el resto. Por otra parte, en el cromatograma correspondiente a *Tb* PF CDA-like-OE +DOX, desaparece el pico correspondiente al CTP y aparece un pico marcado con un signo de interrogación (?) que no aparece en el resto de cromatogramas.

D.2.5. Localización intracelular de TbCDA-like e implicación en el metabolismo de ARN

D.2.5.1. Localización intracelular de TbCDA-like

En células humanas, existen únicamente dos desaminasas que actúan sobre derivados de Cyt que son la HsCDA y la dCMP desaminasa o DCTD, mientras que carecen de otras desaminasas como la CoDA o la dCTP desaminasa. En cuanto a la localización intracelular, en el caso de HsCDA se ha determinado como fundamentalmente nuclear (*The human protein atlas* (Uhlen, Fagerberg et al. 2015, Somasekaram, Jarmuz et al. 1999), mientras que la DCTD parece estar ampliamente distribuida entre el núcleo y el citoplasma celular (*The human protein atlas* (Uhlen, Fagerberg et al. 2015)). Como se ha detallado anteriormente en el apartado D.1.7., la CDA de *T. brucei* posee una localización exclusivamente mitocondrial. Con la intención de determinar la localización de TbCDA-like, se generaron dos líneas *knock-in* (KI) que expresan la proteína fusionada en su extremo N o C terminal a 6 ó 12 c-mycs respectivamente en el locus endógeno. Dichas líneas se utilizaron para llevar a cabo estudios de inmunofluorescencia de acuerdo con lo descrito en el apartado C.2.4.3. empleándose un anticuerpo monoclonal anti-c-myc como anticuerpo primario y anti-IgG de ratón como secundario.

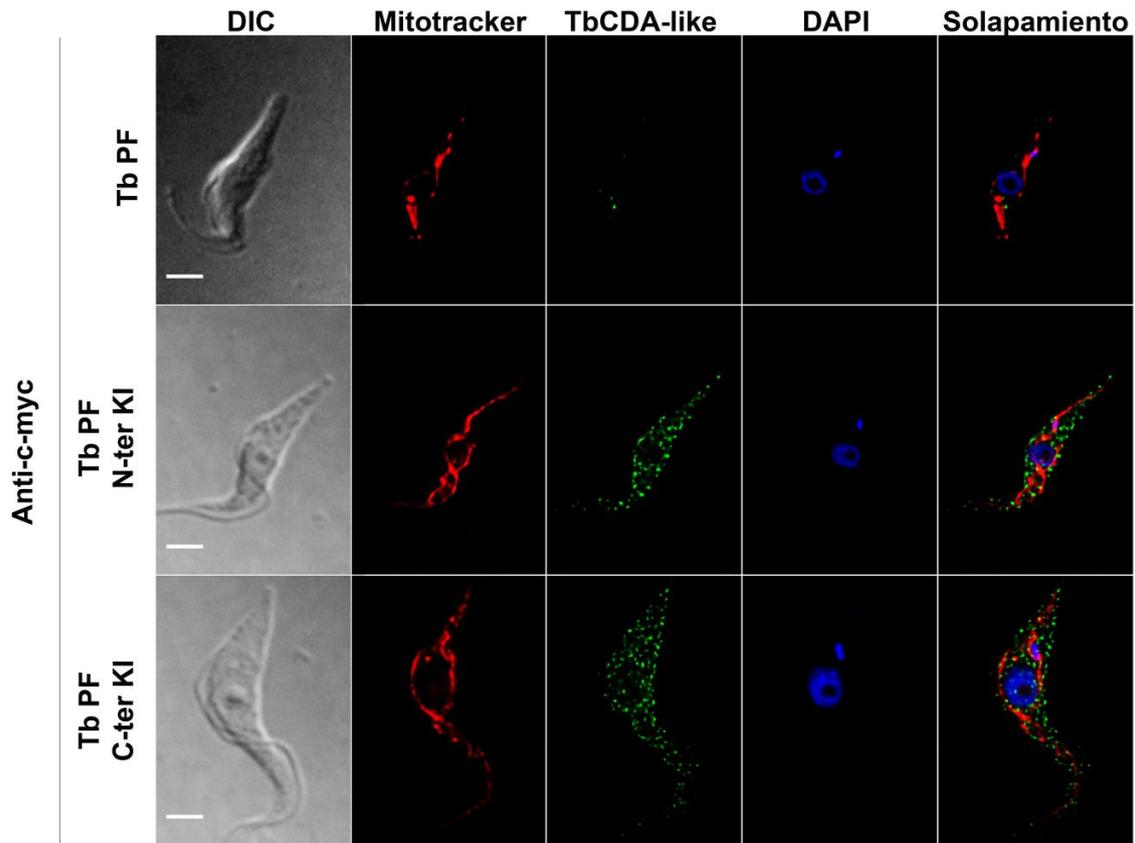


Figura D28. Localización de TbCDA-like en líneas *knock-in*. La imagen muestra la localización citosólica de TbCDA-like en una línea *knock-in* (KI) para TbCDA-like fusionada a 6 c-mycs en el extremo N-terminal (*Tb PF N-ter KI*) (fila central) y una línea KI para TbCDA-like fusionada a 12 c-mycs en el extremo C-terminal (*Tb PF C-ter KI*) (fila inferior). Se empleó la línea parental (*Tb PF*) como control negativo. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-c-myc y anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. La mitocondria se marcó con MitoTracker Red CMXRos y el núcleos y kinetoplasto con DAPI. Las imágenes fueron recogidas en un microscopio Olympus IX81 y deconvolucionadas con el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging). Las imágenes se analizaron con el software Fiji/ImageJ. Barra, 10 μm .

La figura D28 muestra la distribución de TbCDA-like en las líneas KI empleándose tripomastigotes procíclicos como control negativo (Fig. D28, fila superior). Se observa que tanto en la línea KI en el extremo N-terminal (Fig. D28, fila central), como en la línea KI en el extremo C-terminal (Fig. D28, fila inferior) la distribución de TbCDA-like es claramente citosólica con un patrón granular.

Para confirmar nuestras observaciones, se obtuvo un anticuerpo policlonal frente a TbCDA-like (Material y métodos C.2.4.1.2.) que se utilizó como anticuerpo primario en estudios de inmunofluorescencia realizados tanto en la línea parental de tripomastigotes procíclicos como en la línea que sobreexpresa TbCDA-like. La sobreexpresión de TbCDA-like se indujo dos días antes mediante la adición de DOX a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ al medio de cultivo.

De nuevo observamos que en la línea parental Tb PF (Fig. D29, fila superior) TbCDA-like se localiza en el citoplasma de *T. brucei* con una distribución granular especialmente concentrada en la periferia nuclear característica de las proteínas de unión a ARN. La sobreexpresión muestra la misma distribución, pero con mayor intensidad (Fig. D29, fila inferior).

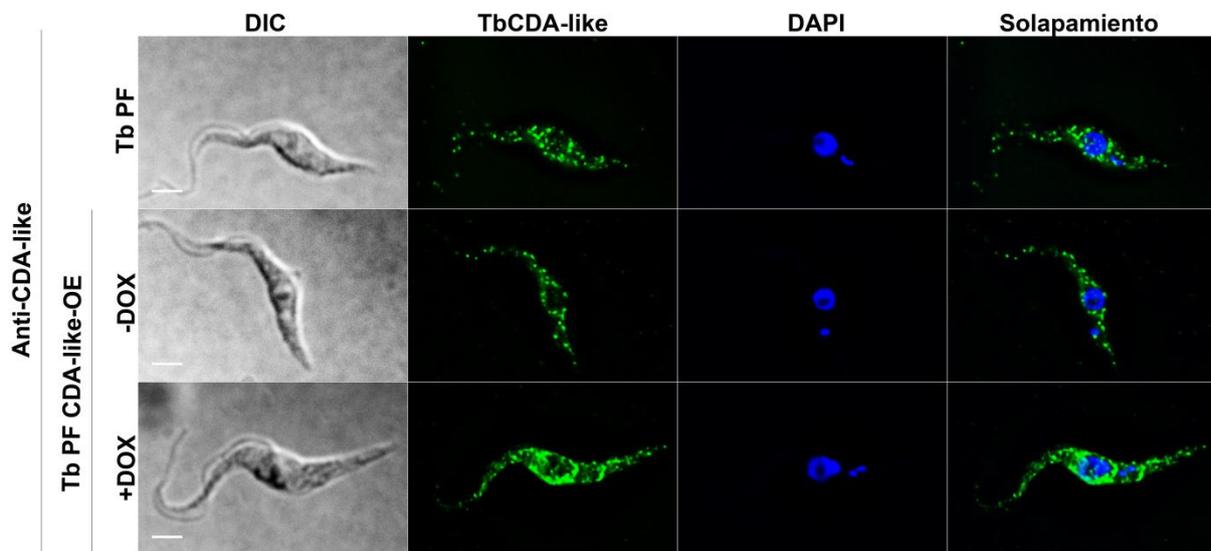


Figura D29. Localización de TbCDA-like en tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. La imagen muestra la localización citosólica de TbCDA-like en la línea parental (*Tb PF*) (fila superior) así como en formas procíclicas que sobreexpresan TbCDA-like (*Tb PF CDA-like-OE*) sin (fila central) o con (fila inferior) doxiciclina (DOX). La inmunofluorescencia se realizó tras 2 días de inducción de la sobreexpresión de TbCDA-like con DOX (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-TbCDA-like y monoclonal anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. Los núcleos y kinetoplastos se marcaron con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Olympus IX81 y deconvolucionadas con el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging). Las imágenes se analizaron con el software Fiji/ImageJ. Barra, 10 μm .

D.2.5.2. TbCDA-like presenta actividad de unión a ARN

Teniendo en cuenta la presencia de dominios de unión a ácidos nucleicos en la proteína TbCDA-like, se decidió llevar a cabo un estudio para determinar si la proteína se une a ARN mediante la técnica de OOPS (*Orthogonal Organic Phase Separation*) basada en el método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo para la extracción de ARN de manera que tras irradiar las células con luz UV a 254 nm, las proteínas unidas a ARN se localizan en la interfase de la separación (Fig. D30A) (Queiroz, Smith et al. 2019, Urdaneta, Vieira-Vieira et al. 2019).

Empleamos la línea *Tb* PF *CDA-like* N-ter KI que expresa la proteína fusionada a 6 c-mycs en el extremo N terminal en el locus endógeno. Tras llevar a cabo la extracción se realizó un western-blot donde la banda correspondiente a TbCDA-like se observa en la fase orgánica tanto de las células control no sometidas a *cross-link* como de las células tratadas, si bien en este caso la cantidad de proteína es menor (Fig. D30B-C). Así mismo sólo se observa la banda correspondiente a TbCDA-like en la interfase correspondiente a las células irradiadas a 254 nm.

Posteriormente se realizó un tratamiento con RNasa A y se repitió la extracción observándose en este caso que la banda correspondiente a TbCDA-like deja de ser visible mayoritariamente en la interfase para localizarse de nuevo en la fase orgánica, lo que demuestra que realmente TbCDA-like se localizaba en la interfase como consecuencia de su unión directa a ARN (Fig. D30D).

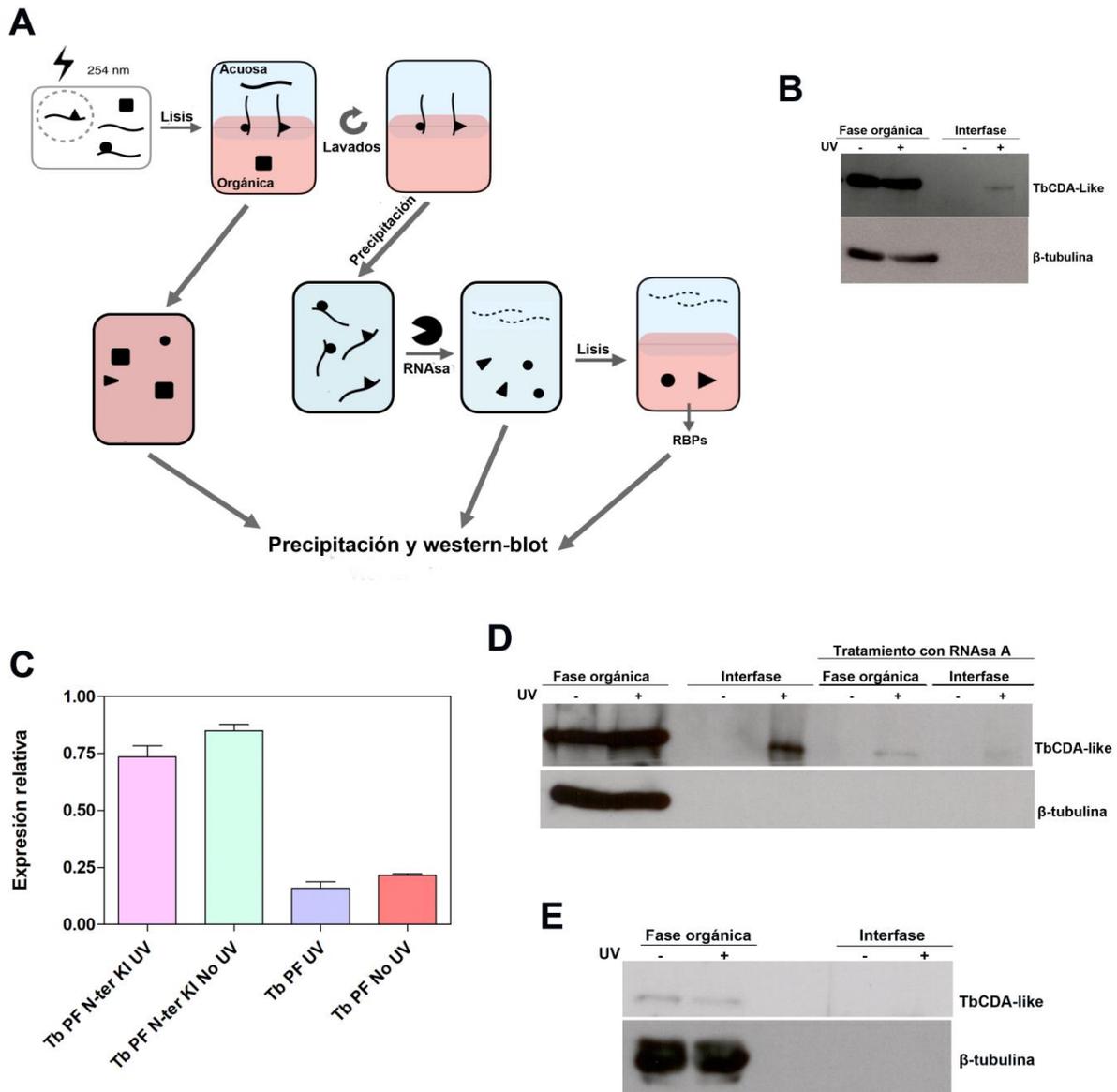


Figura D30. TbCDA-like es una proteína que se une a ARN. (A) Representación esquemática de la técnica de OOPS (*orthogonal organic phase separation*) para identificar proteínas de unión a ARN (RBPs), combinando el *cross-link* con luz UV con la extracción de ARN basada en el método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (adaptado de (Queiroz, Smith et al. 2019)). (B) Western-blot que demuestra que TbCDA-like se une a ARN empleando β -tubulina como control negativo en la línea KI para TbCDA-like en el extremo N-terminal (*Tb* PF CDA-like N-ter KI). (C) Cuantificación de las bandas de fase orgánica en los western-blot del OOPS de la línea *Tb* PF CDA-like N-ter KI y la parental (*Tb* PF) que muestra que hay una cantidad de proteína ligeramente inferior en la fase orgánica sometida a *cross-link* con luz UV. Los datos representan la media (\pm SD) de 3 réplicas independientes. (D) Western-blot en el que se observa la banda en la interfase que demuestra que TbCDA-like se une a ARN así como la aparición de una banda en fase orgánica cuando se digiere con RNAsa. Se empleó la línea *Tb* PF

CDA-like N-ter KI. Se seleccionó la β -tubulina como control negativo. (E) Western-blot resultante de llevar a cabo la técnica de OOPS sobre la línea *Tb* PF donde a pesar de no observarse la banda en la interfase sí se hace patente que la intensidad de la banda procedente de la muestra sometida a irradiación con luz UV es menor. Se utilizó la β -tubulina como control de proteína que carece de actividad de unión a ARN. La cuantificación de los western-blot se realizó empleando el software FiJi/ImageJ. Se utilizaron los anticuerpos anti-c-myc (1:5000) y anti- β -tubulina (1:5000).

También se realizó el mismo experimento empleando la línea parental *Tb* PF de manera que en este caso y empleando el anticuerpo policlonal anti-TbCDA-like, la banda correspondiente a TbCDA-like aparece en la fase orgánica correspondiente a las células control no irradiadas, así como en las células sometidas a *cross-link* observándose de nuevo menor cantidad de proteína en este caso (Fig. D30C,E). Dada la baja expresión de TbCDA-like no fue posible visualizar la banda en la interfase de las células tratadas con luz UV (Fig. D30E).

D.2.5.3. TbCDA-like se relocaliza en gránulos de estrés tras someter a los parásitos a condiciones de estrés nutricional

El ajuste de la síntesis de proteínas para adaptarse a las condiciones cambiantes es crucial para el crecimiento y la supervivencia celular y requiere de mecanismos de regulación de la traducción altamente coordinados, rápidos y específicos. A la hora de regular la expresión génica resulta fundamental mantener un control preciso del procesamiento, tráfico y degradación de los ARNm. Estos procesos están regulados por proteínas de unión a ARN que se unen al ARNm formando complejos que se organizan en estructuras denominadas gránulos, con implicaciones clave dentro del metabolismo del ARN. Los 2 tipos de gránulos mejor estudiados son los gránulos de estrés (SGs) y los cuerpos de procesamiento (*processing bodies*, *P-bodies*).

Mientras que los *P-bodies* se encuentran de forma constitutiva en las células y contienen enzimas implicadas en la degradación de los ARNm (Kruger, Hofweber et al. 2013, Ivanov, Kedersha et al. 2019). Los SGs, en cambio, se forman ante situaciones de

estrés tales como el choque térmico o el estrés nutricional y contienen componentes de la maquinaria de iniciación de la traducción como los complejos de pre-iniciación de la traducción, subunidades ribosomales pequeñas (40S), factores implicados en la iniciación de la traducción como eIF4F o eIF3, la proteína PABP1 (*poly(A) binding protein 1*), etc. (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007, Kruger, Hofweber et al. 2013, Fritz, Vanselow et al. 2015). Los SGs y los *P-bodies* son estructuras dinámicas que interaccionan mutuamente y se encuentran en equilibrio con los polisomas (Ivanov, Kedersha et al. 2019), compartiendo algunas de las proteínas que los constituyen como la helicasa Dhh1 (*DEAD box RNA helicase*), el represor de la traducción Scd6 o la exorribonucleasa XRN1 (Kramer, Queiroz et al. 2008, Fritz, Vanselow et al. 2015).

Los tripanosomátidos poseen una amplia variedad de gránulos constituidos por ribonucleoproteínas, lo cual es un posible reflejo de su casi absoluta dependencia de la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Kruger, Hofweber et al. 2013, Fritz, Vanselow et al. 2015). Se han descrito al menos cuatro tipos diferentes de gránulos en este grupo de protozoos parásitos: las estructuras tipo *P-bodies* (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007, Kramer, Queiroz et al. 2008), los gránulos de estrés que se forman en condiciones de estrés nutricional o choque térmico (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007, Kramer, Queiroz et al. 2008) y los gránulos que se forman en la periferia del núcleo como consecuencia de la inhibición del proceso de *trans-splicing* (Kramer, Marnef et al. 2012).

Los gránulos de ARN en tripanosomátidos no pueden clasificarse estrictamente como *P-bodies* o SGs dada su composición proteica, aunque los gránulos que se forman ante situaciones de estrés nutricional contienen numerosas proteínas homólogas de las que se encuentran en los SGs de células de mamífero (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007). Los principales componentes de los SGs en kinetoplástidos son: la helicasa Dhh1, el represor de la traducción Scd6, la exorribonucleasa XRNA, factores de iniciación de la traducción (eIF4E1, 2 y 3) y la proteína de unión a ARN DRBD3 entre otras (Fritz, Vanselow et al. 2015).

Tras observar que TbCDA-like se une a ARN se intentó determinar si TbCDA-like exhibe algún tipo de función relacionada con los SGs. Para ello se llevó a cabo un estudio de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-TbCDA-like, en la línea parental de tripomastigotes procíclicos tras haberla sometido a condiciones de estrés

nutricional mediante incubación en PBS a diferentes tiempos (60, 120 y 180 minutos). La figura D31 muestra cómo TbCDA-like se relocaliza en gránulos localizados principalmente en la periferia del núcleo a todos los tiempos ensayados, mientras que el control sin someter a estrés (Fig D31A, fila superior) sigue presentando el patrón de distribución granular por todo el citoplasma. La relocalización observada en las imágenes de microscopía fue corroborada mediante un análisis cuantitativo del número y área de los gránulos de entre 20 y 22 células de cada condición realizado con el software Fiji/ImageJ, aplicando un umbral de tamaño de partícula de $0,05 \mu\text{m}^2$ que reveló un aumento significativo del número de gránulos a todos los tiempos ensayados (Fig. D31B), así como una reducción del área de los gránulos que resultó ser significativa tras 60, 120 y 180 minutos de tratamiento (Fig. D31C). Por lo tanto, mientras que en el control sin tratar TbCDA-like está ampliamente distribuida por todo el citoplasma formando lo que el software consideraría como un gran gránulo o unos pocos gránulos de mayor tamaño, tras someter a las células a estrés nutricional, la proteína se relocaliza en un mayor número de gránulos de menor tamaño que se concentran fundamentalmente en la periferia nuclear.

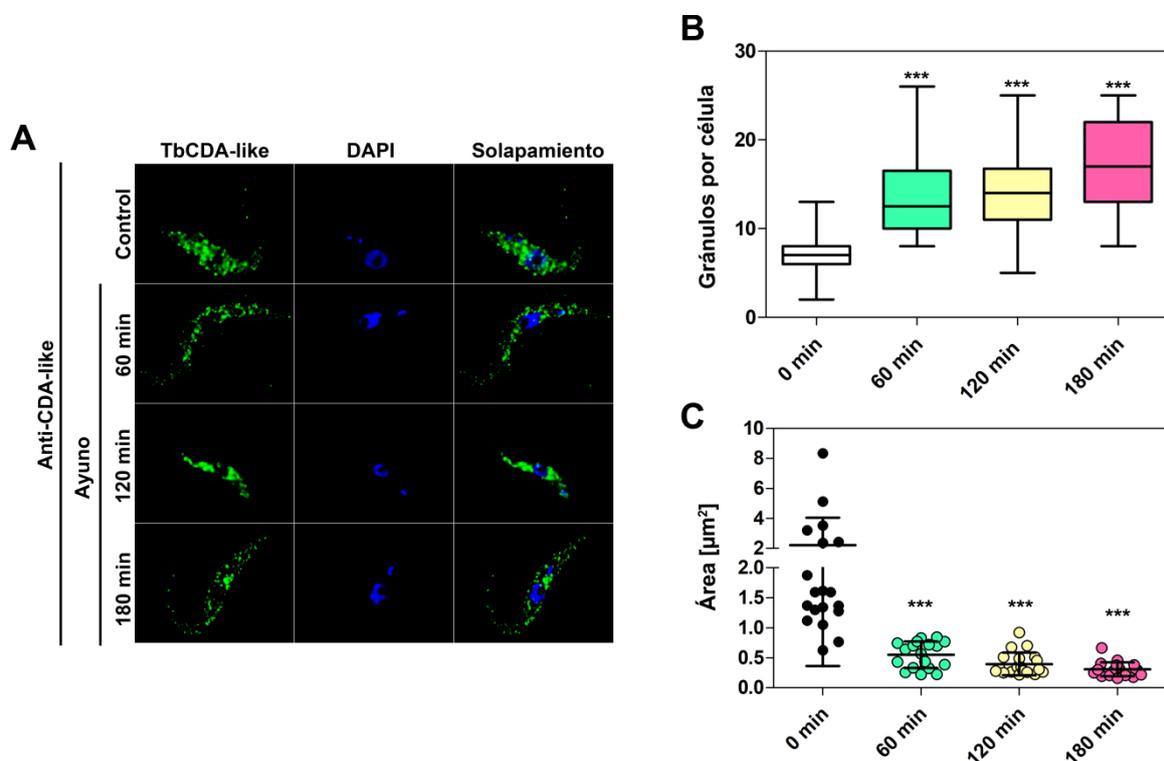


Figura D31. Evolución temporal de la formación de gránulos en condiciones de estrés nutricional en *T. brucei*. (A) Inmunofluorescencia que muestra la distribución de TbCDA-like en condiciones normales (control, fila superior) y tras someter a las células a condiciones de

ayuno durante 60, 120 o 180 minutos. Se empleó un anticuerpo policlonal anti-TbCDA-like y un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. Los núcleos y kinetoplastos se marcaron con DAPI. **(B)** Análisis del número de gránulos por célula considerando un área mínima de $0,05 \mu\text{m}^2$. Los datos corresponden a la media de al menos 19 células por condición. Las cajas muestran el rango intercuartil y los bigotes los valores máximos y mínimos. **(C)** Análisis del área de los gránulos por célula considerando un área mínima de $0,05 \mu\text{m}^2$. Los datos corresponden a la media ($\pm\text{SD}$) de las áreas de cada célula con un total de 19-21 células por condición. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un test ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Las imágenes se analizaron mediante el software Fiji/ImageJ.

Para corroborar el resultado obtenido, se decidió realizar el mismo experimento empleando un anticuerpo anti-c-myc, en la línea KI en el extremo N-terminal de TbCDA-like. La figura D32A muestra cómo de nuevo la proteína se redistribuye en gránulos perinucleares a los tres tiempos ensayados, mientras que el control sin someter a estrés (Fig D32A, fila superior), sigue presentando el patrón de distribución granular por todo el citoplasma. Se volvió a realizar un análisis cuantitativo del número y área de los gránulos de entre 20 y 22 células de cada condición aplicando un umbral de tamaño de partícula de $0,05 \mu\text{m}^2$ que en este caso desveló un aumento significativo del número de gránulos a los 60 y 120 minutos (Fig. D32C), así como una significativa reducción del área de los mismos tras 60, 120 y 180 minutos de ayuno (Fig. D32D).

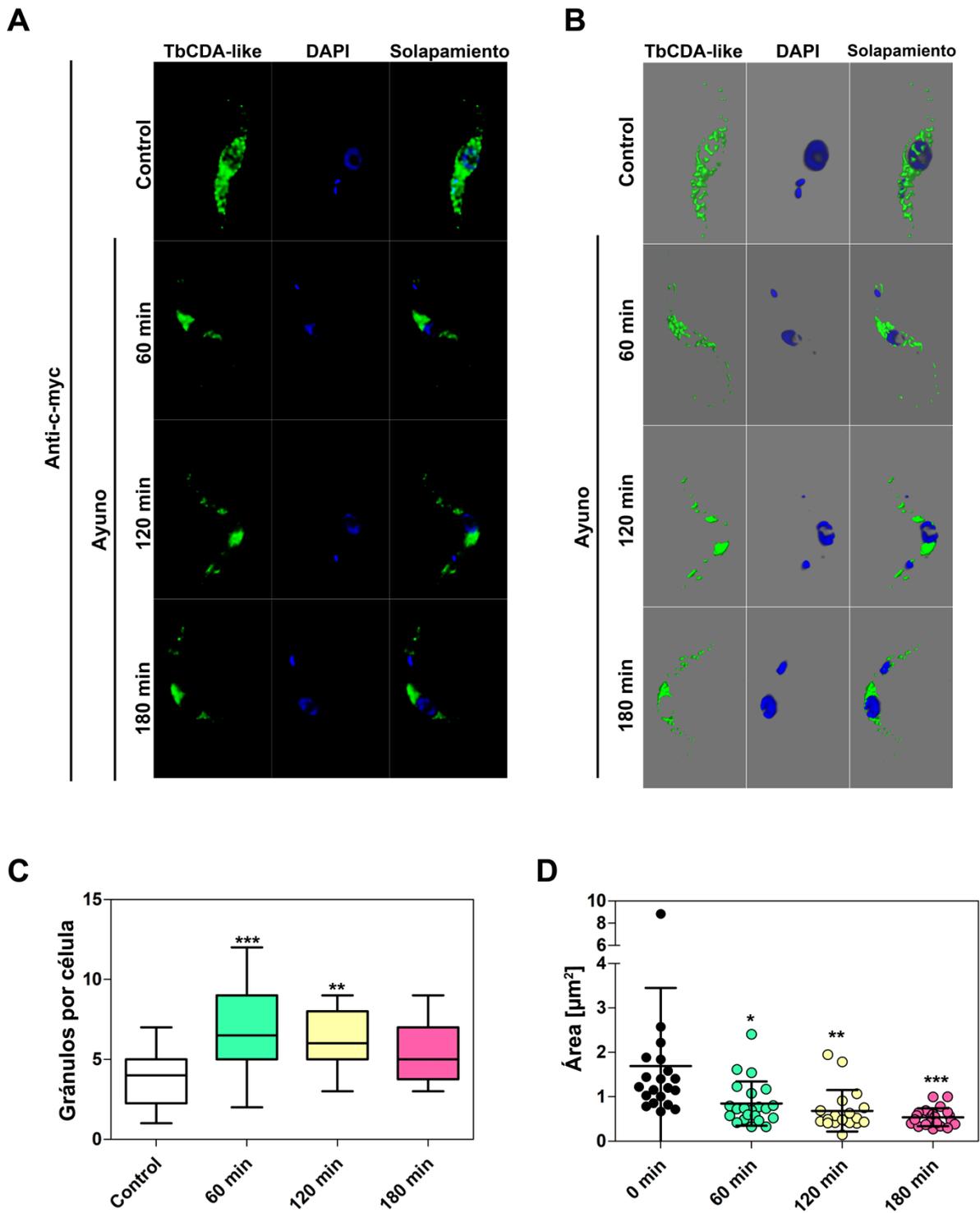


Figura D32. Evolución temporal de los gránulos en condiciones de estrés nutricional en la línea KI en el extremo N-terminal para TbCDA-like. (A) Inmunofluorescencia que muestra la distribución de TbCDA-like en la línea KI para TbCDA-like en su extremo N-terminal (*Tb* PF N-ter KI) condiciones normales (control, fila superior) y tras someter a las células a condiciones de ayuno durante 60, 120 o 180 minutos. Se empleó un anticuerpo policlonal anti-

TbCDA-like y un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. Los núcleos y kinetoplastos se marcaron con DAPI. **(B)** Construcción 3D de las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas tras someter a los parásitos a estrés nutricional realizado con el módulo de reconstrucción tridimensional del software Leica Application Suite X (LAS X). **(C)** Análisis del número de gránulos por célula considerando un área mínima de $0,05 \mu\text{m}^2$. Los datos corresponden a la media de al menos 20 células por condición. Las cajas muestran el rango intercuartil y los bigotes los valores máximos y mínimos. **(D)** Análisis del área de los gránulos por célula considerando un área mínima de $0,05 \mu\text{m}^2$. Los datos corresponden a la media ($\pm\text{SD}$) de las áreas de cada célula con un total de 20-22 células por condición. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un test ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Las imágenes se analizaron mediante el software Fiji/ImageJ.

A continuación, para confirmar si dichas estructuras corresponden verdaderamente con gránulos de estrés, se llevaron a cabo estudios de colocalización con tres proteínas descritas en la literatura como integrantes de los SGs tales como: la heliaca DEAD-box de ARN Dhh1 (TbDhh1) (Presnyak y Coller 2013), el supresor de la traducción Scd6 (TbScd6) (Cristodero, Schimanski et al. 2014) y la proteína de unión a ARN que participa en la estabilización de diversos ARNm, DRBD3 (TbDRBD3) (Fernandez-Moya, Garcia-Perez et al. 2012). En este caso se sometieron las células a 120 minutos de estrés nutricional y se emplearon como anticuerpos primarios en las inmunofluorescencias un anticuerpo monoclonal anti-c-myc y el correspondiente anticuerpo policlonal anti-Dhh1, anti-Scd6 o anti-DRBD3 (cedidos por Mark Carrington, University of Cambridge y Antonio Estévez, IPBLN-CSIC).

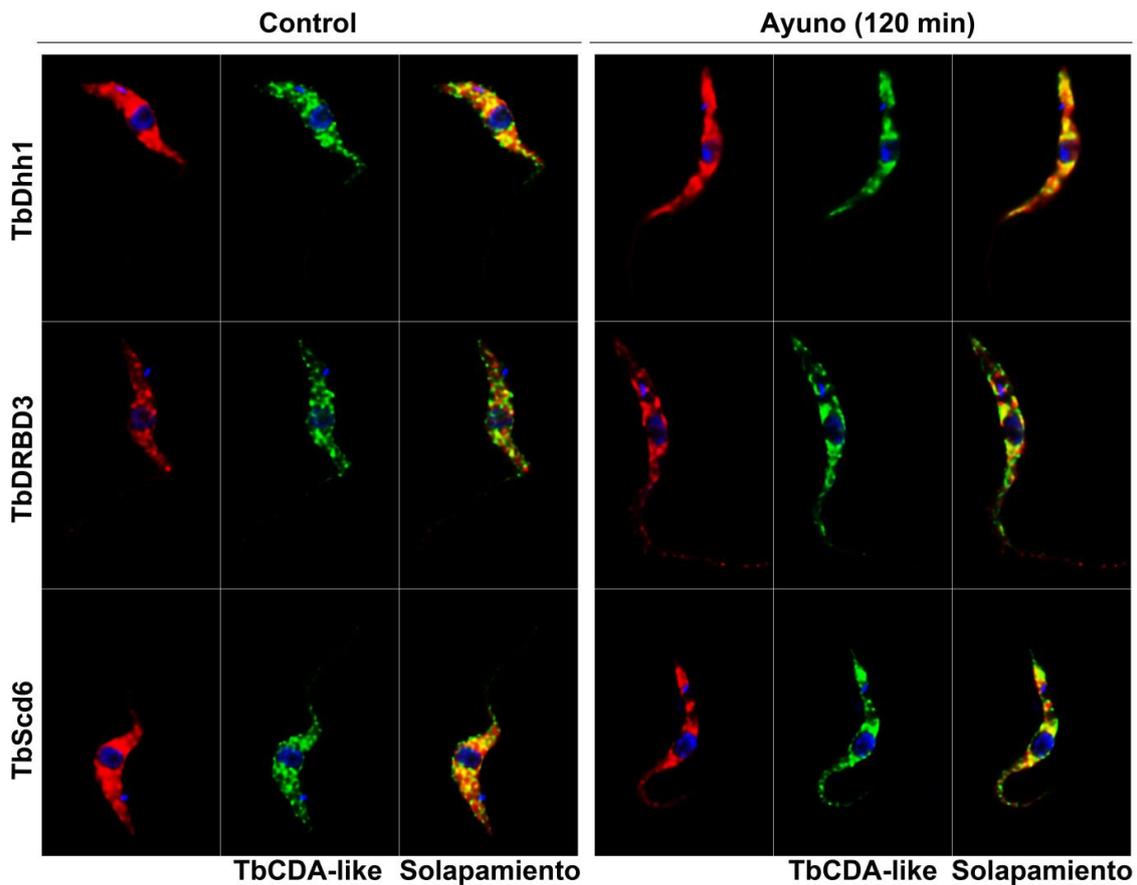


Figura D33. Colocalización de TbCDA-like con diferentes proteínas presentes en gránulos de estrés (SGs). Imágenes de inmunofluorescencia que muestran la colocalización de TbCDA-like con las proteínas marcadoras de SGs TbDhh1 (fila superior), TbDRBD3 (fila central) y TbScd6 (fila inferior) en condiciones normales y de ayuno (120 minutos) en la línea KI para TbCDA-like en el extremo N-terminal. Se utilizaron como anticuerpos primarios un anticuerpo monoclonal anti-c-myc y el correspondiente anticuerpo policlonal anti-Dhh1, anti-DRBD3 o anti-Scd6. Como anticuerpos secundarios se emplearon monoclonales anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor® 488. Los núcleos y kinetoplastos se marcaron con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Leica DMI8 y deconvolucionadas con el software Huygens Essential (versión 3.3; Scientific Volume Imaging). Las imágenes se analizaron con el software Fiji/ImageJ.

Tal y como se observa en la figura D33, TbCDA-like colocaliza con Dhh1, Scd6 y DRBD3 tanto en condiciones normales como tras 2 horas de estrés nutricional, obteniéndose valores de colocalización representados por el coeficiente de Pearson de alrededor de 0,9 en todos los casos. Así mismo, tanto el coeficiente M1 de Manders que indica solapamiento de TbCDA-like sobre TbDhh1, TbScd6 o TbDRBD3, como el

coeficiente M2, que revela el solapamiento de cada una de dichas proteínas sobre TbCDA-like, alcanzan valores que rondan el 90% de solapamiento en todos los casos (Tabla D5).

	Control			Estrés nutricional		
	Pearson \pm SD	M1 \pm SD	M2 \pm SD	Pearson \pm SD	M1 \pm SD	M2 \pm SD
TbDRBD3	0,896 \pm 0,024	0,937 \pm 0,036	0,925 \pm 0,02	0,858 \pm 0,037	0,878 \pm 0,046	0,823 \pm 0,079
TbScd6	0,870 \pm 0,024	0,915 \pm 0,042	0,960 \pm 0,01	0,860 \pm 0,031	0,934 \pm 0,053	0,882 \pm 0,04
TbDhh1	0,906 \pm 0,045	0,954 \pm 0,008	0,912 \pm 0,07	0,888 \pm 0,028	0,902 \pm 0,062	0,943 \pm 0,024

Tabla D5. Cuantificación de la colocalización entre TbCDA-like y diferentes proteínas marcadoras de SGs. La tabla muestra los coeficientes de Pearson y Manders (M1, referente al porcentaje de solapamiento de TbCDA-like sobre cada uno de los marcadores; M2, referente al porcentaje de solapamiento del correspondiente marcador sobre TbCDA-like). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de al menos 10 células.

D.2.5.4. Papel de TbCDA-like en la expresión diferencial de genes a nivel transcriptómico en *T. brucei*

Ante la evidencia de que TbCDA-like presenta actividad de unión a ARN y se relocaliza en gránulos de estrés tras someter a los parásitos a estrés nutricional, se llevó a cabo un estudio de secuenciación de ARN (RNAseq) para determinar si cambios en la expresión de TbCDA-like conllevan cambios en la expresión de genes a nivel transcriptómico. Concretamente, se emplearon las líneas *Tb* PF CDA-like-RNAi y *Tb* PF CDA-like-OE tras 2 días de inducción con DOX para determinar el efecto de la sobreexpresión y del RNAi frente a TbCDA-like.

En el caso de la línea RNAi, tras comparar los genes diferencialmente expresados (DEG) tras 2 días de inducción frente a la línea parental de tripomastigotes procíclicos y eliminando el efecto de la DOX, se obtuvieron únicamente 6 DEG ($p < 0,001$) (Fig. D34A-B) incluyendo TbCDA-like (Tb427_100095300). Los otros 5 DEG incluyeron un producto no especificado que parece tratarse de un ARN no codificante (ncRNA) (Tb427_090073300), una proteína hipotética (pseudogen) (Tb427_000829700:pseudogene), una proteína de choque térmico (Histidina kinasa-ADN girasa B-HSP90-like ATPasa/ proteína HSP90) (Tb427_100116300), una proteína

de la familia RHS (retrotransposon hot spot) (Tb427_000654700) y una S-adenosilmetionina sintetasa (Tb427_060054000).

Por el contrario, si comparamos la línea parental con la que sobreexpresa TbCDA-like, obtenemos 2522 DEG ($p < 0,05$) (Fig. D34C), con 1282 genes cuyos niveles de ARNm se ven aumentados y 1240 genes en los que ocurre lo contrario. Si eliminamos los pseudogenes, los genes multicopia, y aquellos en los que las lecturas de las réplicas no sean homogéneas, los 30 genes más interesantes cuya expresión a nivel de ARNm cambia como consecuencia de la sobreexpresión de TbCDA-like son los que aparecen recogidos en la figura D34D. Dentro de la población de genes con niveles más altos de ARNm uno de los que más cambia es Tb427_020025800, que codifica para una proteína hipotética que podría ser una fosfatasa ácida. También resulta muy interesante destacar Tb427_050028000 que codifica para una reverso transcriptasa (ADN polimerasa dependiente de ARN)/RNasa H, haciendo sospechar de nuevo la implicación de TbCDA-like con el metabolismo del ARN, aunque sin dejar de lado la más que aparente participación en el metabolismo de nucleótidos puesto que también se observa acumulación del ARNm del gen Tb427_020032900, un transportador de nucleósidos, en concreto el transportador 2 de adenosina. Así mismo, es muy llamativa la acumulación del ARNm de diversas VSGs.

Respecto a la población de genes cuya expresión a nivel del ARNm se ve reducida como consecuencia de la sobreexpresión de TbCDA-like cabe destacar Tb427_080005000, una fosfatasa de ácido fosfático; Tb427_000008200 (ESAG10) que codifica para un transportador de pteridina/folato; Tb427_000020600 (ESAG6) que codifica para una proteína de unión a la transferrina; Tb427_090014200 que codifica para el ARNt de la selenocisteína (tRNA^{sec}) y en línea con el metabolismo de ARN también se observa reducción de la expresión de Tb427_100008600, la helicasa de ARN DEAD/DEAH box helicase/Type III restriction enzyme res subunit/Helicase conserved C-terminal domain containing protein y Tb427_110024600 que codifica para la proteína Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)/CCCH-type zinc finger/Helicase conserved C-terminal domain containing, conocida como ZC3H41 (Izhaki-Tavor y Dessau 2020, Singh, Minia et al. 2014) que también actúa como helicasa de ARN y parece estar implicada en la regulación de los *P-bodies* (Ooi, Benz et al. 2020).

réplicas biológicas independientes. En azul se representan los genes no expresados diferencialmente (nDEG) y en rosa los genes expresados diferencialmente (DEG). **(B)** Gráfica que muestra los 6 genes cuya expresión se ve reducida (negro) o incrementada (gris) tras 2 días de inducción del RNAi. **(C)** Volcano plot que muestra los transcritos diferencialmente expresados tras 2 días de inducción de la sobreexpresión de TbCDA-like. Para cada gen se representa el Log10 ajustado por el P-valor frente al Log2 del *fold-change*. Los datos representan la media de 3 réplicas biológicas independientes. En azul se representan los genes no expresados diferencialmente (nDEG) y en rosa los genes expresados diferencialmente (DEG). **(D)** Gráfica que muestra los 30 genes más destacados cuya expresión se ve reducida (blanco) o incrementada (negro) tras 2 días de sobreexpresión de TbCDA-like. SAM: S-adenosilmetionina, HSP: *heat shock protein*, RHS: *retrotransposon hot spot*, VSG: *variant surface glycoprotein*, PAP: *phosphatidic acid phosphatase*, ESAG: *expression site-associated genes*, tRNA^{sec}: ARN transferente de la selenocisteína, LRRP: *leucine-rich repeat protein*, PFK: fosfofructoquinasa, PAG: *procyclin-associated gene*, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, NH: nucleósido hidrolasa.

DISCUSIÓN

E. DISCUSIÓN

E.1. TbCDA es una enzima esencial en el metabolismo de pirimidinas en *Trypanosoma brucei*

E.1.1. Papel de la mitocondria en el metabolismo de pirimidinas y la síntesis de dTMP

Una de las características distintivas de los protozoos de la clase Kinetoplastea (*Kinetoplastida*) es la presencia de una única mitocondria. En las formas sanguíneas del parásito, que dependen de la glucólisis para la obtención de energía, la mitocondria se encuentra escasamente desarrollada; mientras que las formas procíclicas poseen una mitocondria funcional y estructuralmente mucho más compleja en la que se lleva a cabo la fosforilación oxidativa (Hoffmann, Kaser et al. 2018). Más allá del metabolismo energético, la mitocondria tiene un importante papel en el metabolismo de nucleótidos para el mantenimiento de la integridad genómica del ADN nuclear y mitocondrial, tanto en *T. brucei* como en otros organismos eucariotas.

La síntesis de pirimidinas puede tener lugar mediante la síntesis *de novo*, que conduce a la obtención de UMP (Ong, Sienkiewicz et al. 2013); (Ali, Tagoe et al. 2013). Posteriormente tiene lugar la síntesis de dTMP que juega un papel central dentro del metabolismo de pirimidinas. En células de mamífero la dCMP desaminasa cataliza la síntesis de dUMP, sustrato para la TS que cataliza la metilación reductiva del mismo empleando el 5,10-metilentetrahidrofolato (sintetizado a partir de serina y tetrahidrofolato por la SHMT) como dador del grupo metilo. Este 5,10-metilentetrahidrofolato se convierte en dihidrofolato que será regenerado hasta tetrahidrofolato por acción de la DHFR (Anderson, Quintero et al. 2011, Wang 2016) (Fig. E1). Se asume que toda esta secuencia de reacciones tiene lugar en el citoplasma de la célula, si bien existe una SHMT de localización mitocondrial (Appling 1991, Anderson, Quintero et al. 2011) y se ha descrito la presencia de una forma de la TS y la DHFR en la mitocondria de células de mamífero (Anderson, Quintero et al. 2011, Wang 2016). La otra vía para la obtención de pirimidinas es la ruta de salvamento para la

obtención de dTMP vía fosforilación de la dThd mediante TK1 (de localización citosólica) o TK2 (de localización mitocondrial) (Lee, Wang et al. 2014). También puede darse la síntesis de dUMP en citosol y mitocondria vía fosforilación de la dUrd por TK1 o TK2 respectivamente.

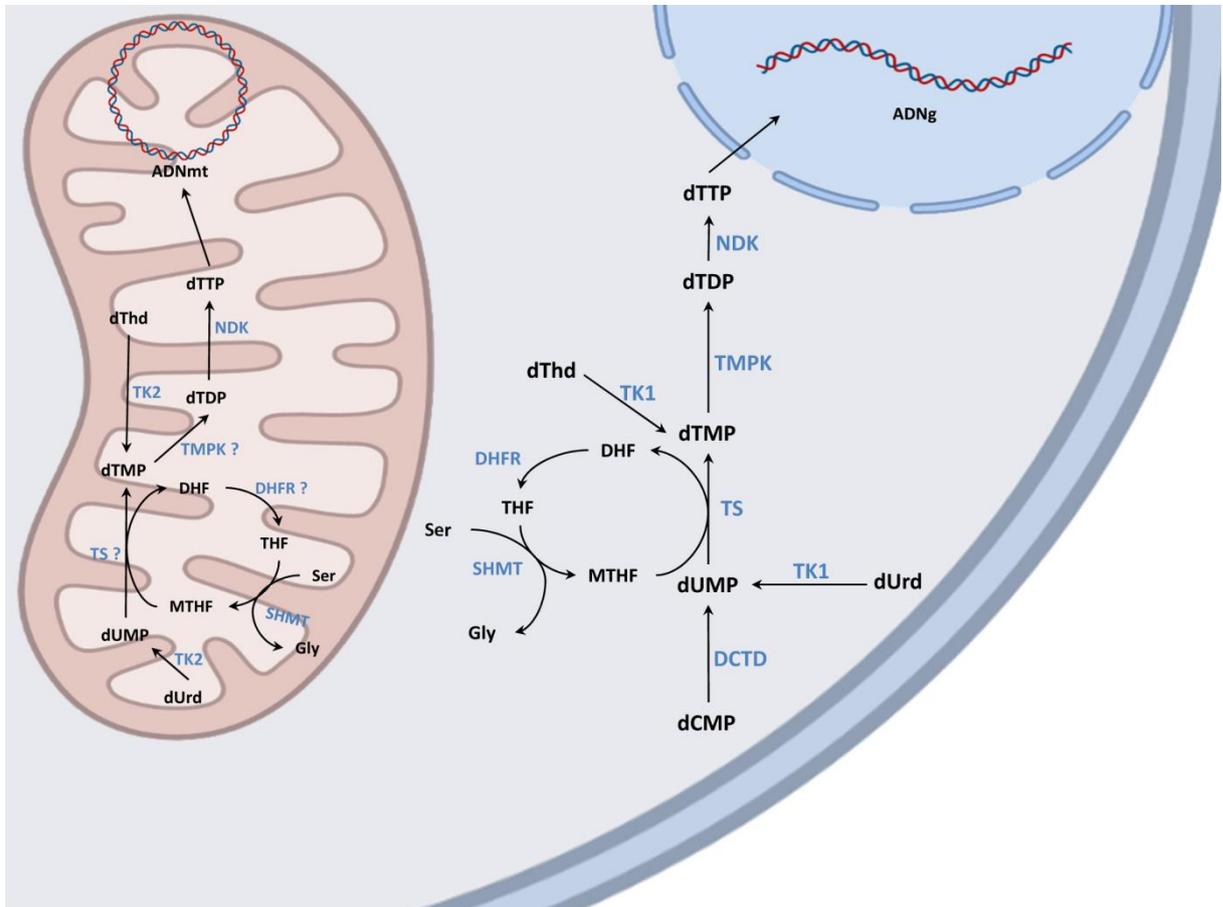


Figura E1. Síntesis de dTTP en mitocondria y citosol en células de mamífero. La figura muestra las rutas de síntesis para el dTTP tanto a nivel mitocondrial como en el citosol. Las flechas indican las reacciones catalizadas por cada una de las enzimas. NDK (nucleósido difosfato kinasa), TMPK (timidilato kinasa), TK (timidina kinasa), DCTD (dCMP desaminasa), TS (timidilato sintasa), DHFR (dihidrofolato reductasa), SHMT (serina hidroximetiltransferasa). ADNmt (ADN mitocondrial), ADNg (ADN genómico). Creado con BioRender.

Por su parte, *T. brucei* carece de actividad dCMP desaminasa pero expresa una TbCDA esencial (Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016) de localización mitocondrial (Resultados D.1.7.). Basándonos en estudios previos (Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016) y en la observación de que la pérdida de viabilidad que se produce en la línea RNAi frente

a TbCDA es revertida mediante la adición de dThd o dUrd (Fig. D8C-D), podemos deducir que el papel esencial de TbCDA residiría en la desaminación de dCtd hasta dUrd para que ésta sea fosforilada en el citoplasma del parásito por acción de TbTK, que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Valente, Timm et al. 2016), generándose dUMP. A su vez, se ha descrito recientemente la existencia de una dNTP fosfohidrolasa (TbHD52) esencial de localización mitocondrial que sería la responsable de la generación de un *pool* de dCtd en la mitocondria a partir de la hidrólisis del dCTP (Yague-Capilla, Castillo-Acosta et al. 2021) (Fig. E2).

En kinetoplastidos la DHFR y la TS están fusionadas en una enzima bifuncional (TbDHFR-TS) de localización mitocondrial y de carácter esencial en ausencia de dThd exógena (Sienkiewicz, Jaroslowski et al. 2008); (Moro-Bulnes, Castillo-Acosta et al. 2019). La misma situación se ha descrito en plantas, donde existe una DHFR-TS mitocondrial (Neuburger, Rebeille et al. 1996). Es importante destacar que *T. brucei* carece de TbSHMT por lo que el 5,10- metilentetrahidrofolato se regenera a partir del tetrahidrofolato mediante el sistema de clivaje de la glicina (Vickers y Beverley 2011, Roy y Ouellette 2015). Finalmente, el dTMP será fosforilado en el citosol hasta dTTP mediante la acción secuencial de la dTMP kinasa (TbTMPK) (<http://www.tryptag.org/?id=Tb927.8.3510>) y la TbNDK (Hunger-Glaser, Hemphill et al. 2000), que además de en el citoplasma parece localizarse en el núcleo de *T. brucei*. La obtención de la timidina-5'-difosfato (dTDP), catalizada por la NDK en células de mamífero tiene lugar tanto en el citoplasma de la célula como en la mitocondria, puesto que existe una isoforma de la NDK asociada a la membrana interna de dicho orgánulo (Lacombe, Tokarska-Schlattner et al. 2009). La posterior fosforilación a dTTP se da en el citoplasma aunque parece que también se ha detectado actividad TMPK en la mitocondria (Wang 2016, Frisk, Eriksson et al. 2020).

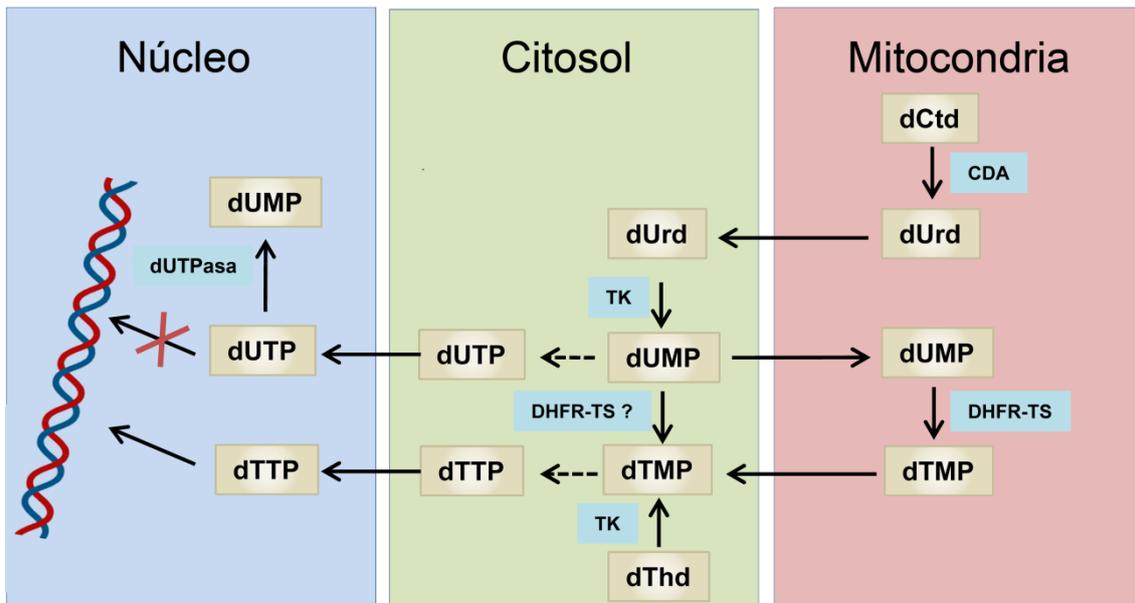


Figura E2. Síntesis de dTTP en *T. brucei*. Esquema que muestra los diferentes compartimentos de la célula implicados en la síntesis de dTTP. Las flechas negras indican reacciones catalizadas por cada enzima. Las flechas discontinuas indican una serie de reacciones catalizadas por varias enzimas. CDA (citidina desaminasa), DHFR-TS (dihidrofolato reductasa –timidilato sintasa), TK (timidina kinasa), dUTPasa (desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa).

E.1.2. El metabolismo de nucleótidos se interconecta a través de los diferentes compartimentos de la célula

Dada la localización de las enzimas implicadas en la síntesis de dTMP en *T. brucei*, proponemos que la síntesis del mismo y la posterior fosforilación hasta dTTP ocurre tal y como se plantea en la figura E2. En el interior de la mitocondria, TbCDA actuaría desaminando la dCtd procedente en su mayor parte de la hidrólisis del dCTP por parte de TbHD52 (Yague-Capilla, Castillo-Acosta et al. 2021). A continuación, la dUrd sería transportada al citosol o al núcleo donde TbTK catalizaría la síntesis del dUMP (Valente, Timm et al. 2016), que debe volver a entrar a la mitocondria, donde será metilado a dTMP por la TbDHFR-TS. La síntesis del dTTP ocurrirá muy probablemente en el citosol dada la localización propuesta para TbTMPK (<http://www.tryptag.org/?id=Tb927.8.3510>) y TbNDK (Hunger-Glaser, Hemphill et al. 2000). Según este esquema, la membrana mitocondrial sería permeable a la dUrd y el

dUMP. Igualmente, los dNTPs deben ser capaces de atravesar tanto la membrana nuclear como la mitocondrial para que pueda tener lugar la replicación del ADN nuclear y del kinetoplasto.

En la célula los nucleótidos y sus derivados se encuentran compartimentalizados en el citosol y la mitocondria separados por la doble membrana de dicho orgánulo. Sin embargo, existe un intercambio entre ambos compartimentos mediado por transportadores específicos. Así mismo, el *pool* de dNTPs es dinámico y cambia a lo largo del ciclo celular, siendo este hecho fundamental para asegurar la fidelidad de la replicación del ADN. Por tanto, alteraciones en el control del nivel de dNTPs pueden conducir a eventos de mutagénesis, roturas de cadena y finalmente muerte celular. Concretamente, se ha observado que la acumulación de dTTP y dCTP favorecen la introducción de errores durante la replicación provocando la excesiva activación de los sistemas de reparación, lo que tendrá como consecuencia la generación de roturas de cadena (Wang 2016). Además, se ha publicado también que la deficiencia de CDA causa una acumulación de dCTP que provoca errores en la replicación, defectos en la segregación y reduce la actividad de PARP-1 (Gemble, Ahuja et al. 2015, Gemble, Buhagiar-Labarchede et al. 2016).

De manera similar a lo que ocurre con el ADN nuclear, la replicación del ADN mitocondrial se ve muy afectada en respuesta a alteraciones en el *pool* de dNTPs. De hecho, la deficiencia de TK2 produce una severa depleción del ADN mitocondrial (Wang 2016). Existen evidencias de que los dNTPs citosólicos y mitocondriales están conectados mediante transportadores. Por ejemplo, la reducción de la expresión de TK2 en fibroblastos en quiescencia conduce a una reducción de los niveles de dTTP y dCTP en mitocondria, lo que a su vez provoca la reducción de dTTP y dCTP citosólicos y, como consecuencia de ello, se produce estrés en la replicación del ADN genómico (Lee, Wang et al. 2014).

La familia de transportadores de solutos o *solute carriers* (SLC) está constituida por una amplia variedad de moléculas transportadoras implicadas en conectar las diferentes rutas metabólicas. En 2013 se conocían 395 SLCs, cifra que ha ido en aumento hasta los 456 que se estiman en la actualidad (Rochette, Meloux et al. 2020); (<http://slc.bioparadigms.org>). La subfamilia de transportadores mitocondriales (MCF ó SLC25) es la de mayor importancia dentro de la familia SLC y consta de una serie de

transportadores que permiten la movilidad de una gran variedad de solutos a través de la membrana mitocondrial (Rochette, Meloux et al. 2020). De hecho, de los aproximadamente 60 SLCs que se expresan en mitocondria, la mayoría pertenecen a la subfamilia de los SLC25 o MCF (Girardi, Agrimi et al. 2020). Los principales sustratos transportados comprenden nucleótidos, aminoácidos, cofactores, ácidos carboxílicos y aniones inorgánicos.

Dentro de los SLC25 destaca el SLC25A3, un transportador de fosfato cuya deficiencia se ha relacionado con alteraciones en la síntesis de ATP (Rochette, Meloux et al. 2020). Así mismo, SLC25A23, SLC25A24 y SLC25A25 son responsables del transporte de los nucleótidos de adenina hasta la matriz mitocondrial en respuesta a las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol (Amigo, Traba et al. 2013). Los transportadores ANT (*adenine nucleotide traslocase*) median el intercambio de ADP/ATP entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana (Rochette, Meloux et al. 2020). En humanos existen 4 isoformas de ANTs (SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6 y SLC25A31) (Willis, Miranda-Grandjean et al. 2018). También cabe destacar la existencia de dos transportadores de nucleótidos de pirimidinas, SLC25A36 (PNC2) (Colasante, Pena Diaz et al. 2009, Palmieri 2013) y SLC23A33 (PNC1) que tiene preferencia por el UTP (Gandhi and Samuels 2011, Palmieri 2013).

Las formas sanguíneas de *T. brucei* obtienen el ATP a partir de la glucólisis puesto que poseen una mitocondria poco desarrollada incapaz de llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Sin embargo, en las formas procíclicas la mayoría del ATP procede de la fosforilación oxidativa mediante el catabolismo mitocondrial de la prolina. La mitocondria de *T. brucei* parece ser bastante impermeable (Schneider, Bouzaidi-Tiali et al. 2007) lo que implica la presencia necesaria de transportadores específicos de membrana. TbMCP6 fue el primer transportador descrito en la mitocondria de *T. brucei* (Colasante, Alibu et al. 2006) y pertenece a la subfamilia de los MCF. De hecho, se han identificado genes que codifican para potenciales MCF en kinetoplastos. Concretamente, en *T. brucei* se han identificado 26 genes que codifican para 24 proteínas MCF diferentes de las cuales, 11 presentan potencial actividad como transportadores de nucleótidos. 18 de estos 24 MCFs se han asociado a la mitocondria de *T. brucei* (Colasante, Pena Diaz et al. 2009). La inhibición de TbMCP6 en formas procíclicas del parásito afecta a la replicación del kinetoplasto lo que sugiere su posible papel como transportador de nucleótidos en la mitocondria. Así mismo, TbMCP23 se ha

clasificado como un ortólogo de SLC25A36 por lo que podría tratarse específicamente de un transportador mitocondrial de nucleótidos pirimidínicos (Colasante, Pena Diaz et al. 2009).

Si tenemos en cuenta las diferencias en cuanto a la obtención de ATP por parte de las formas sanguíneas y procíclicas, se hace necesario destacar el papel de los transportadores TbMCP5 y TbMCP11. TbMCP5 se ha caracterizado como un ortólogo de SLC25A4, es decir, se trataría de un intercambiador de ADP/ATP (Colasante, Pena Diaz et al. 2009), y TbMCP11 ha sido descrito como un transportador de fosfato y es esencial en los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* (Colasante, Pena Diaz et al. 2009, Gao, Voncken et al. 2020).

Por tanto, teniendo en cuenta la existencia de dichos transportadores, que la deficiencia de TbCDA puede ser compensada mediante la adición de dThd o dUrd al medio (Fig. D8) y que las formas KO para la TbDHFR-TS pueden ser rescatadas con dThd en elevadas concentraciones (Sienkiewicz, Jaroslowski et al. 2008), parece evidente que la síntesis de dTMP ocurre de acuerdo al esquema planteado en la figura E2. Por tanto, se puede concluir que existe una circulación dinámica de nucleótidos y sus derivados entre los diferentes compartimentos (núcleo, citosol y mitocondria) para la correcta replicación del ADN genómico y del kinetoplasto.

E.1.3. La dUTPasa controla el ratio dUTP/dTTP

Como se ha comentado anteriormente, el mantenimiento del pool de dNTPs es fundamental para asegurar la estabilidad genómica y es particularmente relevante el mantenimiento de las concentraciones relativas de dTTP y dUTP dado que la mayoría de las ADN polimerasas no pueden distinguir entre ambos y, por tanto, la incorporación de uno u otro depende de los niveles de cada uno de ellos (Vertessy y Toth 2009).

La mayoría de protozoos parásitos tales como los kinetoplastidos o los apicomplexa son incapaces de llevar a cabo la síntesis *de novo* de purinas y dependen por completo de las rutas de salvamento. Además, en el caso de parásitos apicomplexa como *Plasmodium* spp. o *Toxoplasma* spp. carecen de las enzimas implicadas en la ruta de salvamento de pirimidinas o están muy limitadas, de manera que dependen de la

síntesis *de novo* de pirimidinas. Por el contrario, en kinetoplástidos como *T. brucei* el metabolismo de pirimidinas depende tanto de la síntesis *de novo* como de la ruta de salvamento (Valente, Vidal et al. 2019, Hammond y Gutteridge 1984).

Así pues, en *Plasmodium* spp., el UMP generado por la síntesis *de novo* debe transformarse en dUTP que por acción de la dUTPasa se convierte en dUMP, sustrato de la DHFR-TS para la síntesis de dTMP que finalmente será fosforilado a dTTP. Por el contrario, en el caso de *T. brucei* la principal vía para la síntesis de dTMP parece estar mediada por TbTK (Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016) de manera que como se propone en la figura E2, TbCDA desamina la dCtd a dUrd que será fosforilada por TbTK hasta dUMP (Valente, Timm et al. 2016) que finalmente será transformado en dTMP por la TbDHFR-TS. Además, las formas de *T. brucei* que expresan un RNAi frente a la dTUPasa no presentan importantes alteraciones en los niveles de dTTP (Castillo-Acosta, Estevez et al. 2008) pese a que las formas KO son auxótrofas para dThd (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013). De hecho, teniendo en cuenta que TbCDA y TbTK son enzimas esenciales en *T. brucei* (Valente, Timm et al. 2016, Leija, Rijo-Ferreira et al. 2016) se hace más evidente el hecho de que la TbdUTPasa no es capaz de compensar la falta de dUrd o su fosforilación a dUMP.

La presencia de Ura en ADN puede deberse a eventos de desaminación de la Cyt o bien a la incorporación de dUTP durante la replicación o procesos de reparación, siendo éste aparentemente el motivo principal para la presencia de Ura en ADN (Vertessy y Toth 2009). Finalmente la presencia de Ura en ADN, será fuente de mutaciones y como consecuencia citotóxica, por lo que debe ser reparada por la vía de escisión de bases (Valente, Vidal et al. 2019). Cuando el ratio dUTP/dTTP es elevado, se produce la incorporación de Ura en lugar de timina lo que conduce a hiperactivación de la ruta de reparación, la fragmentación del ADN y finalmente la muerte celular en un proceso denominado “muerte por falta de timina” (Valente, Vidal et al. 2019, Camacho, Hidalgo-Zarco et al. 2000). De esta manera que se hace patente la importancia del mantenimiento del correcto ratio dUTP/dTTP donde están directamente implicadas las enzimas TbdUTPasa, TbDHFR-TS, TbCDA y TbTK. Así pues, en parásitos como *Plasmodium* spp. la dUTPasa juega un doble papel tanto en la provisión del dUMP para la obtención del dTMP como en el mantenimiento del ratio dUTP/dTTP hidrolizando el exceso de dUTP. Sin embargo, en *T. brucei*, la principal función de la TbdUTPasa, que además se localiza en el núcleo (Castillo-Acosta, Estevez et al. 2008), sería más bien la

de mantener el balance dUTP/dTTP y no la de proveer a la célula de dUMP. De hecho, la figura D9 muestra cómo la expresión de la dCMP desaminasa humana, que actuaría como fuente directa de dUMP, no es capaz de mantener el crecimiento de las formas KO para la TbdUTPasa. Finalmente, el hecho de que las formas KO para la TbdUTPasa en *T. brucei* sean auxótrofas para dThd (Castillo-Acosta, Aguilar-Pereyra et al. 2013), se explicaría porque esa dThd sería fosforilada hasta dTMP por TbTK para finalmente generar dTTP que contrarrestaría el exceso de dUTP manteniendo el ratio dUTP/dTTP.

Así pues podemos concluir que, si bien la TbdUTPasa puede contribuir aunque de manera poco significativa a la síntesis de dUMP para su posterior transformación en dTMP vía TbdHFR-TS, la principal vía para la obtención de dTMP en *T. brucei* está mediada por TbCDA y TbTK.

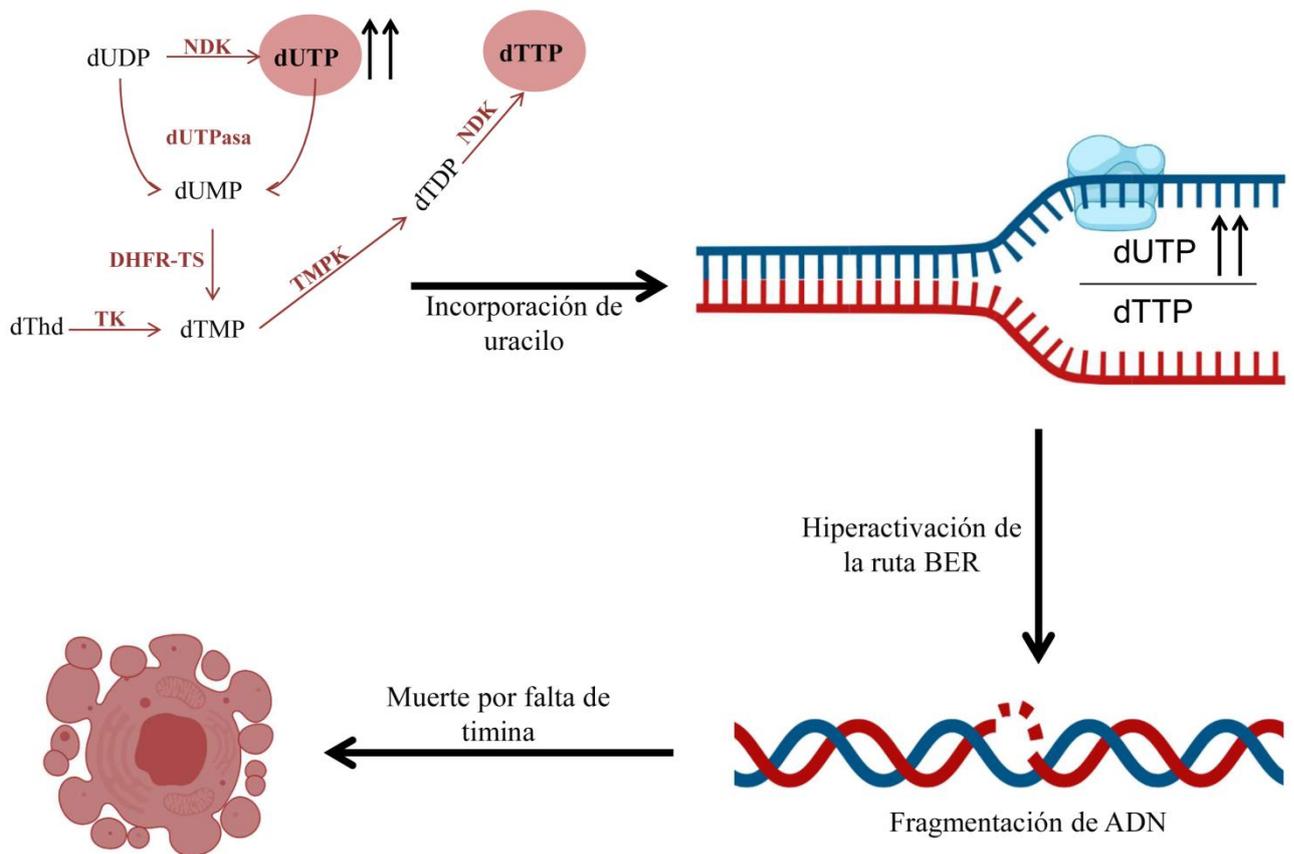


Figura E3. Esquema de la muerte por falta de timina. Cuando se produce en la célula alguna situación que desencadene una acumulación excesiva de dUTP con respecto a los niveles de dTTP, se produce la incorporación de uracilo en lugar de timina en el ADN. Este hecho es debido a que la mayoría de las polimerasas no son capaces de discernir entre dUTP y dTTP, produciéndose como consecuencia una hiperactivación de la ruta de reparación por escisión de bases (BER o *base excision repair*). Finalmente, esta situación conduce a la generación de

roturas de cadena y fragmentación del ADN, proceso que culmina en la muerte celular. dUTPasa (desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa), DHFR-TS (dihidrofolato reductasa – timidilato sintasa), TK (timidina kinasa), TMPK (timidilato kinasa), NDK (nucleósido difosfato kinasa).

E.2. TbCDA-like es una enzima esencial en *Trypanosoma brucei*

El estudio de la proteína TbCDA-like se ha abordado desde distintos puntos de vista (funcional, metabólico y transcripcional) teniendo en cuenta el desconocimiento de su papel celular y las posibles funciones que se deducen a partir de su secuencia. En ausencia de ortólogos caracterizados, los primeros esfuerzos fueron dirigidos a obtener mutantes RNAi y que sobreexpresan la enzima para poder realizar un análisis comparativo. Los estudios de RNAi sugieren que la enzima realiza funciones esenciales en la célula con lo que su papel en supervivencia ofrece interesantes perspectivas desde el punto de vista de la intervención terapéutica. Por otra parte niveles altos de la enzima son citotóxicos lo que también es indicativo de que su actividad debe estar sujeta a un control estricto. Las principales hipótesis eran que TbCDA-like está implicada en el metabolismo de nucleótidos libres o en la desaminación de RNA teniendo en cuenta la presencia de un motivo *zinc-finger* de unión a ácidos nucleicos. El análisis de los distintos mutantes obtenidos ha generado información de interés para interpretar su función a pesar de que de forma concluyente no se ha podido establecer su sustrato y su papel biológico exacto.

E.2.1. TbCDA-like está implicada en el balance CTP/UTP

El análisis del pool de rNTPs puso de manifiesto que la sobreexpresión de TbCDA-like conduce a la reducción del pool de CTP y la acumulación de UTP mientras que el RNAi frente a la misma conduce al efecto contrario, siendo especialmente significativa la bajada en los niveles de UTP (Resultados D.2.4.3.). Por otra parte, los resultados del análisis metabólico revelaron una acumulación de CMP de casi 4 veces en la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi respecto a la línea parental (Resultados

D.2.4.1.). Estas observaciones sugieren la participación de TbCDA-like en el proceso de desaminación de nucleótidos/nucleósidos de citosina (CTP, dCTP, CMP, dCMP, Ctd o Cyt).

Lamentablemente, a pesar de múltiples intentos no se pudo obtener enzima recombinante activa, con lo que la naturaleza del sustrato no se ha podido determinar *in vitro*. De tener un papel en el proceso de desaminación de nucleótidos libres, se trataría de una actividad novedosa y no predecible por el análisis de su secuencia.

Así la existencia de dCTP desaminasas se ha descrito en enterobacterias y arqueas pero no en tripanosomátidos. Es necesario destacar que estas enzimas son tremendamente específicas en su actividad catalítica de manera que son capaces de discernir entre el dCTP y el CTP no pudiendo desaminar éste último (Johansson, Fano et al. 2005).

Cabe la posibilidad también de que TbCDA-like sea una desaminasa de Ctd o Cyt de manera que la reducción de su expresión mediante RNAi podría conducir a la acumulación de Ctd y sus derivados como el CMP o el CTP. En cualquier caso y pese a que los resultados del estudio de metabolómica revelaron una ligera acumulación de 1,6 veces de Cyt respecto a la línea parental (Resultados D.2.4.1.), no parece que TbCDA-like catalice la desaminación de Cyt puesto que en este caso, debería haberse producido una reversión del fenotipo de la línea *Tb* PF CDA-like-RNAi cuando se suplementó el medio de cultivo con Ura (Resultados D.2.4.2.), que sería el producto obtenido mediante la desaminación de la Cyt. Esto es especialmente importante si tenemos en cuenta que el Ura es la pirimidina que mejor rescatan las formas procíclicas de *T. brucei* mediante el transportador TbU1 (Gudin, Quashie et al. 2006, Tiwari y Dubey 2018).

En relación con la acumulación de CMP observada en el análisis metabolómico, parece bastante poco probable que TbCDA-like sea una CMP desaminasa puesto que de forma similar a lo ocurrido con las dCTP desaminasas, únicamente se ha descrito la existencia de dCMP desaminasas en eucariotas, bacterias gram positivas y fagos, tratándose de enzimas que desaminan dCMP sin actuar sobre el CMP (Almog, Maley et al. 2004). Es importante destacar que no se ha identificado una enzima con actividad dCMP desaminasa en tripanosomátidos (Tiwari y Dubey 2018).

Aun así, es evidente el hecho de que TbCDA-like está implicada en la homeostasis del *pool* de ribonucleótidos, especialmente el CTP y el UTP. En este sentido, es interesante recordar que bajas concentraciones de UTP suelen implicar una elevada expresión de la aspartato transcarbamilasa (ATCasa) y viceversa. Además, el CTP actúa como un inhibidor de dicha enzima (O'Donovan, Herlick et al. 1989, Gerhart 2014), haciendo del ratio UTP/CTP un parámetro regulador de la síntesis *de novo* de pirimidinas. Por otro lado, el ATP parece actuar como un activador de la ATCasa mejorando la afinidad de la misma por su sustrato y compitiendo con el CTP (Gerhart 2014). En este sentido, es interesante señalar que la sobreexpresión de TbCDA-like favorece la acumulación de UTP y la reducción del CTP (Resultados D.2.4.3.), así como un incremento del ATP. Sin embargo, mientras que en mamíferos la ATCasa posee una subunidad “reguladora” que es la responsable de la interacción con los rNTPS (Gerhart 2014), la enzima en tripanosomátidos carece de esta subunidad (Tiwari y Dubey 2018).

Por otra parte, se ha observado que la carbamoil fosfato sintetasa II (CPSII) de tripanosomátidos como *Crithidia fasciculata* es inhibida por UTP, UDP y CTP mediante un mecanismo *feedback*, mientras que en mamíferos es únicamente inhibida por UTP (Tiwari y Dubey 2018). En este sentido el aumento de la concentración de UTP como consecuencia de la sobreexpresión de TbCDA-like, podría implicar una inhibición de la CPSII y por tanto de la síntesis *de novo* de UMP para evitar su fosforilación hasta UTP y que éste se acumule aún más. Además, al sobreexpresar TbCDA-like se reduce de manera dramática el ya de por sí reducido *pool* de CTP existente en *T. brucei*. Teniendo en cuenta que en *Trypanosoma* spp. el salvamento de Ctd o Cyt no existe o es despreciable, se ha observado que los niveles de CTP dependen directamente de su síntesis y degradación. Particularmente se ha demostrado que el *pool* tan reducido de CTP se debe a una síntesis lenta por parte de la CTP sintetasa (Hofer, Steverding et al. 2001), lo que podría tener importantes implicaciones tal y como desarrollaremos a continuación.

La CTP sintetasa es una enzima que cataliza la transferencia (dependiente de ATP) del grupo amino desde la glutamina o el amoniaco hasta el UTP para la obtención de CTP (McCluskey y Bearne 2018). Además de en el metabolismo de pirimidinas, el CTP está directamente implicado en la síntesis de los precursores de fosfolípidos tal y como desarrollaremos a continuación. La CTP sintetasa es inhibida por CTP mediante

un mecanismo de inhibición por producto en el que dicho nucleótido bloquea parcialmente el lugar de unión del UTP. Además, la CTP sintetasa 1 humana polimeriza en presencia de UTP o ATP formando estructuras filamentosas en las que se estabiliza la enzima en conformación activa (Lynch, Hicks et al. 2017). Dichos filamentos se desensamblan cuando la concentración de CTP es elevada. También se ha observado un efecto alostérico positivo del GTP sobre la CTP sintetasa (McCluskey y Bearne 2018). Para la enzima de *T. brucei*, al igual que para las de otros organismos como *E. coli*, se ha observado que el efecto alostérico del GTP depende de la concentración, mientras que a concentraciones elevadas ($>0,2$ mM) produce inhibición de la CTP sintetasa, a concentraciones más bajas ($<0,2$ mM) provoca su activación (Steeves y Bearne 2011, Tiwari y Dubey 2018).

A la vista de lo expuesto anteriormente y si recordamos que la sobreexpresión de TbCDA-like provoca una importante reducción de los niveles de CTP así como una destacable acumulación de UTP y en menor medida de ATP y GTP, se podría producir la activación de la CTP sintetasa por parte del ATP y el GTP para estimular la síntesis de CTP a partir del elevado *pool* de UTP.

E.2.2. TbCDA-like altera los niveles de γ -glutamil aminoácidos y fosfolípidos

La reducción de los niveles de TbCDA-like produce una afectación generalizada de los γ -glutamil aminoácidos, produciéndose acumulación de la mayoría de ellos (Fig. D22D). Se pensaba que dichos γ -glutamil aminoácidos eran la forma en que los aminoácidos se transportaban a través de las membranas celulares en el denominado “ciclo del γ -glutamilo” (Fig. E4) donde la glutamato-cisteína ligasa (GCL) cataliza la formación de γ -glutamil cisteína y posteriormente la glutatión sintetasa (GS) cataliza la ligación de la γ -glutamil cisteína con glicina para formar γ -glutamilcisteinil-glicina (glutatión). La degradación del glutatión estaría catalizada según esta hipótesis por la γ -glutamil transpeptidasa (GGT) (Griffith, Bridges et al. 1979, Bridges y Meister 1985), que sería la responsable de la transferencia del grupo γ -glutamilo desde el glutatión hasta un aminoácido para formar el correspondiente γ -glutamil aminoácido, que a continuación sería transportado en dicha forma a través de la membrana plasmática,

dado que la GGT es una enzima que se encuentra anclada a la membrana de la célula. Finalmente, el aminoácido se libera en el citoplasma de la célula por acción de la γ -glutamil ciclotransferasa (γ -GCT). Sin embargo, a día de hoy esta teoría se considera errónea por diversos motivos. En primer lugar, nunca fue posible confirmar el papel de GGT en el transporte de aminoácidos. De hecho, se ha observado que la inhibición de GGT no afecta al transporte de aminoácidos y tampoco se han identificado transportadores específicos para γ -glutamil aminoácidos (Bachhawat y Yadav 2018). En segundo lugar, la GGT presenta tanto actividad hidrolasa como transpeptidasa, sin embargo, estudios cinéticos y funcionales han demostrado que la función fisiológica de la GGT es más la de hidrolasa que la de transpeptidasa (Hanigan 2014, Bachhawat y Yadav 2018). Una tercera evidencia sería el hecho de que tanto pacientes con déficit de GGT como ratones KO para dicha enzima no muestran aminoaciduria, sino niveles elevados de glutatión en orina (Bachhawat y Yadav 2018).

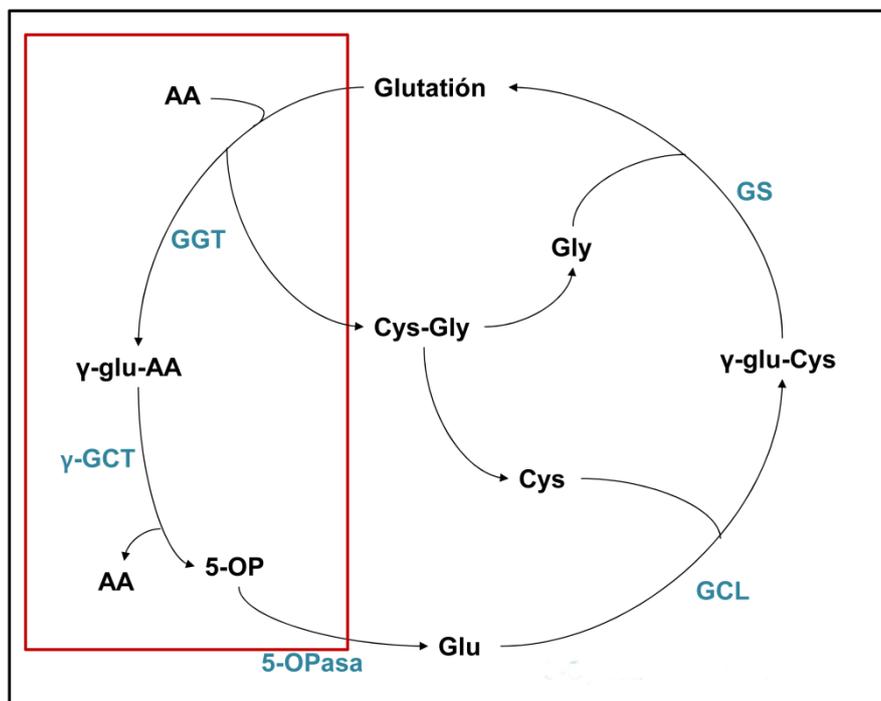


Figura E4. Esquema del anterior modelo del ciclo del γ -glutamilo para el transporte de aminoácidos (adaptado de Bachhawat y Yadav 2018). Ciclo del γ -glutamilo tal y como fue propuesto por Orłowski y Meister en 1970. El recuadro marcado en rojo destaca la parte del ciclo que se ha demostrado como incorrecta. Según este modelo la GCL cataliza la formación de γ -glutamil-cisteína que será posteriormente transformada en γ -glutamilcisteinil-glicina (glutatión). El glutatión será degradado mediante la transferencia del grupo γ -glutamilo a diferentes aminoácidos que serán transportados en esta forma a través de la membrana

plasmática. Finalmente el aminoácido se libera en el citoplasma de la célula. Las enzimas implicadas se destacan en azul: GCL (glutamato-cisteína ligasa), GS (glutación sintetasa), GGT (γ -glutamil transpeptidasa), γ -GCT (γ -glutamil ciclotransferasa), 5-OPasa (5-oxoprolinasa). AA (aminoácido).

Se ha observado que la enzima GCL, que habitualmente cataliza la síntesis de γ -glutamil cisteína, también puede catalizar la formación de otros γ -glutamil aminoácidos especialmente cuando los niveles de cisteína son bajos. También parece bastante probable que la GGT esté implicada en la producción de γ -glutamil aminoácidos en el espacio extracelular (Kobayashi, Ikeda et al. 2020). Un ejemplo de ello podrían ser los elevados niveles de γ -glutamil glutamato que se producen en el cerebro.

Los datos obtenidos en condiciones de deficiencia de TbCDA-like parecen corroborar el hecho de que los γ -glutamil aminoácidos estarían implicados en rutas de señalización que funcionan de manera independiente respecto al metabolismo del glutatión puesto que a excepción de la acumulación del glutatión reducido (GSH) y el oftalmato, todos los demás metabolitos implicados en el ciclo del glutatión permanecen inalterados.

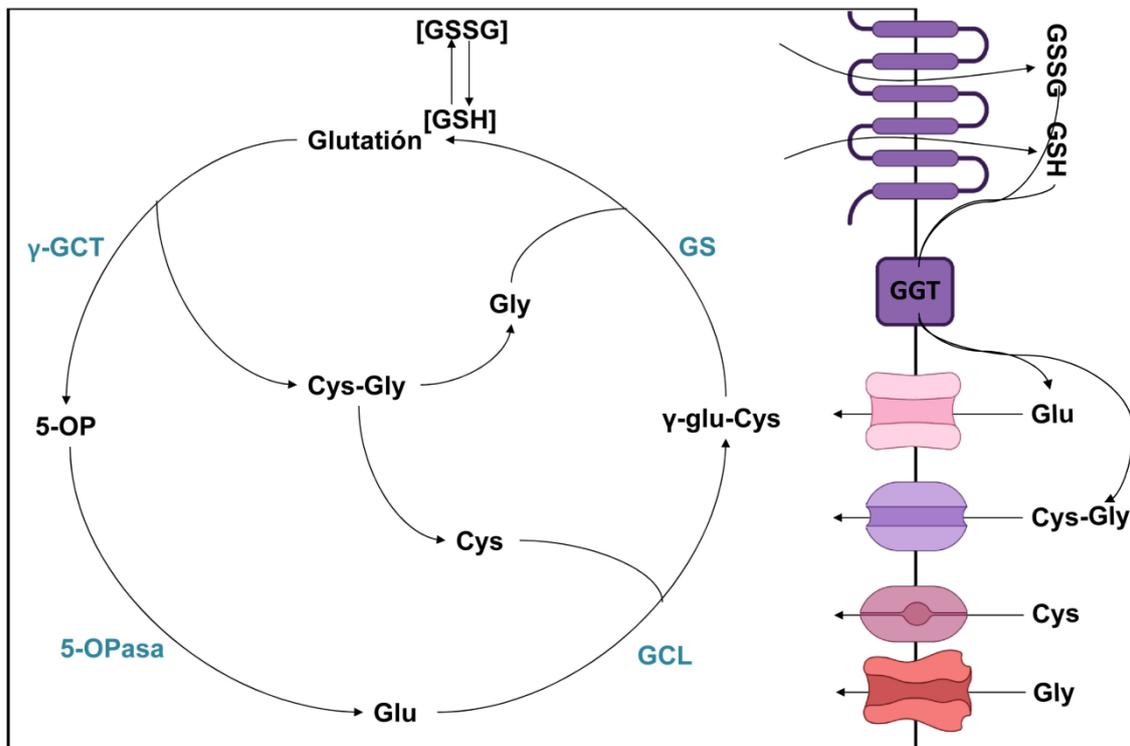


Figura E5. Esquema del ciclo del glutatión (adaptado de Bachhawat y Yadav 2018). El ciclo comienza con la síntesis de γ -glutamil-cisteína a partir de glutamato y cisteína catalizado por la GCL y posteriormente la GS sintetiza en una reacción dependiente de ATP la γ -glutamilcisteinil-glicina (glutatión). El glutatión será degradado mediante la acción de la γ -GCT que genera 5-oxoprolina y cisteinil-glicina que se transformará en cisteína y glicina. El glutatión formado se encuentra en la forma reducida (GSH) que puede transformarse en la forma oxidada (GSSG). Tanto el GSH como el GSSG pueden ser transportados hacia el exterior de la célula por transportadores específicos y ser metabolizados por la GGT que se encuentra anclada a la membrana plasmática, generándose glutamato y cisteinil-glicina. El glutamato puede ser transportado mediante transportadores específicos, así como la cisteinil-glicina que también puede ser transformada en cisteína y glicina por parte de peptidasas específicas y de nuevo ser transportados mediante transportadores específicos. Las enzimas implicadas se destacan en azul: GCL (glutamato-cisteína ligasa), GS (glutatión sintetasa), GGT (γ -glutamil transpeptidasa), γ -GCT (γ -glutamil ciclotransferasa), 5-OPasa (5-oxoprolinasa). AA (aminoácido). GSH (glutatión reducido), GSSG (glutatión oxidado).

Por último, el estudio metabolómico llevado a cabo sobre la línea RNAi para TbCDA-like puso de manifiesto un aumento generalizado de diversas clases de lípidos, como los fosfolípidos, en cuya síntesis está implicado el CTP. El CTP es el precursor directo de los intermediarios activados y ricos en energía de la vía de los fosfolípidos CDP-diacilglicerol, CDP-colina y CDP-etanolamina. De hecho, la mutación E161K en la CTP sintetasa de *S. cerevisiae* causa un aumento del contenido total de lípidos neutros, triacilgliceroles, ácidos grasos libres y ésteres de ergosterol (Ostrander, O'Brien et al. 1998).

Dado que los procesos apoptóticos y de estrés se han asociado a un incremento en la síntesis citosólica de lípidos (Taketo y Sonoshita 2002, Boren y Brindle 2012), esta observación podría ser algo inespecífico resultado de la incidencia de la depleción de TbCDA-like sobre la viabilidad celular. Por otra parte, no se puede descartar que la discreta acumulación de CTP que tiene lugar en la línea RNAi que también contribuya al incremento en la concentración de fosfolípidos observado.

E.2.3. Citidina desaminasas y edición de ARN

Las CDAs son enzimas multiméricas que catalizan la desaminación de Ctd y dCtd en de la ruta de salvamento de pirimidinas. APOBEC1, un miembro lejano de la familia de las CDAs, fue el primero para el que se demostró actividad desaminasa sobre la Ctd 6666 en el ARNm de la ApoB en mamíferos (Lerner, Papavasiliou et al. 2018) y para la cual se ha demostrado actividad de unión a ARN en regiones ricas en AU (Anant, MacGinnitie et al. 1995). Esta misma actividad se ha observado también en algunas CDAs cuya actividad se pensaba limitada únicamente al salvamento de pirimidinas como es el caso de la CDA de la filaria *B. pahangi* (Anant, Martin et al. 1997) o la CDA-1 y la CDA-2 de *C. elegans* (Thompson, Britton et al. 2002). Mientras que en estos últimos casos no se observa capacidad de edición del ARNm de ApoB, destacar que la CDA-1 de *S. cerevisiae* sí es capaz de llevar a cabo la desaminación de dicho ARNm (Dance, Beemiller et al. 2001).

Es interesante señalar que numerosos ARNms eucariotas incluyendo proto-oncogenes, factores de transcripción y citoquinas son ricos en elementos AU en las regiones 3'UTR, que han demostrado ser determinantes para la estabilidad del ARN *in vivo* (Chen y Shyu 1994, Chen, Xu et al. 1995), lo que abre la posibilidad acerca de si algunas CDAs pueden jugar algún papel en ese sentido más allá de la desaminación de nucleósidos. De hecho, se pensaba que la propia APOBEC1 se limitaba a editar el ARNm de ApoB pero recientemente se ha observado que se expresa en la mayoría de células inmunes murinas donde actúa sobre la región 3'UTR (ricas en elementos AU) de cientos de transcritos diferentes (Lerner, Papavasiliou et al. 2018).

Mientras que las CDAs no requieren de cofactores adicionales para llevar a cabo la desaminación de (d)Ctd, otras enzimas como APOBEC1 que actúan sobre ARN, necesitan de la participación de proteínas auxiliares (Dance, Beemiller et al. 2001, Smith 2017, Lerner, Papavasiliou et al. 2018). En ausencia de estas proteínas auxiliares exhiben una actividad de unión muy débil a secuencias de ARN ricas en elementos AU, lo que podría explicar que algunas CDAs que se unen a ARN no exhiben actividad desaminasa *in vitro* (Anant, Martin et al. 1997, Thompson, Britton et al. 2002).

La edición de Ctd a Urd en ARN parece estar más ampliamente distribuida de lo que se pensaba, estando en la mayoría de los casos restringida a las regiones 3'UTR, lo

que sugiere un papel en la estabilización, localización y traducción de los ARNm (Smith 2017, Lerner, Papavasiliou et al. 2018). Este hecho se hace especialmente importante en tripanosomátidos donde la transcripción es policistónica y la expresión génica parece estar regulada fundamentalmente a nivel post-transcripcional. De hecho, el papel de las regiones 3'UTRs en *T. brucei* es determinante para regular los niveles de ARNm. Estas 3'UTRs suelen tener un tamaño medio de 400 nucleótidos donde podrían actuar hasta 13 proteínas de unión a ARN diferentes (Clayton 2019). Éste podría ser el caso de TbCDA-like, que podría estar regulando la estabilidad de determinados ARNm y otras especies de ARN mediante desaminaciones de Ctd a Urd en posiciones concretas.

A la vista de que la CDA-1 de *S. cerevisiae* es capaz de llevar a cabo la desaminación del ARNm de ApoB además de la Ctd libre en forma de nucleósido, cabe preguntarse si los centros activos de las CDAs implicadas en la ruta de salvamento de pirimidinas son capaces de albergar sustratos de mayor tamaño que el nucleósido de (d)Ctd. Si se observa en detalle la estructura del centro activo de la CDA-1 de *S. cerevisiae* y la CDA de *M. musculus* o la propia CDA de *S. cerevisiae* (diferente de CDA-1), podemos concluir que las 2 últimas claramente no son capaces de albergar una cadena de ARN como sustrato. Esto es debido a que presentan una región polipeptídica mucho más voluminosa a la entrada del centro activo comparado con la CDA-1 de *S. cerevisiae* que deja mucho más espacio para albergar sustratos de mayor tamaño que un nucleósido (Xie, Sowden et al. 2004, Teh, Kimura et al. 2006). Sin embargo, es muy llamativo el hecho de que CDAs como la de *B. pahangi* o las CDA-1 y 2 de *C. elegans* presenten actividad de unión a ARN pese a la disposición de su centro activo y la ausencia de dominios de interacción con ácidos nucleicos en su secuencia (Anant, Martin et al. 1997, Thompson, Britton et al. 2002). Por otra parte, algo que sí se ha observado es que las CDAs que exhiben capacidad de unión a moléculas de ARN presentan en su secuencia dos residuos aromáticos conservados, el primero de los cuales es una tirosina o una histidina y el segundo es una fenilalanina (Tyr69/Phe98 para *B. pahangi*, His76/Phe105 y Tyr76/Phe105 para la CDA-1 y 2 de *C. elegans*, respectivamente, o His75/Phe106 para la CDA-1 de *S. cerevisiae*) (Teh, Kimura et al. 2006). En cambio, en otras CDAs como la de *E. coli* o *B. subtilis*, que no presentan actividad sobre ARN, estos residuos aromáticos son reemplazados por residuos lineales. De hecho, la importancia de los residuos aromáticos para interaccionar con cadenas de

ARN queda patente ya que si se mutan las fenilalaninas Phe66 y Phe87 a leucina en la secuencia de APOBEC1, se pierde la capacidad de edición así como la capacidad de unión al ARN (Navaratnam, Bhattacharya et al. 1995, Teh, Kimura et al. 2006). Por lo tanto, las CDAs que conserven dichos residuos aromáticos conservados en sus secuencias, tales como la CDA de *M. musculus* o incluso la humana podrían tener actividad sobre ARN.

JalView. Los aminoácidos que constituyen el dominio desaminasa están destacados con triángulos. Los residuos aromáticos que parecen jugar un papel destacado en cuanto a la actividad de unión al ARN están destacados con círculos. *Trypanosoma brucei* (CDA-like UniProtKB – Q38A89), *Leishmania major* (CDA-like UniProtKB – Q4Q0G6), *Escherichia coli* (CDA UniProtKB – P0ABF6), *Trypanosoma brucei* (CDA UniProtKB – Q38FM3), *Saccharomyces cerevisiae* (CDA-1 UniProtKB – Q06549), *Caenorhabditis elegans* (CDA-1 UniProtKB – Q22922; CDA-2 UniProtKB – Q20628), *Brugia pahangi* (CDA UniProtKB – Q93143), *Bacillus subtilis* (CDA UniProtKB – P19079), *Homo sapiens* (CDA UniProtKB – P32320), *Mus musculus* (CDA-like UniProtKB – P56389).

Si observamos el alineamiento de la figura E6, destaca el hecho de que TbCDA presenta en su secuencia un residuo de tirosina (Tyr84) como la CDA de *B. pahangi* (Tyr69), la de *M. musculus* (Tyr79) y la humana (Tyr79), haciendo sospechar que TbCDA podría presentar actividad sobre ARN, aunque no presenta el residuo conservado de fenilalanina, sino que se trata de una valina (Val123), que sí se encuentra en las secuencias de *B. pahangi* (Phe98), *M. musculus* (Phe109) y la humana (Phe109). En cualquier caso, se ha especulado con el hecho de que esta fenilalanina podría tener más un papel estructural que relacionado con una hipotética interacción con el ARN (Teh, Kimura et al. 2006). Por el contrario, en la secuencia de TbCDA-like, no se observa ninguno de estos residuos aromáticos conservados, aunque sería algo esperable puesto que se trata de una CDA perteneciente a una rama divergente respecto a las CDAs implicadas en el salvamento de pirimidinas (Iyer, Zhang et al. 2011) y además presenta en su secuencia un dominio tipo *zinc-finger* (Kramer, Kimblin et al. 2010) que sería el responsable de la aparente interacción de TbCDA-like con el ARN.

E.2.4. TbCDA-like está implicada en la respuesta a estrés en *T. brucei*

Un aspecto clave dentro de la regulación de la expresión génica es el control de los diferentes ARNm en el citoplasma mediante la regulación de su traducción, estabilidad y/o localización subcelular. Procesos que a menudo están conectados entre sí. Frecuentemente, la iniciación de la traducción y la degradación de los ARNms están inversamente relacionados y de hecho estos procesos suelen compartir algunas proteínas

(Buchan y Parker 2009). En células eucariotas los ARN que no se están traduciendo pueden acumularse fundamentalmente en dos tipos de gránulos constituidos por ribonucleoproteínas: los cuerpos de procesamiento (*processing bodies*, *P-bodies*) y los gránulos de estrés (SGs), cuya existencia es un claro reflejo de la organización dinámica de los ARNs y las proteínas que interaccionan con ellos.

Los *P-bodies* se encuentran de forma constitutiva en las células y tradicionalmente han sido considerados lugares de degradación de los ARNm. Sin embargo, se ha observado que en levaduras y células de mamífero los ARNm se pueden desplazar desde los *P-bodies* hacia los polisomas sugiriendo que estos focos, además de estar implicados en degradación del ARNm, pueden jugar un papel en su almacenamiento (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007). De hecho, se ha sugerido que el secuestro de diversos ARNm permite su rápida movilización para ser traducidos, evitando así que tengan que volver a transcribirse, procesarse y exportarse desde el núcleo. Se trataría por tanto de un sistema alternativo para el transporte de ARNm específicos desde o hacia los *P-bodies* para regular la traducción de proteínas en función de las necesidades de la célula (Ivanov, Kedersha et al. 2019).

El estrés celular implica una rápida reprogramación del metabolismo del ARN, de modo que el ensamblaje de los SGs ocurre una vez se ha producido el estímulo estresante como consecuencia del arresto de la traducción, de manera que la principal función propuesta para los SGs consistiría en el almacenamiento de los ARNm durante las situaciones de estrés celular (Kramer, Queiroz et al. 2008, Fritz, Vanselow et al. 2015). Se ha sugerido que los SGs actúan como centros de señalización de un “estado de emergencia” en la célula y que están implicados en el reclutamiento de una serie de moléculas señalizadoras relacionadas con la supervivencia celular y su adaptación, o por el contrario en la inducción de la apoptosis (Ivanov, Kedersha et al. 2019), coordinando los eventos de señalización tanto a nivel del citoplasma como del núcleo.

En *T. brucei*, así como en el resto de tripanosomátidos, la expresión génica presenta la peculiaridad de que la ARN polimerasa II no parece transcribir selectivamente genes individualizados, sino que la transcripción es policistónica de manera que la regulación de la expresión génica depende casi absolutamente de mecanismos de control post-transcripcional basados en proteínas de unión a ARN que regulan tanto la traducción como la estabilidad del ARNm. En este sentido, los gránulos

de ARN juegan un papel fundamental y, de hecho, los tripanosomátidos presentan un amplio repertorio de estructuras de este tipo (Fritz, Vanselow et al. 2015) como son: los *P-bodies* (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007, Kramer, Queiroz et al. 2008), los SGs que se forman en condiciones de estrés nutricional o choque térmico (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007, Kramer, Queiroz et al. 2008), los gránulos que se forman en la periferia del núcleo como consecuencia de la inhibición del proceso de *trans-splicing* (Kramer, Marnef et al. 2012), los gránulos del polo posterior y los gránulos que contienen mitades de ARNts (Kramer 2014).

Los gránulos de estrés nutricional son de mayor tamaño que los *P-bodies* y posiblemente están implicados en el almacenamiento y estabilización de los ARNm (Kramer, Queiroz et al. 2008, Fritz, Vanselow et al. 2015) durante el ciclo de vida de estos parásitos. A lo largo del ciclo de vida de *T. brucei* cada etapa de diferenciación requiere de un profundo cambio en la expresión génica de un elevado porcentaje de genes. De hecho, de forma similar a lo que ocurre con *Plasmodium* spp. existe alternancia entre fases proliferativas y no proliferativas en las que debe producirse una represión de la traducción. Un claro ejemplo de ello serían las formas sanguíneas rechonchas o *stumpy* que están a la espera de ser captadas por el insecto vector (Kramer 2014).

En *T. cruzi* se ha descrito la formación de SGs en los epimastigotes en el interior del insecto vector, lo que pone de manifiesto la más que probable implicación de estas estructuras en la fisiología del parásito a lo largo de su ciclo de vida (Cassola, De Gaudenzi et al. 2007). En el caso de *T. brucei* se ha descrito la formación de SGs en las formas procíclicas (Cassola 2011, Kramer 2014) que muy probablemente están expuestas a condiciones de cambios de temperatura y escasez de nutrientes en el interior del vector de forma similar a lo que ocurre con *T. cruzi*.

En *T. brucei*, las estructuras tipo *P-bodies* se expresan de manera constitutiva, al igual que ocurre en levaduras y células de mamífero y están constituidas principalmente por la helicasa TbDhh1, el represor de la traducción TbSCD6, la exorribonucleasa TbXRNA y el factor de iniciación de la traducción TbeIF4E1. Estos gránulos están en equilibrio con los polisomas, tal y como demuestra el hecho de que dichas estructuras desaparecen cuando el tratamiento con cicloheximida conduce al secuestro de los ARNms en los polisomas (Cassola 2011, Kramer 2014). Por otra parte, los SGs que se

forman en condiciones de estrés nutricional son a menudo difíciles de distinguir puesto que pese a ser de mayor tamaño también están constituidos por las proteínas TbDhh1, TbSCD6 y TbXRNA. Sin embargo, presentan tres de los cuatro ortólogos del factor de iniciación de la traducción eucariota eIF4E (TbeIF4E1-3), las proteínas PABP1 y PABP2 (*poly(A) binding protein 1 y 2*) y la proteína de unión a ARN TbDRBD3 entre otras. Así mismo, parecen almacenar y estabilizar ARNms poliadenilados durante periodos prolongados de inhibición de la traducción (Kramer 2014).

La correcta progresión de las diferentes etapas del ciclo de vida de estos parásitos depende del control del acceso del ARNm a la maquinaria de traducción mediante diferentes mecanismos como la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α , los micro-ARNs y las proteínas de unión a ARN. En este sentido, los gránulos de ARN constituyen un mecanismo regulatorio conservado en todos los organismos eucariotas y probablemente con funciones similares en organismos unicelulares y pluricelulares (Kramer 2014). En definitiva, los SGs en tripanosomátidos podrían estar jugando un papel fundamental en la regulación de la traducción mediante el reclutamiento de los ARNm que se almacenarían en estado quiescente sin ser traducidos y evitando su degradación, permitiendo al parásito restaurar su crecimiento cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas.

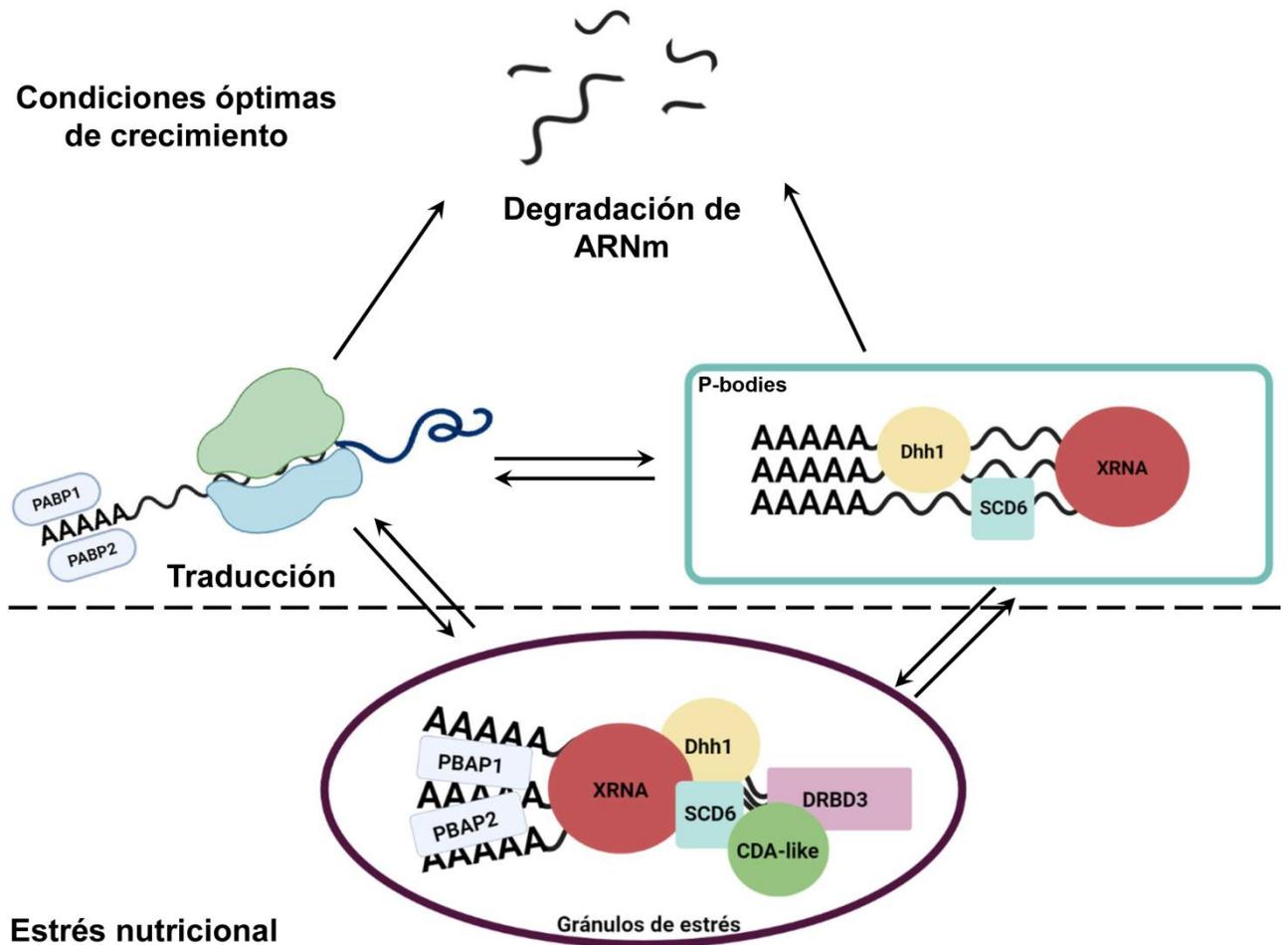


Figura E7. Esquema que muestra la dinámica de los P-bodies y los gránulos de estrés en *T. brucei* y la implicación de TbCDA-like en los mismos. En condiciones óptimas de crecimiento los ARNm están siendo continuamente traducidos en los polisomas, estructuras que están en equilibrio con los *P-bodies* que se expresan constitutivamente en la célula y en los que se produce el secuestro de diversos ARNm, que pueden ser degradados o devueltos posteriormente a la traducción. En condiciones de estrés nutricional los ARNm son secuestrados en estructuras denominadas gránulos de estrés con una composición similar a los *P-bodies* y en los que se produce la represión de la traducción para mantener a la célula en un estado quiescente. Cuando las condiciones vuelvan a ser óptimas, los ARNm pueden volver a ser traducidos en los polisomas reactivando el metabolismo de la célula. Figura creada con BioRender. PABP1/2 (*poly(A) binding protein 1/2*), SCD6 (*suppressor of clathrin deficiency 6*), DRBD3 (*double RNA binding domain protein 3*), XRNA (*5'-3' exoribonuclease A*), Dhh1 (*DEAD box RNA helicase*).

En este sentido, la localización de TbCDA-like en dichas estructuras podría implicar su secuestro para evitar que ejerza su actividad catalítica sobre determinados

ARNs. Dicha actividad catalítica podría conducir a la obtención de diferentes isoformas o variantes de una proteína concreta de manera análoga a lo que ocurre con APOBEC1 (Lerner, Papavasiliou et al. 2018). Podría también procesar la edición de determinados ARNts necesaria para su correcta función en la síntesis de proteínas a nivel citosólico o mitocondrial como ocurre con CDAT8 que edita la citidina en posición 8 de los ARNts del ácido aspártico, la cisteína y la histidina en *M. kandleri* (Randau, Stanley et al. 2009) o la recientemente descrita TbmCDAT (CDA mitocondrial que actúa sobre ARNt) implicada en la desaminación de la primera Ctd del anticodón del ARNt del triptófano en *T. brucei* (Paris, Svobodova et al. 2021). Es importante destacar en este sentido que los ARNts en *T. brucei* son sintetizados en el núcleo para ser importados posteriormente a la mitocondria (Simpson, Suyama et al. 1989, Hancock and Hajduk 1990, Schneider 1994) de manera que en algunos casos, puede ser necesaria la desaminación de alguna de sus posiciones para su correcta actividad.

Finalmente cabe destacar el posible papel de TbCDA-like en el control de la diferenciación de *T. brucei*, de manera análoga a lo que ocurre en hongos filamentosos que al igual que los tripanosomátidos carecen de ortólogos de ADAR y en los que se ha descrito recientemente la desaminación de adenosina a inosina en ARN y su implicación en la diferenciación sexual (Bian, Ni et al. 2019). Además, se ha especulado con el hecho de que a menudo los hongos se diferencian para llevar a cabo el ciclo de reproducción sexual cuando las condiciones ambientales son adversas, como es el caso del estrés por falta de nutrientes o por choque térmico (Hadany and Otto 2007, Wallen and Perlin 2018), condiciones en las que se ha descrito la formación de gránulos de estrés en *T. brucei*. En cualquier caso por el momento no existe ninguna evidencia de la existencia de un proceso de desaminación enzimática de ARNm en *Trypanosoma brucei* que permitiera especular con los posible sustratos. El papel exacto de TbCDA-like en el metabolismo de RNA por tanto queda por ser determinado.

CONCLUSIONES

F. CONCLUSIONES

1. *Trypanosoma brucei* expresa una citidina desaminasa (TbCDA) con un alto grado de homología con otros ortólogos eucariotas como la enzima humana. TbCDA se dispone en forma de homotetrámero en su conformación nativa y presenta 3 residuos de cisteína que se coordinan con el zinc y 2 residuos de tirosina implicados en la estabilización de la estructura y la unión al sustrato, característicos de las CDAs tetraméricas descritas hasta fecha.
2. TbCDA sigue una cinética de Michaelis-Menten y desamina eficientemente citidina, desoxicitidina y análogos de éstos tales como la 5-metil-2'-desoxicitidina. Los parámetros cinéticos obtenidos son del mismo orden de magnitud que los de otras CDAs de diferentes organismos. No presenta actividad frente a dCMP ni citosina.
3. La reducción de la expresión de TbCDA produce un fenotipo de pérdida de viabilidad que puede revertirse mediante la adición de concentraciones elevadas de timidina o desoxiuridina, lo que apoya su papel en la síntesis de timidilato (dTMP). TbCDA actuaría desaminando desoxicitidina para generar desoxiuridina que será fosforilada hasta dUMP vía TbTK.
4. TbCDA es una enzima mitocondrial tanto en las formas sanguíneas como procíclicas de *T. brucei*, reforzando la importancia de dicho orgánulo en el metabolismo de pirimidinas.
5. El hecho de que la dCMP desaminasa humana no sea capaz de compensar la ausencia de la TbdUTPasa demuestra que ésta no juega un papel relevante en la provisión de dUMP para la síntesis de dTMP. Por lo tanto, el papel esencial de la TbdUTPasa sería el mantenimiento del ratio dUTP/dTTP en *T. brucei*.
6. *T. brucei* expresa una citidina desaminasa – like (TbCDA-like) de función desconocida perteneciente a una rama divergente dentro del clado derivado de las citidina desaminasas. Es una proteína altamente conservada en kinetoplastidos, cuya secuencia se caracteriza por presentar un dominio tipo CDA en la región C-terminal y un dominio de dedos de zinc que sugiere su posible papel actuando sobre ácidos nucleicos.
7. TbCDA-like es una proteína esencial tanto en la forma sanguínea como procíclica de *T. brucei*. La sobreexpresión y la deficiencia de la enzima afectan

significativamente a la proliferación del parásito y a la progresión del ciclo celular, sugiriendo que los niveles de expresión están altamente regulados. Así mismo, la activación de la cascada de señalización de daño mediada por la histona γ H2A, confirma la implicación de TbCDA-like en el mantenimiento de la integridad genómica.

8. La deficiencia de TbCDA-like afecta al perfil metabolómico con una destacada acumulación de CMP y en menor medida de citosina y orotato, así como una afectación generalizada de los γ -glutamil aminoácidos y otros metabolitos implicados en el metabolismo de aminoácidos. Por otra parte está implicada en el mantenimiento del ratio CTP/UTP, sugiriendo que participa en la homeostasis del CTP u otros derivados de la citidina.
9. Estudios de irradiación con luz UV y posterior extracción del ARN en base al método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, demuestran que TbCDA-like presenta actividad de unión a ARN.
10. TbCDA-like se localiza en el citoplasma de las células procíclicas de *T. brucei* mostrando un patrón granulado característico de proteínas que interaccionan con ARN. Cuando se somete a los parásitos a condiciones de estrés nutricional la enzima se relocaliza en estructuras denominadas gránulos de estrés, reforzando la hipótesis de que TbCDA-like está implicada en el metabolismo de ARN en *T. brucei*.
11. Estudios de RNAseq demuestran que la sobreexpresión de TbCDA-like afecta a la expresión de genes implicados en el metabolismo de nucleótidos y ARN, lo que parece indicar un papel de la enzima en ambos procesos.

REFERENCIAS

G. REFERENCIAS

- Alfonzo, J. D., V. Blanc, A. M. Estevez, M. A. Rubio and L. Simpson (1999). "C to U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA(Trp) allows decoding of the UGA stop codon in *Leishmania tarentolae*." EMBO J **18**(24): 7056-7062.
- Ali, J. A., D. J. Creek, K. Burgess, H. C. Allison, M. C. Field, P. Maser and H. P. De Koning (2013). "Pyrimidine salvage in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and the trypanocidal action of halogenated pyrimidines." Mol Pharmacol **83**(2): 439-453.
- Ali, J. A., D. N. Tagoe, J. C. Munday, A. Donachie, L. J. Morrison and H. P. de Koning (2013). "Pyrimidine biosynthesis is not an essential function for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms." PLoS One **8**(3): e58034.
- Allmann, S. and F. Bringaud (2017). "Glycosomes: A comprehensive view of their metabolic roles in *T. brucei*." Int J Biochem Cell Biol **85**: 85-90.
- Almog, R., F. Maley, G. F. Maley, R. Maccoll and P. Van Roey (2004). "Three-dimensional structure of the R115E mutant of T4-bacteriophage 2'-deoxycytidylate deaminase." Biochemistry **43**(43): 13715-13723.
- Alsford, S. and D. Horn (2008). "Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **161**(1): 76-79.
- Amigo, I., J. Traba, M. M. Gonzalez-Barroso, C. B. Rueda, M. Fernandez, E. Rial, A. Sanchez, J. Satrustegui and A. Del Arco (2013). "Glucagon regulation of oxidative phosphorylation requires an increase in matrix adenine nucleotide content through Ca²⁺ activation of the mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCaMC-3." J Biol Chem **288**(11): 7791-7802.
- Anant, S., A. J. MacGinnitie and N. O. Davidson (1995). "apobec-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, is a novel RNA-binding protein." J Biol Chem **270**(24): 14762-14767.
- Anant, S., S. A. Martin, H. Yu, A. J. MacGinnitie, E. Devaney and N. O. Davidson (1997). "A cytidine deaminase expressed in the post-infective L3 stage of the filarial nematode, *Brugia pahangi*, has a novel RNA-binding activity." Mol Biochem Parasitol **88**(1-2): 105-114.

- Anderson, D. D., C. M. Quintero and P. J. Stover (2011). "Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15163-15168.
- Andres-Leon, E., R. Nunez-Torres and A. M. Rojas (2016). "miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis." Sci Rep **6**: 25749.
- Andrews, S. (2010). Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.
- Appling, D. R. (1991). "Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes." FASEB J **5**(12): 2645-2651.
- Arakaki, T. L., F. S. Buckner, J. R. Gillespie, N. A. Malmquist, M. A. Phillips, O. Kalyuzhniy, J. R. Luft, G. T. Detitta, C. L. Verlinde, W. C. Van Voorhis, W. G. Hol and E. A. Merritt (2008). "Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies." Mol Microbiol **68**(1): 37-50.
- Bachhawat, A. K. and S. Yadav (2018). "The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the gamma-glutamyl cycle." IUBMB Life **70**(7): 585-592.
- Baker, C. H. and S. C. Welburn (2018). "The Long Wait for a New Drug for Human African Trypanosomiasis." Trends Parasitol **34**(10): 818-827.
- Beck, C. F., A. R. Eisenhardt and J. Neuhard (1975). "Deoxycytidine triphosphate deaminase of Salmonella typhimurium. Purification and characterization." J Biol Chem **250**(2): 609-616.
- Bellofatto, V. (2007). "Pyrimidine transport activities in trypanosomes." Trends Parasitol **23**(5): 187-189; discussion 190.
- Bellofatto, V. and G. A. Cross (1989). "Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan." Science **244**(4909): 1167-1169.
- Berg, M., P. Van der Veken, A. Goeminne, A. Haemers and K. Augustyns (2010). "Inhibitors of the Purine Salvage Pathway: A Valuable Approach for Antiprotozoal Chemotherapy?" Curr Med Chem **17**(23): 2456-2481.
- Betts, L., S. Xiang, S. A. Short, R. Wolfenden and C. W. Carter, Jr. (1994). "Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex." J Mol Biol **235**(2): 635-656.
- Bian, Z., Y. Ni, J. R. Xu and H. Liu (2019). "A-to-I mRNA editing in fungi: occurrence, function, and evolution." Cell Mol Life Sci **76**(2): 329-340.

- Biebinger, S., L. E. Wirtz, P. Lorenz and C. Clayton (1997). "Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **85**(1): 99-112.
- Bjornberg, O., J. Neuhard and P. O. Nyman (2003). "A bifunctional dCTP deaminase-dUTP nucleotidohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*." J Biol Chem **278**(23): 20667-20672.
- Bolte, S. and F. P. Cordelieres (2006). "A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy." J Microsc **224**(Pt 3): 213-232.
- Boren, J. and K. M. Brindle (2012). "Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation." Cell Death Differ **19**(9): 1561-1570.
- Bridges, R. J. and A. Meister (1985). "gamma-Glutamyl amino acids. Transport and conversion to 5-oxoproline in the kidney." J Biol Chem **260**(12): 7304-7308.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." Mol Cell **36**(6): 932-941.
- Bullock WO, F. J. M. a. S. J. M. (1987). "XL1-Blue a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection." Biotechniques **5**: 376-379.
- Buscher, P., G. Cecchi, V. Jamonneau and G. Priotto (2017). "Human African trypanosomiasis." Lancet **390**(10110): 2397-2409.
- Camacho, A., F. Hidalgo-Zarco, V. Bernier-Villamor, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2000). "Properties of *Leishmania major* dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids." Biochem J **346 Pt 1**: 163-168.
- Campagnaro, G. D., K. J. Alzahrani, J. C. Munday and H. P. De Koning (2018). "Trypanosoma brucei bloodstream forms express highly specific and separate transporters for adenine and hypoxanthine; evidence for a new protozoan purine transporter family?" Mol Biochem Parasitol **220**: 46-56.
- Cassola, A. (2011). "RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case." Curr Chem Biol **5**(2): 108-117.
- Cassola, A., J. G. De Gaudenzi and A. C. Frasch (2007). "Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes." Mol Microbiol **65**(3): 655-670.
- Castillo-Acosta, V. M., F. Aguilar-Pereyra, D. Garcia-Caballero, A. E. Vidal, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2013). "Pyrimidine requirements in

- deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase deficient *Trypanosoma brucei* mutants." Mol Biochem Parasitol **187**(1): 9-13.
- Castillo-Acosta, V. M., F. Aguilar-Pereyra, A. E. Vidal, M. Navarro, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2012). "Trypanosomes lacking uracil-DNA glycosylase are hypersensitive to antifolates and present a mutator phenotype." Int J Biochem Cell Biol **44**(9): 1555-1568.
- Castillo-Acosta, V. M., A. M. Estevez, A. E. Vidal, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2008). "Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*." Int J Biochem Cell Biol **40**(12): 2901-2913.
- Chen, C. Y. and A. B. Shyu (1994). "Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements." Mol Cell Biol **14**(12): 8471-8482.
- Chen, C. Y., N. Xu and A. B. Shyu (1995). "mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation." Mol Cell Biol **15**(10): 5777-5788.
- Chen, M., M. Herde and C. P. Witte (2016). "Of the Nine Cytidine Deaminase-Like Genes in Arabidopsis, Eight Are Pseudogenes and Only One Is Required to Maintain Pyrimidine Homeostasis in Vivo." Plant Physiol **171**(2): 799-809.
- Christofi, T. and A. Zaravinos (2019). "RNA editing in the forefront of epitranscriptomics and human health." J Transl Med **17**(1): 319.
- Chung, S. J., J. C. Fromme and G. L. Verdine (2005). "Structure of human cytidine deaminase bound to a potent inhibitor." J Med Chem **48**(3): 658-660.
- Clayton, C. (2019). "Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription." Open Biol **9**(6): 190072.
- Clayton, C. E. (2016). "Gene expression in Kinetoplastids." Curr Opin Microbiol **32**: 46-51.
- Clayton, C. E., A. M. Estevez, C. Hartmann, V. P. Alibu, M. Field and D. Horn (2005). "Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*." Methods Mol Biol **309**: 39-60.
- Colasante, C., V. P. Alibu, S. Kirchberger, J. Tjaden, C. Clayton and F. Voncken (2006). "Characterization and developmentally regulated localization of the

- mitochondrial carrier protein homologue MCP6 from *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell **5**(8): 1194-1205.
- Colasante, C., P. Pena Diaz, C. Clayton and F. Voncken (2009). "Mitochondrial carrier family inventory of *Trypanosoma brucei brucei*: Identification, expression and subcellular localisation." Mol Biochem Parasitol **167**(2): 104-117.
- Conticello, S. G. (2008). "The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators." Genome Biol **9**(6): 229.
- Cristodero, M., B. Schimanski, M. Heller and I. Roditi (2014). "Functional characterization of the trypanosome translational repressor SCD6." Biochem J **457**(1): 57-67.
- Dance, G. S., P. Beemiller, Y. Yang, D. V. Mater, I. S. Mian and H. C. Smith (2001). "Identification of the yeast cytidine deaminase CDD1 as an orphan C-->U RNA editase." Nucleic Acids Res **29**(8): 1772-1780.
- de Koning, H. P., C. J. Watson, L. Sutcliffe and S. M. Jarvis (2000). "Differential regulation of nucleoside and nucleobase transporters in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei brucei*." Mol Biochem Parasitol **106**(1): 93-107.
- Dickie, E. A., F. Giordani, M. K. Gould, P. Maser, C. Burri, J. C. Mottram, S. P. S. Rao and M. P. Barrett (2020). "New Drugs for Human African Trypanosomiasis: A Twenty First Century Success Story." Trop Med Infect Dis **5**(1).
- Dixit, S., J. C. Henderson and J. D. Alfonzo (2019). "Multi-Substrate Specificity and the Evolutionary Basis for Interdependence in tRNA Editing and Methylation Enzymes." Front Genet **10**: 104.
- Dolezelova, E., D. Teran, O. Gahura, Z. Kotrbova, M. Prochazkova, D. Keough, P. Spacek, D. Hockova, L. Guddat and A. Zikova (2018). "Evaluation of the *Trypanosoma brucei* 6-oxopurine salvage pathway as a potential target for drug discovery." PLoS Negl Trop Dis **12**(2): e0006301.
- Engels, D. and X. N. Zhou (2020). "Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities." Infect Dis Poverty **9**(1): 10.
- Fernandez-Moya, S. M., A. Garcia-Perez, S. Kramer, M. Carrington and A. M. Estevez (2012). "Alterations in DRBD3 ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*." PLoS One **7**(11): e48870.
- Field, M. C. and M. Carrington (2009). "The trypanosome flagellar pocket." Nat Rev Microbiol **7**(11): 775-786.

- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick and et al. (1995). "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd." Science **269**(5223): 496-512.
- Frances, A. and P. Cordelier (2020). "The Emerging Role of Cytidine Deaminase in Human Diseases: A New Opportunity for Therapy?" Mol Ther **28**(2): 357-366.
- Frisk, J. H., S. Eriksson, G. Pejler and L. Wang (2020). "Identification of a novel thymidylate kinase activity." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **39**(10-12): 1359-1368.
- Fritz, M., J. Vanselow, N. Sauer, S. Lamer, C. Goos, T. N. Siegel, I. Subota, A. Schlosser, M. Carrington and S. Kramer (2015). "Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve." Nucleic Acids Res **43**(16): 8013-8032.
- Gandhi, V. V. and D. C. Samuels (2011). "A review comparing deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) concentrations in the mitochondrial and cytoplasmic compartments of normal and transformed cells." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **30**(5): 317-339.
- Gao, F., F. Voncken and C. Colasante (2020). "The mitochondrial phosphate carrier TbMCP11 is essential for mitochondrial function in the procyclic form of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **237**: 111275.
- Gao, J. M., Z. Y. Qian, G. Hide, D. H. Lai, Z. R. Lun and Z. D. Wu (2020). "Human African trypanosomiasis: the current situation in endemic regions and the risks for non-endemic regions from imported cases." Parasitology **147**(9): 922-931.
- Gemble, S., A. Ahuja, G. Buhagiar-Labarchede, R. Onclercq-Delic, J. Dairou, D. S. Biard, S. Lambert, M. Lopes and M. Amor-Gueret (2015). "Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA." PLoS Genet **11**(7): e1005384.
- Gemble, S., G. Buhagiar-Labarchede, R. Onclercq-Delic, D. Biard, S. Lambert and M. Amor-Gueret (2016). "A balanced pyrimidine pool is required for optimal Chk1 activation to prevent ultrafine anaphase bridge formation." J Cell Sci **129**(16): 3167-3177.
- Gerhart, J. (2014). "From feedback inhibition to allostery: the enduring example of aspartate transcarbamoylase." FEBS J **281**(2): 612-620.

- Girardi, E., G. Agrimi, U. Goldmann, G. Fiume, S. Lindinger, V. Sedlyarov, I. Srndic, B. Gurtl, B. Agerer, F. Kartnig, P. Scarcia, M. A. Di Noia, E. Lineiro, M. Rebsamen, T. Wiedmer, A. Bergthaler, L. Palmieri and G. Superti-Furga (2020). "Epistasis-driven identification of SLC25A51 as a regulator of human mitochondrial NAD import." Nat Commun **11**(1): 6145.
- Glover, L. and D. Horn (2012). "Trypanosomal histone gammaH2A and the DNA damage response." Mol Biochem Parasitol **183**(1): 78-83.
- Goujon, M., H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern and R. Lopez (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W695-699.
- Griffith, O. W., R. J. Bridges and A. Meister (1979). "Transport of gamma-glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(12): 6319-6322.
- Gudin, S., N. B. Quashie, D. Candlish, M. I. Al-Salabi, S. M. Jarvis, L. C. Ranford-Cartwright and H. P. de Koning (2006). "Trypanosoma brucei: a survey of pyrimidine transport activities." Exp Parasitol **114**(2): 118-125.
- Haanstra, J. R., B. M. Bakker and P. A. Michels (2014). "In or out? On the tightness of glycosomal compartmentalization of metabolites and enzymes in Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **198**(1): 18-28.
- Hadany, L. and S. P. Otto (2007). "The evolution of condition-dependent sex in the face of high costs." Genetics **176**(3): 1713-1727.
- Hall, R. S., A. A. Fedorov, C. Xu, E. V. Fedorov, S. C. Almo and F. M. Raushel (2011). "Three-dimensional structure and catalytic mechanism of cytosine deaminase." Biochemistry **50**(22): 5077-5085.
- Hammarton, T. C. (2007). "Cell cycle regulation in Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **153**(1): 1-8.
- Hammond, D. J. and W. E. Gutteridge (1984). "Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae." Mol Biochem Parasitol **13**(3): 243-261.
- Hancock, K. and S. L. Hajduk (1990). "The mitochondrial tRNAs of Trypanosoma brucei are nuclear encoded." J Biol Chem **265**(31): 19208-19215.
- Hanigan, M. H. (2014). "Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance." Adv Cancer Res **122**: 103-141.

- Hayes, M. L. and P. I. Santibanez (2020). "A plant pentatricopeptide repeat protein with a DYW-deaminase domain is sufficient for catalyzing C-to-U RNA editing in vitro." J Biol Chem **295**(11): 3497-3505.
- Helfert, S., A. M. Estevez, B. Bakker, P. Michels and C. Clayton (2001). "Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*." Biochem J **357**(Pt 1): 117-125.
- Helt, S. S., M. Thymark, P. Harris, C. Aagaard, J. Dietrich, S. Larsen and M. Willemoes (2008). "Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase:dUTPase encoded by *Mycobacterium tuberculosis*." J Mol Biol **376**(2): 554-569.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B. C. Li and R. Herrmann (1996). "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*." Nucleic Acids Res **24**(22): 4420-4449.
- Hofer, A., D. Steverding, A. Chabes, R. Brun and L. Thelander (2001). "Trypanosoma brucei CTP synthetase: a target for the treatment of African sleeping sickness." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6412-6416.
- Hoffmann, A., S. Kaser, M. Jakob, S. Amodeo, C. Peitsch, J. Tyc, S. Vaughan, B. Zuber, A. Schneider and T. Ochsenreiter (2018). "Molecular model of the mitochondrial genome segregation machinery in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(8): E1809-E1818.
- Horn, D. (2014). "Antigenic variation in African trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **195**(2): 123-129.
- Hou, H. F., Y. H. Liang, L. F. Li, X. D. Su and Y. H. Dong (2008). "Crystal structures of *Streptococcus mutans* 2'-deoxycytidylate deaminase and its complex with substrate analog and allosteric regulator dCTP x Mg²⁺." J Mol Biol **377**(1): 220-231.
- Hunger-Glaser, I., A. Hemphill, T. Shalaby, M. Hanni and T. Seebeck (2000). "Nucleoside diphosphate kinase of *Trypanosoma brucei*." Gene **257**(2): 251-257.
- Ireton, G. C., M. E. Black and B. L. Stoddard (2003). "The 1.14 Å crystal structure of yeast cytosine deaminase: evolution of nucleotide salvage enzymes and implications for genetic chemotherapy." Structure **11**(8): 961-972.
- Ireton, G. C., G. McDermott, M. E. Black and B. L. Stoddard (2002). "The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase." J Mol Biol **315**(4): 687-697.
- Ivanov, P., N. Kedersha and P. Anderson (2019). "Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control." Cold Spring Harb Perspect Biol **11**(5).

- Iyer, L. M., D. Zhang, I. B. Rogozin and L. Aravind (2011). "Evolution of the deaminase fold and multiple origins of eukaryotic editing and mutagenic nucleic acid deaminases from bacterial toxin systems." Nucleic Acids Res **39**(22): 9473-9497.
- Izhaki-Tavor, L. S. and M. Dessau (2020). "ATP-dependent RNA helicase domain of the ZC3H41 protein from *Trypanosoma brucei*: expression, purification and crystallization." Acta Crystallogr F Struct Biol Commun **76**(Pt 12): 604-608.
- Jin, Y., W. Zhang and Q. Li (2009). "Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing." IUBMB Life **61**(6): 572-578.
- Johansson, E., M. Fano, J. H. Bynck, J. Neuhard, S. Larsen, B. W. Sigurskjold, U. Christensen and M. Willemoes (2005). "Structures of dCTP deaminase from *Escherichia coli* with bound substrate and product: reaction mechanism and determinants of mono- and bifunctionality for a family of enzymes." J Biol Chem **280**(4): 3051-3059.
- Johansson, E., N. Mejlhede, J. Neuhard and S. Larsen (2002). "Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution." Biochemistry **41**(8): 2563-2570.
- Johansson, E., J. Neuhard, M. Willemoes and S. Larsen (2004). "Structural, kinetic, and mutational studies of the zinc ion environment in tetrameric cytidine deaminase." Biochemistry **43**(20): 6020-6029.
- Johansson, E., M. Thymark, J. H. Bynck, M. Fano, S. Larsen and M. Willemoes (2007). "Regulation of dCTP deaminase from *Escherichia coli* by nonallosteric dTTP binding to an inactive form of the enzyme." FEBS J **274**(16): 4188-4198.
- Keefe, R. G., G. F. Maley, R. L. Saxl and F. Maley (2000). "A T4-phage deoxycytidylate deaminase mutant that no longer requires deoxycytidine 5'-triphosphate for activation." J Biol Chem **275**(17): 12598-12602.
- Kennedy, P. G. E. and J. Rodgers (2019). "Clinical and Neuropathogenetic Aspects of Human African Trypanosomiasis." Front Immunol **10**: 39.
- Kim, D., B. Langmead and S. L. Salzberg (2015). "HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements." Nat Methods **12**(4): 357-360.
- Ko, T. P., J. J. Lin, C. Y. Hu, Y. H. Hsu, A. H. Wang and S. H. Liaw (2003). "Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution." J Biol Chem **278**(21): 19111-19117.
- Kobayashi, S., Y. Ikeda, Y. Shigeno, H. Konno and J. Fujii (2020). "gamma-Glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transferase as differential

- enzymatic sources of gamma-glutamylpeptides in mice." *Amino Acids* **52**(4): 555-566.
- Kohnken, R., K. M. Kodigepalli and L. Wu (2015). "Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications." *Mol Cancer* **14**: 176.
- Kramer, S. (2014). "RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**(2): 263-284.
- Kramer, S., N. C. Kimblin and M. Carrington (2010). "Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*." *BMC Genomics* **11**: 283.
- Kramer, S., A. Marnef, N. Standart and M. Carrington (2012). "Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate." *J Cell Sci* **125**(Pt 12): 2896-2909.
- Kramer, S., R. Queiroz, L. Ellis, H. Webb, J. D. Hoheisel, C. Clayton and M. Carrington (2008). "Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169." *J Cell Sci* **121**(Pt 18): 3002-3014.
- Kruger, T., M. Hofweber and S. Kramer (2013). "SCD6 induces ribonucleoprotein granule formation in trypanosomes in a translation-independent manner, regulated by its Lsm and RGG domains." *Mol Biol Cell* **24**(13): 2098-2111.
- Lacombe, M. L., M. Tokarska-Schlattner, R. F. Epanand, M. Boissan, R. M. Epanand and U. Schlattner (2009). "Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology." *Biochimie* **91**(6): 779-783.
- Langousis, G. and K. L. Hill (2014). "Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*." *Nat Rev Microbiol* **12**(7): 505-518.
- Lee, M. H., L. Wang and Z. F. Chang (2014). "The contribution of mitochondrial thymidylate synthesis in preventing the nuclear genome stress." *Nucleic Acids Res* **42**(8): 4972-4984.
- Leija, C., F. Rijo-Ferreira, L. N. Kinch, N. V. Grishin, N. Nischan, J. J. Kohler, Z. Hu and M. A. Phillips (2016). "Pyrimidine Salvage Enzymes Are Essential for De Novo Biosynthesis of Deoxypyrimidine Nucleotides in *Trypanosoma brucei*." *PLoS Pathog* **12**(11): e1006010.

- Lerner, T., F. N. Papavasiliou and R. Pecori (2018). "RNA Editors, Cofactors, and mRNA Targets: An Overview of the C-to-U RNA Editing Machinery and Its Implication in Human Disease." Genes (Basel) **10**(1).
- Li, H., H. Xu, D. E. Graham and R. H. White (2003). "The Methanococcus jannaschii dCTP deaminase is a bifunctional deaminase and diphosphatase." J Biol Chem **278**(13): 11100-11106.
- Li, Q., C. Leija, F. Rijo-Ferreira, J. Chen, I. Cestari, K. Stuart, B. P. Tu and M. A. Phillips (2015). "GMP synthase is essential for viability and infectivity of Trypanosoma brucei despite a redundant purine salvage pathway." Mol Microbiol **97**(5): 1006-1020.
- Li, Y., Z. Guo, L. Jin, D. Wang, Z. Gao, X. Su, H. Hou and Y. Dong (2016). "Mechanism of the allosteric regulation of Streptococcus mutans 2'-deoxycytidylate deaminase." Acta Crystallogr D Struct Biol **72**(Pt 7): 883-891.
- Li, Z. (2012). "Regulation of the cell division cycle in Trypanosoma brucei." Eukaryot Cell **11**(10): 1180-1190.
- Liu, W., F. Shang, Y. Chen, J. Lan, L. Wang, J. Chen, P. Gao, N. C. Ha, C. Quan, K. H. Nam and Y. Xu (2019). "Biochemical and structural analysis of the Klebsiella pneumoniae cytidine deaminase CDA." Biochem Biophys Res Commun **519**(2): 280-286.
- Lynch, E. M., D. R. Hicks, M. Shepherd, J. A. Endrizzi, A. Maker, J. M. Hansen, R. M. Barry, Z. Gitai, E. P. Baldwin and J. M. Kollman (2017). "Human CTP synthase filament structure reveals the active enzyme conformation." Nat Struct Mol Biol **24**(6): 507-514.
- Maley, G. F., A. P. Lobo and F. Maley (1993). "Properties of an affinity-column-purified human deoxycytidylate deaminase." Biochim Biophys Acta **1162**(1-2): 161-170.
- Mameri, H., I. Bieche, D. Meseure, E. Marangoni, G. Buhagiar-Labarchede, A. Nicolas, S. Vacher, R. Onclercq-Delic, V. Rajapakse, S. Varma, W. C. Reinhold, Y. Pommier and M. Amor-Gueret (2017). "Cytidine Deaminase Deficiency Reveals New Therapeutic Opportunities against Cancer." Clin Cancer Res **23**(8): 2116-2126.
- Marx, A. and A. Alian (2015). "The first crystal structure of a dTTP-bound deoxycytidylate deaminase validates and details the allosteric-inhibitor binding site." J Biol Chem **290**(1): 682-690.

- McCluskey, G. D. and S. L. Bearne (2018). "Anfractuous assemblies of IMP dehydrogenase and CTP synthase: new twists on regulation?" FEBS J **285**(20): 3724-3728.
- McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley and R. Lopez (2013). "Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI." Nucleic Acids Res **41**(Web Server issue): W597-600.
- Micozzi, D., F. M. Carpi, S. Pucciarelli, V. Polzonetti, P. Polidori, S. Vilar, B. Williams, S. Costanzi and S. Vincenzetti (2014). "Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants." Int J Biol Macromol **63**: 64-74.
- Micozzi, D., S. Pucciarelli, F. M. Carpi, S. Costanzi, G. De Sanctis, V. Polzonetti, P. Natalini, I. F. Santarelli, A. Vita and S. Vincenzetti (2010). "Role of tyrosine 33 residue for the stabilization of the tetrameric structure of human cytidine deaminase." Int J Biol Macromol **47**(4): 471-482.
- Mistry, J., S. Chuguransky, L. Williams, M. Qureshi, G. A. Salazar, E. L. L. Sonnhammer, S. C. E. Tosatto, L. Paladin, S. Raj, L. J. Richardson, R. D. Finn and A. Bateman (2021). "Pfam: The protein families database in 2021." Nucleic Acids Res **49**(D1): D412-D419.
- Moro-Bulnes, A., V. M. Castillo-Acosta, M. Valente, J. Carrero-Lerida, G. Perez-Moreno, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2019). "Contribution of Cytidine Deaminase to Thymidylate Biosynthesis in Trypanosoma brucei: Intracellular Localization and Properties of the Enzyme." mSphere **4**(4).
- Mugnier, M. R., C. E. Stebbins and F. N. Papavasiliou (2016). "Masters of Disguise: Antigenic Variation and the VSG Coat in Trypanosoma brucei." PLoS Pathog **12**(9): e1005784.
- Natto, M. J., L. J. Wallace, D. Candlish, M. I. Al-Salabi, S. E. Coutts and H. P. de Koning (2005). "Trypanosoma brucei: expression of multiple purine transporters prevents the development of allopurinol resistance." Exp Parasitol **109**(2): 80-86.
- Navaratnam, N., S. Bhattacharya, T. Fujino, D. Patel, A. L. Jarmuz and J. Scott (1995). "Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site." Cell **81**(2): 187-195.
- Neau, P., H. Hanel, V. Lameyre, N. Strub-Wourgaft and L. Kuykens (2020). "Innovative Partnerships for the Elimination of Human African Trypanosomiasis and the Development of Fexinidazole." Trop Med Infect Dis **5**(1).

- Neuburger, M., F. Rebeille, A. Jourdain, S. Nakamura and R. Douce (1996). "Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants." J Biol Chem **271**(16): 9466-9472.
- Nikolayeva, O. and M. D. Robinson (2014). "edgeR for differential RNA-seq and ChIP-seq analysis: an application to stem cell biology." Methods Mol Biol **1150**: 45-79.
- Nishikura, K. (2010). "Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases." Annu Rev Biochem **79**: 321-349.
- O'Donovan, G. A., S. Herlick, D. E. Beck and P. K. Dutta (1989). "UTP/CTP ratio, an important regulatory parameter for ATCase expression." Arch Microbiol **153**(1): 19-25.
- Ogbunude, P. O. and C. O. Ikediobi (1983). "Comparative aspects of purine metabolism in some African trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **9**(4): 279-287.
- Ong, H. B., N. Sienkiewicz, S. Wyllie, S. Patterson and A. H. Fairlamb (2013). "Trypanosoma brucei (UMP synthase null mutants) are avirulent in mice, but recover virulence upon prolonged culture in vitro while retaining pyrimidine auxotrophy." Mol Microbiol **90**(2): 443-455.
- Ooi, C. P. and P. Bastin (2013). "More than meets the eye: understanding Trypanosoma brucei morphology in the tsetse." Front Cell Infect Microbiol **3**: 71.
- Ooi, C. P., C. Benz and M. D. Urbaniak (2020). "Phosphoproteomic analysis of mammalian infective Trypanosoma brucei subjected to heat shock suggests atypical mechanisms for thermotolerance." J Proteomics **219**: 103735.
- Ostrander, D. B., D. J. O'Brien, J. A. Gorman and G. M. Carman (1998). "Effect of CTP synthetase regulation by CTP on phospholipid synthesis in Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem **273**(30): 18992-19001.
- Palmieri, F. (2013). "The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology." Mol Aspects Med **34**(2-3): 465-484.
- Paris, Z., M. Svobodova, A. Kachale, E. Horakova, A. Nenarokova and J. Lukes (2021). "A mitochondrial cytidine deaminase is responsible for C to U editing of tRNA(Trp) to decode the UGA codon in Trypanosoma brucei." RNA Biol: 1-9.
- Pays, E., B. Vanhollebeke, L. Vanhamme, F. Paturiaux-Hanocq, D. P. Nolan and D. Perez-Morga (2006). "The trypanolytic factor of human serum." Nat Rev Microbiol **4**(6): 477-486.
- Phillips, T. A., R. A. VanBogelen and F. C. Neidhardt (1984). "lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein." J Bacteriol **159**(1): 283-287.

- Presnyak, V. and J. Collier (2013). "The DHH1/RCKp54 family of helicases: an ancient family of proteins that promote translational silencing." Biochim Biophys Acta **1829**(8): 817-823.
- Preusser, C., N. Jae and A. Bindereif (2012). "mRNA splicing in trypanosomes." Int J Med Microbiol **302**(4-5): 221-224.
- Prohaska, K. M., R. P. Bennett, J. D. Salter and H. C. Smith (2014). "The multifaceted roles of RNA binding in APOBEC cytidine deaminase functions." Wiley Interdiscip Rev RNA **5**(4): 493-508.
- Queiroz, R. M. L., T. Smith, E. Villanueva, M. Marti-Solano, M. Monti, M. Pizzinga, D. M. Mirea, M. Ramakrishna, R. F. Harvey, V. Dezi, G. H. Thomas, A. E. Willis and K. S. Lilley (2019). "Comprehensive identification of RNA-protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (OOPS)." Nat Biotechnol **37**(2): 169-178.
- Randau, L., B. J. Stanley, A. Kohlway, S. Mechta, Y. Xiong and D. Soll (2009). "A cytidine deaminase edits C to U in transfer RNAs in Archaea." Science **324**(5927): 657-659.
- Read, L. K., J. Lukes and H. Hashimi (2016). "Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out." Wiley Interdiscip Rev RNA **7**(1): 33-51.
- Reynolds, D., L. Cliffe, K. U. Forstner, C. C. Hon, T. N. Siegel and R. Sabatini (2014). "Regulation of transcription termination by glucosylated hydroxymethyluracil, base J, in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*." Nucleic Acids Res **42**(15): 9717-9729.
- Robinson, M. D. and A. Oshlack (2010). "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data." Genome Biol **11**(3): R25.
- Rochette, L., A. Meloux, M. Zeller, G. Malka, Y. Cottin and C. Vergely (2020). "Mitochondrial SLC25 Carriers: Novel Targets for Cancer Therapy." Molecules **25**(10).
- Rojas, F. and K. R. Matthews (2019). "Quorum sensing in African trypanosomes." Curr Opin Microbiol **52**: 124-129.
- Roy, G. and M. Ouellette (2015). "Inactivation of the cytosolic and mitochondrial serine hydroxymethyl transferase genes in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **204**(2): 106-110.

- Ruan, H., S. Qiu, B. C. Beard and M. E. Black (2016). "Creation of zebularine-resistant human cytidine deaminase mutants to enhance the chemoprotection of hematopoietic stem cells." Protein Eng Des Sel **29**(12): 573-582.
- Rubio, M. A., K. W. Gaston, K. M. McKenney, I. M. Fleming, Z. Paris, P. A. Limbach and J. D. Alfonzo (2017). "Editing and methylation at a single site by functionally interdependent activities." Nature **542**(7642): 494-497.
- Rubio, M. A., I. Pastar, K. W. Gaston, F. L. Ragone, C. J. Janzen, G. A. Cross, F. N. Papavasiliou and J. D. Alfonzo (2007). "An adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U deamination of DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7821-7826.
- Salter, J. D., R. P. Bennett and H. C. Smith (2016). "The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function." Trends Biochem Sci **41**(7): 578-594.
- Sanchez-Quitian, Z. A., C. Z. Schneider, R. G. Ducati, W. F. de Azevedo, Jr., C. Bloch, Jr., L. A. Basso and D. S. Santos (2010). "Structural and functional analyses of Mycobacterium tuberculosis Rv3315c-encoded metal-dependent homotetrameric cytidine deaminase." J Struct Biol **169**(3): 413-423.
- Sanchez, M. A., S. Drutman, M. van Ampting, K. Matthews and S. M. Landfear (2004). "A novel purine nucleoside transporter whose expression is up-regulated in the short stumpy form of the Trypanosoma brucei life cycle." Mol Biochem Parasitol **136**(2): 265-272.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Methods **9**(7): 676-682.
- Schneider, A. (1994). "Import of RNA into mitochondria." Trends Cell Biol **4**(8): 282-286.
- Schneider, A., N. Bouzaidi-Tiali, A. L. Chanez and L. Bulliard (2007). "ATP production in isolated mitochondria of procyclic Trypanosoma brucei." Methods Mol Biol **372**: 379-387.
- Schneider, A. and T. Ochsenreiter (2018). "Failure is not an option - mitochondrial genome segregation in trypanosomes." J Cell Sci **131**(18).
- Sienkiewicz, N., S. Jaroslowski, S. Wyllie and A. H. Fairlamb (2008). "Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes." Mol Microbiol **69**(2): 520-533.

- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Mol Syst Biol **7**: 539.
- Silvester, E., K. R. McWilliam and K. R. Matthews (2017). "The Cytological Events and Molecular Control of Life Cycle Development of *Trypanosoma brucei* in the Mammalian Bloodstream." Pathogens **6**(3).
- Simpson, A. M., Y. Suyama, H. Dewes, D. A. Campbell and L. Simpson (1989). "Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also contain small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function." Nucleic Acids Res **17**(14): 5427-5445.
- Singh, A., I. Minia, D. Droll, A. Fadda, C. Clayton and E. Erben (2014). "Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks." Nucleic Acids Res **42**(7): 4652-4668.
- Smith, H. C. (2017). "RNA binding to APOBEC deaminases; Not simply a substrate for C to U editing." RNA Biol **14**(9): 1153-1165.
- Smith, T. K., F. Bringaud, D. P. Nolan and L. M. Figueiredo (2017). "Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle." F1000Res **6**.
- Somasekaram, A., A. Jarmuz, A. How, J. Scott and N. Navaratnam (1999). "Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal." J Biol Chem **274**(40): 28405-28412.
- Steeves, C. H. and S. L. Bearne (2011). "Activation and inhibition of CTP synthase from *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness." Bioorg Med Chem Lett **21**(18): 5188-5190.
- Stuart, K. D., A. Schnauffer, N. L. Ernst and A. K. Panigrahi (2005). "Complex management: RNA editing in trypanosomes." Trends Biochem Sci **30**(2): 97-105.
- Sunter, J. D. and K. Gull (2016). "The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology." Trends Parasitol **32**(4): 309-324.
- Szoor, B., E. Silvester and K. R. Matthews (2020). "A Leap Into the Unknown - Early Events in African Trypanosome Transmission." Trends Parasitol **36**(3): 266-278.
- Taketo, M. M. and M. Sonoshita (2002). "Phospholipase A2 and apoptosis." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 72-76.

- Teh, A. H., M. Kimura, M. Yamamoto, N. Tanaka, I. Yamaguchi and T. Kumasaka (2006). "The 1.48 Å resolution crystal structure of the homotetrameric cytidine deaminase from mouse." Biochemistry **45**(25): 7825-7833.
- Thompson, F. J., C. Britton, I. Wheatley, K. Maitland, G. Walker, S. Anant, N. O. Davidson and E. Devaney (2002). "Biochemical and molecular characterization of two cytidine deaminases in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Biochem J **365**(Pt 1): 99-107.
- Thymark, M., E. Johansson, S. Larsen and M. Willemoes (2008). "Mutational analysis of the nucleotide binding site of *Escherichia coli* dCTP deaminase." Arch Biochem Biophys **470**(1): 20-26.
- Tiwari, K. and V. K. Dubey (2018). "Fresh insights into the pyrimidine metabolism in the trypanosomatids." Parasit Vectors **11**(1): 87.
- Tonkin, L. A., L. Saccomanno, D. P. Morse, T. Brodigan, M. Krause and B. L. Bass (2002). "RNA editing by ADARs is important for normal behavior in *Caenorhabditis elegans*." EMBO J **21**(22): 6025-6035.
- Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigyrto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Ponten (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." Science **347**(6220): 1260419.
- Urdaneta, E. C., C. H. Vieira-Vieira, T. Hick, H. H. Wessels, D. Figini, R. Moschall, J. Medenbach, U. Ohler, S. Granneman, M. Selbach and B. M. Beckmann (2019). "Purification of cross-linked RNA-protein complexes by phenol-toluol extraction." Nat Commun **10**(1): 990.
- Valente, M., J. Timm, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez, T. Balzarini, J. E. Nettleship, L. E. Bird, H. Rada, K. S. Wilson and D. Gonzalez-Pacanowska (2016). "Cell cycle regulation and novel structural features of thymidine kinase, an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **102**(3): 365-385.
- Valente, M., A. E. Vidal and D. Gonzalez-Pacanowska (2019). "Targeting Kinetoplastid and Apicomplexan Thymidylate Biosynthesis as an Antiprotozoal Strategy." Curr Med Chem **26**(22): 4262-4279.

- van den Hoff, M. J., A. F. Moorman and W. H. Lamers (1992). "Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival." Nucleic Acids Res **20**(11): 2902.
- Vertessy, B. G. and J. Toth (2009). "Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases." Acc Chem Res **42**(1): 97-106.
- Vickers, T. J. and S. M. Beverley (2011). "Folate metabolic pathways in Leishmania." Essays Biochem **51**: 63-80.
- Vincenzetti, S., A. Cambi, J. Neuhard, E. Garattini and A. Vita (1996). "Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization." Protein Expr Purif **8**(2): 247-253.
- Vincenzetti, S., A. Cambi, J. Neuhard, K. Schnorr, M. Grelloni and A. Vita (1999). "Cloning, expression, and purification of cytidine deaminase from Arabidopsis thaliana." Protein Expr Purif **15**(1): 8-15.
- Vincenzetti, S., G. De Sanctis, S. Costanzi, G. Cristalli, P. Mariani, G. Mei, J. Neuhard, P. Natalini, V. Polzonetti and A. Vita (2003). "Functional properties of subunit interactions in human cytidine deaminase." Protein Eng **16**(12): 1055-1061.
- Vodnala, M., A. Fijolek, R. Rofougaran, M. Mosimann, P. Maser and A. Hofer (2008). "Adenosine kinase mediates high affinity adenosine salvage in Trypanosoma brucei." J Biol Chem **283**(9): 5380-5388.
- Wallen, R. M. and M. H. Perlin (2018). "An Overview of the Function and Maintenance of Sexual Reproduction in Dikaryotic Fungi." Front Microbiol **9**: 503.
- Wang, J., Q. Guo, L. Liu and X. Wang (2020). "Crystal structure of Arabidopsis thaliana cytidine deaminase." Biochem Biophys Res Commun **529**(3): 659-665.
- Wang, L. (2016). "Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **35**(10-12): 578-594.
- Weiner, K. X., J. Ciesla, A. B. Jaffe, R. Ketring, F. Maley and G. F. Maley (1995). "Chromosomal location and structural organization of the human deoxycytidylate deaminase gene." J Biol Chem **270**(32): 18727-18729.
- Wheeler, R. J., K. Gull and J. D. Sunter (2019). "Coordination of the Cell Cycle in Trypanosomes." Annu Rev Microbiol **73**: 133-154.
- Willis, W. T., D. Miranda-Grandjean, J. Hudgens, E. A. Willis, J. Finlayson, E. A. De Filippis, R. Zapata Bustos, P. R. Langlais, C. Mielke and L. J. Mandarino (2018). "Dominant and sensitive control of oxidative flux by the ATP-ADP carrier in human skeletal muscle mitochondria: Effect of lysine acetylation." Arch Biochem Biophys **647**: 93-103.

- Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt and G. A. Cross (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 89-101.
- Wu, L., X. Wu, B. Zhu and X. Cao (2009). "Identification and functional characterization of a novel cytidine deaminase in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*." Dev Comp Immunol **33**(5): 709-717.
- Xie, K., M. P. Sowden, G. S. Dance, A. T. Torelli, H. C. Smith and J. E. Wedekind (2004). "The structure of a yeast RNA-editing deaminase provides insight into the fold and function of activation-induced deaminase and APOBEC-1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8114-8119.
- Yague-Capilla, M., V. M. Castillo-Acosta, C. Bosch-Navarrete, L. M. Ruiz-Perez and D. Gonzalez-Pacanowska (2021). "A Mitochondrial Orthologue of the dNTP Triphosphohydrolase SAMHD1 Is Essential and Controls Pyrimidine Homeostasis in *Trypanosoma brucei*." ACS Infect Dis **7**(2): 318-332.
- Zauri, M., G. Berridge, M. L. Thezenas, K. M. Pugh, R. Goldin, B. M. Kessler and S. Kriaucionis (2015). "CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer." Nature **524**(7563): 114-118.
- Zhang, Y., F. Maley, G. F. Maley, G. Duncan, D. D. Dunigan and J. L. Van Etten (2007). "Chloroviruses encode a bifunctional dCMP-dCTP deaminase that produces two key intermediates in dTTP formation." J Virol **81**(14): 7662-7671.
- Zhao, Y., N. She, X. Zhang, C. Wang and Y. Mo (2017). "Product release mechanism and the complete enzyme catalysis cycle in yeast cytosine deaminase (yCD): A computational study." Biochim Biophys Acta Proteins Proteom **1865**(8): 1020-1029.