

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de proteína-fosfatasa de tipo 1 de
Leishmania infantum y estudio mediante RNA-Seq de las
alteraciones en la expresión génica diferencial inducidas en
líneas knock-in**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Angélica Degayón Cortés

DIRECTORES

Vicente Larraga Rodríguez de Vera
Ana María Alonso Ayala
Pedro José Alcolea Alcolea

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**Caracterización de proteína-fosfatasas de tipo 1
de *Leishmania infantum* y estudio mediante
RNA-Seq de las alteraciones en la expresión génica
diferencial inducidas en líneas *knock-in***

TESIS DOCTORAL

María Angélica Degayón Cortés



Directores:

Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Ana María Alonso Ayala

Pedro José Alcolea Alcolea

Madrid, 2017

**Memoria presentada por María Angélica Degayón Cortés para
optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad
Complutense de Madrid**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Madrid) bajo la dirección de los Doctores D. Vicente Larraga Rodríguez de Vera, D^a Ana María Alonso Ayala y D. Pedro José Alcolea Alcolea, contando con una beca predoctoral FPI.



D. Vicente Larraga Rodríguez de Vera, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), D^a Ana María Alonso Ayala, Doctora en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, y D. Pedro José Alcolea Alcolea, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Complutense de Madrid,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada "Caracterización de proteína-fosfatasa de tipo 1 de *Leishmania infantum* y estudio mediante RNA-Seq de las alteraciones en la expresión génica diferencial inducidas en líneas *knock-in*" presentada por D^a María Angélica Degayón Cortés, Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con lo expuesto, firman este certificado, autorizando su presentación y defensa, a dieciocho de abril de 2017.

A mi madre
A mi hermano

Agradecimientos

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vii
LISTADO DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xix
SUMMARY	xxv
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- LEISHMANIASIS	3
1.1.1.- Etiología	3
1.1.1.1.- Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	3
1.1.1.2.- Clasificación taxonómica y biología del vector.	5
1.1.1.3.- Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	7
1.1.2.- Epidemiología	8
1.1.2.1.- Leishmaniasis humana.	8
1.1.2.2.- Leishmaniasis canina.	10
1.1.3.- Manifestaciones clínicas	11
1.1.3.1.- Leishmaniasis humana.	11
1.1.3.2.- Leishmaniasis canina.	13
1.1.4.- Tratamiento	15
1.2.- PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LEISHMANIA	16
1.2.1.- Morfología y ultraestructura	16
1.2.2.- Cultivo <i>in vitro</i>	17
1.2.3.- Metabolismo	18
1.3.- ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	20
1.3.1.- Estructura genómica	20
1.3.2.- Regulación de la expresión génica en el nivel transcripcional	20
1.3.3.- Regulación de la expresión génica en el nivel post-transcripcional	22
1.3.3.1.- Procesamiento del ARNm.	22
1.3.3.2.- Traducción.....	24
1.3.3.3.- Modificaciones post-traduccionales.	25
1.4.- PROTEÍNA-FOSFATASAS	27
1.4.1.- Tirosina fosfatasa s.....	28

1.4.2.- Serina-treonina fosfatasa	28
1.4.3.- Proteína-fosfatasa de tipo 1 (PP1)	29
1.4.3.1.- Subunidad catalítica	29
1.4.3.2.- Subunidad reguladora	31
1.4.3.3.- Mecanismo de especificidad de PP1	31
1.4.3.4.- Funciones de las PP1	33
1.4.4.- PP1 en tripanosomátidos	36
2.- OBJETIVOS	39
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	45
3.1.1.- Estirpes bacterianas	45
3.1.2.- Parásitos	45
3.1.3.- Línea celular humana	45
3.1.4.- Insecto vector	45
3.1.5.- Animales de experimentación	46
3.2.- CULTIVOS CELULARES	46
3.2.1.- Cultivos bacterianos	46
3.2.1.1.- Medios de cultivo	46
3.2.1.2.- Transformación de bacterias competentes	46
3.2.2.- Obtención de promastigotes, amastigotes y líneas <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i>	47
3.2.2.1.- Procedimientos básicos de cultivo	47
3.2.2.2.- Aglutinación de promastigotes con aglutinina de cacahuete (PNA) y selección negativa	47
3.2.2.3.- Infección de <i>P. perniciosus</i> con <i>L. infantum</i> y aislamiento de promastigotes del tubo digestivo	48
3.2.2.4.- Obtención de amastigotes intracelulares de <i>L. infantum</i> por infección <i>in vitro</i> de células U937 estimuladas	48
3.2.2.5.- Generación de líneas de promastigotes <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i> mediante transfección	49
3.3.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	50
3.3.1.- Aislamiento de ADN plasmídico	50
3.3.2.- Extracción de ADN genómico de <i>L. infantum</i>	50
3.3.3.- Extracción de ARN total de <i>L. infantum</i>	50
3.3.4.- Amplificación de ARNm	51

3.3.5.- Síntesis de ADNc.	51
3.3.6.- Electroforesis en gel de agarosa.....	51
3.3.7.- Análisis de ARN mediante electroforesis capilar de alta resolución.....	51
3.3.8.- Análisis de ácidos nucleicos mediante espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.....	52
3.3.9.- Purificación de ADN por precipitación con etanol.....	52
3.3.10.- Clonaje en vectores de expresión.....	52
3.3.10.1.- Plásmidos.	52
3.3.10.2.- Oligonucleótidos.	53
3.3.10.3.- Preparación de insertos.	53
3.3.10.4.- Preparación de los vectores.....	54
3.3.10.5.- Ligación.	54
3.3.10.6.- Secuenciación de ADN.	54
3.4.- EXPRESIÓN EN SISTEMA HETERÓLOGO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	54
3.4.1.- Expresión y lisis de las proteínas recombinantes.	54
3.4.1.1.- Expresión de PP1-240, PP1C-34 y PP1-840 en la cepa M-15 de <i>E. coli</i>	54
3.4.1.2.- Coexpresión de PP1-840 y las chaperonas <i>groES/groEL</i> en la cepa M-15 y <i>SHuffle</i> de <i>E. coli</i>	55
3.4.1.3.- Expresión de PP1-840-MBP en la cepa BL21 (DE3), <i>Artic express</i> y <i>SHuffle</i> de <i>E. coli</i>	56
3.4.2.- Purificación de las proteínas recombinantes.	56
3.5.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.	57
3.5.1.- Obtención de extractos proteicos totales de promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. infantum</i>.	57
3.5.2.- Obtención de extractos proteicos totales de amastigotes obtenidos por infección de células U937 de <i>L. infantum</i>.....	57
3.5.3.- Cuantificación de proteínas.	58
3.5.4.- Estudio de los niveles de expresión de proteínas por <i>Western blot</i>.	58
3.5.5.- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	59
3.6.- ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE <i>L. INFANTUM</i> POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.	59
3.7.- ENSAYO DE ACTIVIDAD.	60
3.8.- PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.	60
3.9.- ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS.	60

3.9.1.- Estudio de los niveles de expresión de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34 mediante qRT-PCR a lo largo del ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	60
3.9.2.- Estudio de las líneas <i>knock-in</i> mediante RNA-Seq.....	61
3.9.2.1.- <i>Clustering</i> jerárquico.....	62
3.9.2.2.- Asignación de términos de <i>Gene Ontology</i> y análisis de enriquecimiento....	62
3.9.3.-Estudio de la secuencia primaria de la proteína PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34 ..	62
4.- RESULTADOS	63
4.1.- Análisis de la estructura primaria de la proteína PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34.....	65
4.2.- Comprobación de la actividad serina-treonina fosfatasa de la proteína PP1-840. ..	70
4.2.1.- Obtención de la PP1-840 en condiciones nativas.	70
4.2.2.- Purificación y evaluación de la actividad serina-treonina fosfatasa de la proteína PP1-840-MBP.....	73
4.3.- Análisis de la expresión de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34.	74
4.3.1.- Niveles de ARNm determinados por qRT-PCR.	74
4.3.2.- Estimación de los niveles de proteína por <i>Western blot</i>	79
4.3.2.1.- Obtención de los anticuerpos policlonales anti-PP1-240 y anti-PP1C-34.....	79
4.3.2.2.- Detección de la abundancia de proteína en promastigotes en cultivo axénico.	81
4.3.2.3.- Detección de la abundancia de proteína en el estadio amastigote.....	82
4.4.- Estudio de la localización subcelular de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34.	83
4.4.1.- Localización subcelular en promastigotes de cultivo axénico.	83
4.4.2.- Localización subcelular en amastigotes intracelulares.	86
4.5.- Caracterización de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1C-34 en promastigotes axénicos de <i>L. infantum</i> mediante líneas <i>knock-in</i>	88
4.5.1.- Análisis de la cinética de crecimiento.....	89
4.5.2.- Estudio de los niveles de expresión mediante <i>Western blot</i>	90
4.5.3.- Estudio <i>in vitro</i> de la capacidad infectiva.....	93
4.5.4.- Análisis funcional mediante RNA-Seq.....	94
4.5.4.1.- Análisis de expresión génica diferencial en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	99
4.5.4.2.- Análisis de la expresión génica diferencial en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR.....	113
4.5.4.3.- Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR-PP1-240T diferencialmente expresados a día 1.	124

4.5.4.4.- Análisis de expresión génica diferencial en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR.....	128
4.5.4.5.- Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de promastigotes transfectados con pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34.....	149
5.- DISCUSIÓN	153
5.1.- Conservación de la secuencia de las proteínas PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34.....	155
5.2.- Niveles de expresión génica de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34.....	158
5.3.- Localización subcelular de la proteína PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34.	159
5.4.- Caracterización de la proteína PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34 mediante líneas <i>knock-in</i> de sobre-expresión.	160
5.4.1.- Análisis de los niveles de expresión de PP1-240 y PP1-240T en las respectivas líneas pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T y estudio de la capacidad infectiva.....	160
5.4.2.- Análisis funcional mediante RNA-Seq de la proteína PP1-240 a partir de las líneas <i>knock-in</i> pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T.	162
5.4.3.- Análisis de los niveles de expresión del <i>cluster</i> PP1-34 en la línea pIR-PP1C-34 y estudio de la capacidad infectiva.....	169
5.4.2.- Análisis funcional mediante RNA-Seq del <i>cluster</i> PP1-34 a partir de la línea <i>knock-in</i> pIR-PP1C-34.	169
6.- CONCLUSIONES	175
7.- BIBLIOGRAFÍA	179
8.- ANEXOS	170

ABREVIATURAS

1-C-Grx	Glutarredoxina monotiol
A2	Proteína A2
ADNc	ADN copia
ADNk	ADN del kinetoplasto
AGD	Ácido graso desaturasa
AO	Ácido okadaico
ARD1	N-acetiltransferasa ARD1
AREs	Elementos ricos en AU
ARL-3A	Factor 3 de ADP ribosilación
ARN pol	ARN polimerasa
ARN pol II	Proteína de tipo ARN polimerasa II dirigida por ADN
ARNa	ARN amplificado
ARNbp	Proteína de unión a ARN
ARNpol II su.9	Subunidad 9 de la RNA polimerasa II dirigida por ADN
ARNsn	ARN pequeño nucleolar
ARNt ^{met/tyr}	Proteína tipo tirosil/metionil ARNt sintetasa
ATP	Adenosín trifosfato
ATPbp	Proteína tipo de unión a ATP
CA	Caliculina A
CBC	Complejo de unión a la caperuza
CC2D	Proteína putativa con dominio C2
Cdk	Quinasas dependientes de ciclinas
Cluster PP1-34	PP1 codificadas por los genes LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840, LinJ.34.0850
COX6	Subunidad VI de la citocromo C oxidasa
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CTD	Dominio C-terminal
CYP4	Ciclofilina 4
CYP8	Ciclofilina 8
DAG	Gráficos acíclicos dirigidos
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DAT	Aglutinación directa
DGK	Diacil-glicerol quinasas
DHC	Cadena pesada de dineína
DHFR-TS	Dihidrofolatoreductasa-timidina sintasa
DiFMUP	6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato
DiMU	6,8-difluoro-4-metilumbeliferilo
DIP13	Proteína asociada al mecanismo de deflagelación
DLC	Dineína, cadena ligera
DLC2	Dineína, cadena ligera 2
DMC1	Recombinasa DMC1
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dol-P	Dolicol-fosfato
Dol-PP	Dolicol-pirofosfato

Dol-PP-Pasa	Dolicil-pirofosfato fosfatasa
DSP	Fofatasas de especificidad dual
DTC	Proteína transportadora de tricarboxilatos
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
Endo G	Endonucleasa G
F	<i>Fold change</i>
FAE	Sistema de elongación de ácidos grasos
FASII	Sistema sintasa tipo II
FAZP	Proteína de la zona de anclaje flagelar
Fe RED	Reductasa férrica
FCP/SCP	<i>TFIIF-associating component of RNA polymerase II C-terminal domain CTD phosphatase/ small CTD phosphatase</i>
Fe/Zn T	Proteína de tipo transportador de hierro/zinc
FKBP	FKBP peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa
FMN	Flavina mononucleótido
fosfatasas PRL	<i>Phosphatases of Regenerating Liver</i>
GADD34	<i>Growth Arrest and DNA-damage protein 34</i>
GAPDHg	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa glicosomal
GDE	Genes diferencialmente expresados
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GrpE	Co-chaperona, proteína GrpE de choque térmico
GS	Glucógeno sintasa
GTP	Guanosina trifosfato
H3	Histona H3
HAD	Enzimas haloácido deshalogenasas
HCF1	Factor celular de hospedador C1
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
hnRNP K	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea K
HORP	2 hidorxi 3-oxopropionato reductasa
HSF	<i>Heat shock transcription factors</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HTD2	3 hidroxil-acil-ACP deshidratasa
IFI	Inmunofluorencencia indirecta
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
iv	Intravenosa
K39	Kinesina K39
KAS	Proteína de la familia β-cetoacil sintasa
L3	Proteína ribosómica L3
L14	Proteína ribosómica L14
L17	Proteína ribosómica L17
L18a	Proteína ribosómica L18a
L19	Proteína ribosómica L19
L24	Proteína ribosómica L24
L38	Proteína ribosómica L38
L39	Proteína ribosómica L39
L44	Proteína ribosómica L44

La ARNbp	Proteína de unión a ARN La
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea diseminada
LCR	Leishmaniasis cutánea recidivante
LDPK	Leishmaniasis dérmica post- <i>Kala-azar</i>
LFR-1	Reductasa férrica
LIT1	Transportador de hierro/zinc
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LMPTP	Fosfatasas de bajo peso molecular
LPG	Lipofosfoglicano
LPG1R	Proteína de tipo β -galactofuranosiltransferasa
LRRP	Proteína con repeticiones ricas en leucina
LV	Leishmaniasis visceral
Mad2	Componente regulador del huso mitótico
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MDS	<i>Multidimensional scaling plot of distances</i>
MEF2	Factor potenciador específico de miocito 2A
MgN	Proteína tipo <i>mago nashi</i>
MIF1	Proteína de tipo factor inhibitorio de migración de macrófagos
mit ARNbc1	Subunidad 1 del complejo multiproteico mitocondrial de unión a ARNg
mPCP	Precursor mitocondrial de proteína transportadora de fosfato
MPM67	O-sialoglicoproteína endopeptidasa
MPT	Modificaciones post-traduccionales
MVT	Túbulo multivesicular
NAP	Proteína de ensamblaje de nucleosomas
NNN	Medio <i>Novy-Nicole-McNeal</i>
NTbp	Proteína de tipo unión a nucleótidos
P2	Proteína ribosomal ácida 60S P2
P2A-Ex	Proteína 2 asociada a exosomas
PAR45	Peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa
PARPS	Prociclinas ácidas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDP	Piruvato deshidrogenasa
PFD6	Subunidad 6 del complejo <i>prefoldin</i>
PIP	Proteínas de interacción con PP1
PITK	<i>Phosphatase Interactor Targeting K</i>
PK	Proteína quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PMA	4 β -forbol 12-miristato 13-acetato
PNA	Aglutinina de cacahuete (<i>Arachys hypogaea</i>)
PNA ⁻	Subpoblación de promastigotes no aglutinantes con PNA
PNA ⁺	Subpoblación de promastigotes aglutinantes con PNA
PP1	Proteína-fosfatasa de tipo 1
PP1-240	PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240
PP1-240T	PP1-240 sin la secuencia codificante del extremo N-terminal

PP1-840	PP1 codificada por el gen LinJ.34.0840
PP1C-34	Secuencia de aminoácidos correspondiente a la región catalítica común del <i>cluster</i> PP1-34
PPG	Proteofosfoglicano
PPM	Fosfatasa de proteínas dependientes de metales
PPMT	Carboximetiltransferasa específica de proteína prenilada
PPP	Fosfatasa de fosfoproteínas
PPSCMT	Carboximetil transferasa que dirige la metilación de proteínas preniladas
PRMT	Arginina N-metil transferasa
Pro-Pper	Promastigotes diferenciados en el tubo digestivo de <i>P. perniciosus</i>
PRT	Fosforribosil transferasas
PTP	Tirosinas fosfatasa
PTR1	Pteridina reductasa-1
PUF	Pumilio y Factor de Unión 3-ferm
Qa <i>SNARE</i>	Proteína <i>SNARE</i> (Qa)
RBP	Proteínas de unión a ARN
RE	Retículo endoplásmico
RFK	Riboflavina quinasa
RING	Proteína de tipo RING-box
ARNg	ARN guía
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP19S	Subunidad 9 del proteosoma
RPKM	<i>Reads Per Kb of transcript per Million mapped reads</i>
RPL32	Proteína ribosómica L32
RPS6 ₂	Proteína ribosómica S6
RRM	Proteínas con motivos de reconocimiento de ARN
RRP41B	Proteína 41B de procesamiento de ARNr
S6	Proteína ribosómica S6
S7	Proteína ribosómica S7
S11	Proteína ribosómica S11
S14	Proteína ribosómica S14
S18	Proteína ribosómica S18
S25	Proteína ribosómica S25
S27	Proteína ribosómica S27-1
S29	Proteína ribosómica S29
S30	Proteína ribosómica S30
SARP	<i>Several Ankyrin Repeat Protein</i>
SePS	Selenofosfato sintetasa
SHERP	Proteína pequeña hidrofílica asociada al RE
SL	<i>Spliced leader</i>
SmD2	Ribonucleoproteína pequeña nuclear SmD2
snoRNP FA	Proteína nucleolar de la familia A
SSNA1	Autoantígeno nuclear 1 del síndrome de <i>sjogren</i>
SSR	<i>Strand switch regions</i>
STP	Serina-treonina fosfatasa
TBCA	Proteína de tipo cofactor A de unión a tubulina

Tuzin	Tuzina
Ubc	Proteína de tipo ubiquitina
VSG	Glicoproteína variable de superficie
YPEL	Proteína tipo <i>Yippee</i>
Znfp	Proteína 2 con dedos de Zinc
β -INV	β -fructofuranosidasa o β -invertasa

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las especies del género <i>Leishmania</i> patógenas en el hombre	4
Figura 2. Características morfológicas del insecto vector flebotomo	6
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	8
Figura 4. Distribución mundial del riesgo epidemiológico de la leishmaniasis	9
Figura 5. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana	13
Figura 6. Algunas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina.....	14
Figura 7. Morfología y ultraestructura del promastigote y el amastigote de <i>Leishmania</i>	16
Figura 8. Mecanismo de <i>trans-splicing</i> descrito en tripanosomátidos	21
Figura 9. Destino del ARNm en tripanosomátidos	23
Figura 10. Número de fosfatasa presentes en diferentes organismos (fosfatoma).....	27
Figura 11. Clasificación de las tirosina-fosfatasa en organismos eucariotas.....	28
Figura 12. Clasificación de las serina-treonina fosfatasa en organismos eucariotas	29
Figura 13. Estructura tridimensional de la subunidad catalítica PP1 del hombre	31
Figura 14. Representación esquemática del sistema de interacción de las PIP con las PP1	32
Figura 15. Cladograma basado en la identidad de secuencia de las PP1 presentes en el genoma de <i>L. infantum</i>	38
Figura 16. Alineamiento comparativo de la estructura primaria de la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 y de las PP1 representadas por el <i>cluster</i> PP1-34	65
Figura 17. Alineamiento comparativo de las cadenas polipeptídicas de las PP1 codificadas por el cromosoma 34.....	66
Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína PP1-240 y la secuencia consenso del <i>cluster</i> PP1-34 de <i>L. infantum</i> respecto a las PP1 de diferentes organismos	69
Figura 19. Análisis de solubilidad de la proteína PP1-840 en los sistemas de expresión de <i>E. coli</i> empleados.....	72
Figura 20. Purificación de la proteína recombinante PP1-840-MBP en condiciones nativas.....	73
Figura 21. Análisis de la actividad enzimática de la proteína PP1-840-MBP	74
Figura 22. Selección negativa de promastigotes de cultivo axénico en fase estacionaria con aglutinina de cacahuete (PNA).....	75
Figura 23. Detección de amastigotes intracelulares mediante microscopía óptica en cultivos de la línea celular U937 infectada <i>in vitro</i>	76
Figura 24. Análisis de la calidad del ARNm amplificado (ARNa)	76
Figura 25. Niveles de expresión relativos de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34 en la curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. infantum</i>	77
Figura 26. Niveles de expresión relativos de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34 en PNA ⁻ , Pro-Pper y amastigotes intracelulares respecto a promastigotes de cultivo axénico en fase logarítmica y estacionaria determinado por qRT-PCR.....	78
Figura 27. Niveles de expresión relativos de PP1-240 y del <i>cluster</i> PP1-34 en Pro-Pper respecto a PNA ⁻ determinado por qRT-PCR	79
Figura 28. Purificación en condiciones desnaturizantes de las proteínas recombinantes PP1-240-R y PP1C-34-R.....	80
Figura 29. Estudio de los niveles de expresión de la proteína PP1-240 en la curva de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico de <i>L. infantum</i>	81

Figura 30. Estudio de los niveles de expresión del <i>cluster</i> PP1-34 en la curva de crecimiento de promastigotes de cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. infantum</i>	82
Figura 31. Estudio de los niveles de expresión de la proteína PP1-240 en amastigotes de <i>L. infantum</i>	83
Figura 32. Localización subcelular de PP1-240 en promastigotes de <i>L. infantum</i>	84
Figura 33. Localización subcelular del <i>cluster</i> PP1-34 en promastigotes de <i>L. infantum</i>	85
Figura 34. Localización subcelular de PP1-240 en amastigotes intracelulares de <i>L. infantum</i> ...	87
Figura 35. Confirmación mediante PCR de las líneas <i>knock-in</i> generadas a partir de los vectores integrativos pIR y pIR-GFP en promastigotes en cultivo axénico.....	88
Figura 36. Análisis de los cultivos de las líneas <i>knock-in</i> generadas a partir del vector integrativo pIR	89
Figura 37. Análisis de la cinética de crecimiento de las líneas <i>knock-in</i> derivadas del vector integrativo pIR y pIR-GFP	90
Figura 38. Niveles de expresión de PP1-240 y PP1-240T	91
Figura 39. Niveles de expresión de PP1-240-GFP, PP1-240T-GFP y PP1C-34-GFP	92
Figura 40. Infección <i>in vitro</i> de la línea celular U937 con las líneas <i>knock-in</i> pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34	93
Figura 41. Estudio de la capacidad infectiva de promastigotes estacionarios procedentes de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a la línea control pIR	94
Figura 42. Análisis de la calidad del ARN total de los promastigotes transfectados con pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34.....	95
Figura 43. Alineamiento comparativo de las lecturas obtenidas a partir de las librerías de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a la línea control pIR	95
Figura 44. Diagramas de cajas de las lecturas crudas (<i>raw</i>) y las lecturas normalizadas (RPKM) de los transfectantes pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34.....	96
Figura 45. Estudio de la dispersión de las lecturas normalizadas de los transfectantes pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34	97
Figura 46. <i>Clustering</i> de los perfiles de expresión génica (RPKM) de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a pIR	98
Figura 47. Proporción de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR	100
Figura 48. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR según la terminología GO	102
Figura 49. Análisis de enriquecimiento en términos de GO de los genes diferencialmente sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR.....	104
Figura 50. Esquema del perfil de expresión génica diferencial del transfectante pIR-PP1-240	112
Figura 51. Proporción de genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR.....	114
Figura 52. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240T vs. pIR según la terminología GO	115
Figura 53. Análisis de enriquecimiento en términos de GO de los genes sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240T vs. pIR.....	117
Figura 54. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial del transfectantes pIR-PP1-240T.....	124
Figura 55. <i>Clustering</i> jerárquico de los GDE a día 1 en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T vs. pIR....	126

Figura 56. Diagramas de Venn de los perfiles de expresión génica diferencial a día 1 de los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T	127
Figura 57. Esquema de los genes comunes sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T	128
Figura 58. Proporción de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR	129
Figura 59. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR según la terminología GO	132
Figura 60. Análisis de enriquecimiento en términos de GO relativos a la categoría de procesos biológicos en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 y día 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR	134
Figura 61. Análisis de enriquecimiento en términos de GO de los genes diferencialmente sub-expresados en los días 1 y 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR	135
Figura 62. Diagramas de Venn de los perfiles de expresión génica diferencial a día 1 y día 3 del transfectante pIR-PP1C-34 vs pIR.....	144
Figura 63. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial del transfectante pIR-PP1C-34.....	148
Figura 64. <i>Clustering</i> jerárquico de los GDE a día 1 en pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 vs. pIR	151
Figura 65. Diagramas de Venn de los perfiles de expresión génica diferencial a día 1 de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34	152
Figura 66. Esquema de las variaciones de las tasas de recambio de ARN y proteína a lo largo del ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	161
Figura 67. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial de los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T.....	168

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica del insecto vector flebotomo.....	5
Tabla 3. Clasificación de las especies de <i>Leishmania</i> según la manifestación clínica principal que causan en el hombre.....	11
Tabla 4. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las PP1 de diferentes organismos.....	30
Tabla 5. Motivos de unión a PP1 presentes en las PIP. Se describe una PIP y su función para cada motivo detallado.....	33
Tabla 6. Listado de PP1 codificadas por diferentes especies de <i>Leishmania</i> según las anotaciones recogidas en la base de datos <i>TriTrypDB</i>	37
Tabla 7. Cepas de <i>E. coli</i>	45
Tabla 8. Vectores utilizados en este trabajo.....	52
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	53
Tabla 10. Tampones de unión y elución empleados para la purificación de las PP1 en estudio.....	57
Tabla 11. Sondas <i>TaqMan</i> y oligonucleótidos empleados para los estudios por qRT-PCR.....	61
Tabla 12. Análisis del grado de conservación de las proteínas codificadas por los genes ortólogos de LinJ.15.0240 en el género <i>Leishmania</i> y <i>Trypanosoma</i>	67
Tabla 13. Análisis del grado de conservación de las proteínas codificadas por los genes ortólogos del <i>cluster</i> PP1-34 en el género <i>Leishmania</i> y <i>Trypanosoma</i>	68
Tabla 14. Descripción de los sistemas de expresión probados para la obtención de la proteína PP1-840 en condiciones nativas.....	71
Tabla 15. Frecuencias absolutas de genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	100
Tabla 16. Frecuencias de genes diferencialmente expresados con términos de GO anotados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	101
Tabla 17. Genes sobre-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	105
Tabla 18. Genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	105
Tabla 19. Genes sobre-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	107
Tabla 20. Genes sub-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	107
Tabla 21. Genes sobre-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	107
Tabla 22. Genes sub-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.....	108
Tabla 23. Tasa de variación (<i>Fold change</i>) del gen LinJ.15.0240 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.....	108
Tabla 24. Frecuencias absolutas de genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR.....	113
Tabla 25. Frecuencias de genes diferencialmente expresados con términos de GO anotados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR.....	114

Tabla 26. Genes sobre-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR	118
Tabla 27. Genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR	118
Tabla 28. Genes sobre-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR	120
Tabla 29. Genes sobre-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR	120
Tabla 30. Genes sub-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR	120
Tabla 31. Tasa de variación (<i>Fold change</i>) del gen LinJ.15.0240 en su versión truncada (T) en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento	121
Tabla 32. Frecuencias absolutas de los genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	129
Tabla 33. Frecuencias de genes diferencialmente expresados con términos de GO anotados en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	130
Tabla 34. Genes sobre-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	136
Tabla 35. Genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	136
Tabla 36. Genes sobre-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	139
Tabla 37. Genes sub-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	140
Tabla 38. Genes sobre-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	142
Tabla 39. Genes sub-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR	143
Tabla 40. Tasa de variación (<i>Fold change</i>) del <i>cluster</i> PP1C-34 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.....	143

RESUMEN

Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) es el agente causal de la leishmaniosis visceral en la cuenca mediterránea, donde el perro es el reservorio principal. La infección se transmite al hospedador mamífero por la picadura de dípteros de la subfamilia Phlebotominae. El ciclo biológico del parásito es digenético, y en él se alterna un estadio extracelular móvil o promastigote, que se desarrolla en el hospedador invertebrado a su forma intracelular o amastigote, que se multiplica en el interior de fagocitos del hospedador mamífero. La secuenciación de los genomas de las principales especies de *Leishmania*, publicada entre 2005 y 2007, y el desarrollo de técnicas de alto rendimiento como los *microarrays* de ADN, la proteómica cuantitativa y más recientemente, las metodologías basadas en la secuenciación masiva, han permitido llevar a cabo un análisis exhaustivo de los perfiles de expresión génica del parásito a lo largo de su ciclo biológico, con el fin de hallar posibles factores de virulencia implicados en su patogenicidad y/o posibles dianas terapéuticas y candidatos vacunales. En un estudio de transcriptómica comparativa llevado a cabo en el laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) se describió que los genes LinJ.34.0840 y LinJ.15.0240, que codifican proteína-fosfatasa 1 (PP1), están diferencialmente expresados en promastigotes de *L. infantum* extraídos directamente del tubo digestivo del vector *Phlebotomus perniciosus*. Aún habiéndose puesto de manifiesto en diversos estudios la importancia del estado de fosforilación proteico, durante los procesos de diferenciación del parásito, la funcionalidad concreta de las PP1 en *Leishmania* spp. es desconocida, al igual que las vías de señalización intracelular. Por este motivo, se decidió llevar a cabo la caracterización de estas proteínas en el desarrollo de esta tesis doctoral, realizada en dicho laboratorio.

Aproximadamente un tercio de las proteínas de los organismos eucariotas se regulan por fosforilación. Las proteína-fosfatasa son las enzimas responsables de eliminar los ésteres de fosfato de estas proteínas. De acuerdo a su especificidad de sustrato las proteína-fosfatasa se pueden clasificar en dos sub-grupos: tirosina-fosfatasa (PTP) y serina/treonina-fosfatasa (STP). Las PP1 son STP y constituyen la familia más importante de proteína-fosfatasa en términos de diversidad de sustrato. Cada holoenzima de PP1 está compuesta por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. La subunidad catalítica de las PP1 representa una de las proteínas más conservadas en los organismos eucariotas, con una identidad de secuencia aproximada del 70% y un tamaño molecular comprendido entre 35 y 38 kDa. Las PP1 actúan de una manera muy específica y estrictamente regulada, dada su capacidad para formar complejos con un gran número de subunidades que controlan su localización, actividad y especificidad de sustrato. En los organismos vertebrados se han identificado cerca de 200 subunidades reguladoras o proteínas de interacción con PP1 (PIP). Estos complejos dan lugar a un conjunto diverso de holoenzimas con actividad dirigida a distintos sustratos y mecanismos de regulación propios. Esto explica la diversidad de funciones en las que participan las PP1: transcripción génica, ciclo celular, traducción, metabolismo, organización del citoesqueleto, regulación de transportadores, etc.

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es la caracterización de la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 (PP1-240) y del *cluster* de PP1 localizado en el cromosoma 34 (LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840, LinJ.34.0850) de *L. infantum* (*cluster* PP1C-34). Dicha caracterización incluye el estudio de la estructura primaria, el análisis de la expresión génica en los diferentes estadios del ciclo biológico del parásito, el estudio de la localización subcelular y el estudio de las alteraciones en la expresión génica diferencial en líneas de promastigotes axénicos *knock-in*, es decir, transfectantes estables que sobre-expresan de forma constitutiva PP1-240 o el *cluster* PP1-34.

Los alineamientos múltiples llevados a cabo han revelado una similitud de secuencia del 45% para la proteína PP1-240 y del 60% para la secuencia consenso del *cluster* PP1-34 con respecto a nueve PP1 codificadas por diversos organismos representativos de los principales taxones de la escala evolutiva. El nivel de identidad observado es similar al descrito previamente en las PP1 de *Trypanosoma* (~55%), encontrándose las PP1 de los tripanosomátidos entre las PP1 más divergentes de los organismos eucariotas analizados.

Las cuatro PP1 definidas como *cluster* PP1-34, se caracterizan por la presencia de un núcleo catalítico común altamente conservado (>95%) y un extremo N-terminal variable. Dicha evidencia ha sido observada también entre las PP1 de mamíferos, siendo descritas cuatro isoformas denominadas PP1 α , PP1 β , PP1Y1 y PP1Y2. Por ello, las cuatro PP1 integradas en el *cluster* PP1-34 de *L. infantum* podrían corresponder a diferentes isoformas derivadas de la misma proteína, al igual que ocurre en mamíferos.

La proteína PP1-240 y el *cluster* PP1-34 mantienen invariables todos los aminoácidos implicados en la interacción con sustratos e iones metálicos. Estos datos confirman que estas secuencias de PP1 de *L. infantum* están conservadas evolutivamente.

En este estudio, se ha confirmado *in vitro* la actividad STP de la proteína de fusión PP1-840-MBP obtenida en condiciones nativas a partir del sistema de expresión heteróloga compuesto por el vector pETM-41 y la cepa *SHuffle* de *E. coli*. Se empleó este sistema que permite fusionar la secuencia de interés a MBP debido a que las PP1 de *L. infantum* son insolubles, al igual que ocurre con ortólogos como las PP1 humanas.

Los estudios por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) y *Western blot* han permitido determinar los niveles de expresión génica relativa de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum*. Según el análisis de los niveles de ARNm mediante qRT-PCR, se ha detectado una tasa de expresión constante de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 a lo largo de la curva de crecimiento en promastigotes en cultivo axénico. La abundancia relativa de la proteína PP1-240 es análoga en este estadio, según se ha observado mediante *Western blot*, lo que indica que la expresión de PP1-240 es constitutiva en promastigotes en cultivo axénico. En el caso del *cluster* PP1-34 se ha detectado un ligero aumento de la abundancia de proteína en promastigotes axénicos en fase estacionaria según los estudios de *Western blot*, por lo que podría existir un mecanismo de regulación génica a nivel post-transcripcional que controle la expresión de estas proteínas.

También se han realizado estudios para evaluar por qRT-PCR los niveles de transcrito de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en poblaciones de promastigotes metacíclicos (tanto derivados del tubo digestivo del vector *Phlebotomus perniciosus*, o Pro-Pper, como

derivados de cultivo axénico no aglutinantes con lectina de cacahuete, o PNA⁺) y amastigotes con respecto a promastigotes en cultivo axénico en fase logarítmica y estacionaria. Las tasas de variación de la expresión génica o *fold change* fueron inferiores a 2 en todos los casos en las que se detectaron, si bien dichas diferencias eran estadísticamente significativas. Las más relevantes consisten en la sobre-expresión de los genes LinJ.15.0240, LinJ.34.0820 y LinJ.34.0850 en Pro-Pper vs. PNA⁻. Estos datos ponen de manifiesto la influencia de las condiciones de cultivo en los perfiles de expresión génica de *L. infantum*. La proteína PP1-240 es más abundante en amastigotes intracelulares obtenidos a partir de infecciones *in vitro* de células U937 con respecto a amastigotes axénicos, según han puesto de manifiesto los ensayos de *Western blot*. Estos ensayos no son viables en el caso de Pro-Pper actualmente, debido a la reducida cantidad de material biológico del parásito que es posible obtener a partir del tubo digestivo del vector.

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) han confirmado el perfil de expresión observado mediante *Western blot* para la proteína PP1-240 y el *cluster* PP1-34 en el ciclo biológico de *L. infantum*. Así, la proteína PP1-240 ha sido detectada por ambos métodos tanto en promastigotes como en amastigotes, mientras que el *cluster* PP1-34 sólo se detectó en promastigote. La proteína PP1-240 se distribuye en toda la extensión del apéndice flagelar y el bolsillo flagelar, mientras que las PP1 codificadas por el *cluster* PP1-34 se disponen principalmente en el bolsillo flagelar. Este área tiene un papel fundamental en la morfogénesis de los tripanosomátidos y está implicada en la endocitosis y la exocitosis. Asimismo, la correcta formación del bolsillo flagelar es crucial para la viabilidad y la infectividad del parásito. Por tanto, la localización subcelular observada de la proteína PP1-240 y de las proteínas del *cluster* PP1-34 podrían presentar un papel clave en la infectividad y los procesos de diferenciación celular que tienen lugar durante el ciclo biológico de *Leishmania*.

Con el fin de obtener información acerca de la funcionalidad biológica de las PP1 de *L. infantum*, se generaron líneas de promastigotes *knock-in* utilizando el vector plasmídico integrativo pIR, cuya expresión génica global fue analizada mediante RNA-Seq en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. En el caso de PP1-240, se generaron dos líneas *knock-in*: pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, para la sobre-expresión constitutiva de PP1-240 en su versión completa y sin el extremo N-terminal (PP1-240T), respectivamente. En el caso del *cluster* PP1-34, se generó la línea celular *knock-in* pIR-PP1C-34 que sobre-expresa la región catalítica común codificada por el *cluster* mencionado.

El análisis por RNA-Seq de las líneas pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T ha puesto de manifiesto la expresión diferencial de 103 y 92 genes, respectivamente. En ambas líneas, más del 80% de los cambios relativos de expresión se detectaron en el primer día 1 de la curva de crecimiento. Estos resultados se correlacionan con los elevados niveles de ARNm y proteína descritos anteriormente en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T a día 1. Cabe destacar que, a pesar de que el análisis por RNA-Seq reveló la sobre-expresión de PP1-240 y PP1-240T en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento, la tasa de variación fue superior en el primer día que en el resto de los tiempos analizados en ambas líneas, concretamente 4 y 2,5 veces superior en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, respectivamente.

Además, los cambios globales consisten concretamente en la sub-expresión de los genes en más del 85% de los casos.

De acuerdo a la terminología de *Gene Ontology* (GO) anotada y el análisis de enriquecimiento funcional, los genes diferencialmente expresados tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T se relacionan fundamentalmente con los procesos biológicos de expresión génica, traducción, transporte de moléculas y actividades metabólicas. Sin embargo, algunos procesos metabólicos observados en pIR-PP1-240, como los procesos relativos a pteridina, no se detectaron en pIR-PP1-240T, mientras que otros como los procesos relacionados con la riboflavina o el transporte de iones metálicos son propios del transfectante pIR-PP1-240T.

El análisis de agrupamiento o *clustering* comparativo realizado en base a la distancia euclídea aplicando el método jerárquico de *War* con el programa informático *edgeR* v.3.12.1 sobre los datos de RNA-Seq, revela perfiles de expresión similares a día 1 entre los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Concretamente, el estudio de los conjuntos de genes sub-expresados a día 1 refleja un total de 48 genes comunes, tanto de función conocida como codificantes de proteínas hipotéticas. De hecho, esta intersección entre ambos conjuntos representa más de la mitad del número total de genes diferencialmente expresados en ambas líneas. Por tanto, los perfiles de expresión detectados en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T indican que la proteína PP1-240 mantiene cierta actividad a pesar de la delección del extremo N-terminal. Asimismo, los resultados sugieren que el extremo N-terminal de la proteína PP1-240 podría tener una función relevante en la interacción con ciertas proteínas reguladoras mientras que en otras dicha interacción podría llevarse a cabo a través de la superficie de la subunidad catalítica PP1-240, como se ha descrito en la mayoría de las PP1.

El estudio por RNA-Seq de la línea celular pIR-PP1C-34 puso de manifiesto la expresión diferencial de 279 genes en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Aproximadamente el 95% de los genes diferencialmente expresados se distribuyen uniformemente entre los días 1 y 3 de la curva. Sin embargo, estos resultados no se correlacionan con la tasa de variación descrita para PP1C-34, donde se detectó una disminución gradual de los niveles de sobre-expresión a lo largo de la curva de crecimiento. El estudio detallado de los genes diferencialmente expresados en pIR-PP1C-34 ha revelado la sub-expresión de numerosos genes previamente detectados en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T.

Según los estudios de ontología génica incluyendo los análisis de enriquecimiento funcional, los genes sub-expresados a día 1 y 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 presentan funciones biológicas relacionadas con la regulación de la expresión génica, traducción, procesos biosintéticos de macromoléculas y plegamiento de proteínas. Dichos procesos se vinculan esencialmente con los componentes celulares del núcleo, ribosomas y mitocondria. Estos resultados muestran un perfil de expresión similar al detallado en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. En ensayos previos de fosfoproteómica, se identificaron variaciones en los perfiles de fosforilación durante el proceso de diferenciación de los promastigotes, vinculándose dichas modificaciones post-traduccionales principalmente con las funciones celulares de inicio de la traducción,

plegamiento y catabolismo de proteínas. No obstante, en el caso de pIR-PP1C-34 destaca también la sobre-expresión de diversos genes relacionados con el corpúsculo basal y los complejos de dineína, que se relacionan con la fosforilación de proteínas, el movimiento asociado a microtúbulos y la citocinesis. Este perfil de expresión, detectado exclusivamente en el transfectante pIR-PP1C-34, también se ha observado en células de mamíferos en los que se asocia la actividad fosfatasa tipo 1 con la organización del citoesqueleto.

El estudio comparativo de los perfiles de expresión génica de las tres líneas *knock-in* generadas han revelado que la sobre-expresión de las diferentes PP1 en estudio da lugar a la sub-expresión de 45 genes en común, de los cuales 16 son de función conocida. Este hecho podría deberse al mecanismo de interacción descrito de las PP1 con las PIP, donde esta asociación se lleva a cabo fundamentalmente a través de la superficie proteica correspondiente a la región catalítica conservada de las PP1.

En síntesis, los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral han revelado: i) alto grado de conservación de las secuencias de las proteína-fosfatasas PP1-240 y del *cluster* PP1-34 de *L. infantum*; ii) predominio de la sub-expresión en los perfiles de expresión génica diferencial detectados en líneas *knock-in* de sobre-expresión de las PP1 en estudio; iii) influencia de las PP1 en procesos celulares relacionados con la transcripción, traducción, modificación post-traducciona l de proteínas, el ciclo celular, el transporte y las moléculas de superficie; iii) una posible implicación de la proteína PP1-240 en procesos de diferenciación celular como sugieren la sub-expresión de los marcadores de metaciclo génesis SHERP y META1 en la línea de sub-expresión pIR-PP1-240; iv) la inducción de estrés celular en las líneas de sobre-expresión de las proteína-fosfatasas en estudio por la detección de los genes A2 y peroxidasa; v) la vinculación de las proteínas codificadas por el *cluster* PP1-34 con procesos relacionados con el citoesqueleto y flagelo.

SUMMARY

Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) is the causative agent of visceral leishmaniasis in the Mediterranean Basin, where dogs are the main reservoir. The infection is transmitted to the mammalian host by the bite of dipteran of the subfamily Phlebotominae. The life cycle of the parasite is digenetic and two stages alternate: the motile promastigote stage which develops in the invertebrate host and the non-motile amastigote stage, which multiplies within phagocytes of the mammalian host. Genome sequencing of the main *Leishmania* species was published between 2005 and 2007, and the development of high-throughput techniques, such as DNA microarrays, quantitative proteomics, and more recent methods based on next generation sequencing, have made exhaustive analysis of gene expression profiles of the parasite possible throughout the life cycle. This has been performed in order to find possible virulence factors involved in pathogenicity and/or possible therapeutic targets and vaccine candidates. In a previous comparative transcriptomics analysis performed in the laboratory of Molecular Parasitology of the Biological Research Center (CSIC), differential expression of the genes LinJ.34.0840 and LinJ.15.0240 encoding protein phosphatases 1 (PP1) was described in promastigotes isolated from the vector *Phlebotomus perniciosus*. Even though it has become clear that the phosphorylation status of protein is remarkable during the differentiation processes of the parasite, functionality of PP1 proteins from *Leishmania* spp. is not known accurately so far, as well as the signalling pathways in general. For this reason, characterization of these proteins was proposed to develop this doctoral thesis, which has been carried out in the laboratory mentioned.

Approximately one third of proteins of eukaryotic organisms are regulated by phosphorylation. Protein phosphatases are the enzymes responsible for eliminating phosphate esters from these proteins. According to their substrate specificity, protein phosphatases can be classified in two sub-groups: tyrosine phosphatases (PTP) and serine/threonine phosphatases (STP). PP1s are STP and constitute the most important family of protein phosphatases in terms of substrate diversity. Each PP1 holoenzyme is composed by a catalytic subunit and a regulatory subunit. The PP1 catalytic subunit is one of the most conserved proteins among eukaryotic organisms and has an approximate sequence identity of 70% and a molecular size comprised between 35 and 38 kDa. PP1s act in a very specific and strictly regulated mode due to their ability to form complexes with a great number of subunits that control their location, activity and substrate specificity. About 200 PP1 regulatory subunits or interaction proteins have been identified in vertebrate organisms. This explains the diversity of functions in which PP1 are involved: transcription, cell cycle, translation, metabolism, organization of the cytoskeleton, regulation of transporters, etc.

The main objective of this doctoral thesis is characterization of the PP1 encoded by the gene LinJ.15.0240 (PP1-240) and the PP1 cluster located on chromosome 34 (LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840 and LinJ.34.0850) of *L. infantum* (cluster PP1-34). Said characterization includes the analysis of the primary structure, the analysis of gene expression in the main stages of the life cycle of the parasite, the study of the sub cellular

localization and the study of the global alterations of differential gene expression in *knock in* axenic promastigote lines. In other words, stable transfectants that constitutively over-express PP1-240 or cluster PP1-34.

The multiple alignments performed have revealed a sequence similarity of 45% for protein PP1-240 and 60% for the consensus sequence of cluster PP1-34 with respect to nine PP1 encoded by different organisms representative of the main taxa of the evolutionary scale, with a similar level of identity to the ortholog in the genus *Trypanosoma* (~55%). PP1s of trypanosomatids are among the most divergent of the eukaryotic organisms analyzed.

All four PP1 defined as cluster PP1-34 contain a highly conserved (>95%) common catalytic core, and a variable N-terminus. This evidence has been observed also between mammalian PP1s, and isoforms have been described: PP1 α , PP1 β , PP1Y1 y PP1Y2. For this reason, all four PP1s integrated in the cluster PP1-34 of *L. infantum* may correspond to different isoforms derived from the same protein, as in the case of mammals.

The protein PP1-240 and the cluster PP1-34 maintain all amino acids involved in interaction with substrates and metal ions intact. These data confirm that the PP1 sequences of *L. infantum* are evolutionary conserved.

This study has confirmed *in vitro* STP activity of the fusion protein PP1-840-MBP obtained under native conditions by using the heterologous expression system composed by the plasmid vector pETM-41 and the *SHuffle E. coli* strain. This system that allows fusing the sequence of interest to the MBP was used because PP1s of *L. infantum* are insoluble, like orthologs such as human PP1s.

The studies performed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and Western blot have allowed to determine the relative gene expression levels of PP1-240 and cluster PP1-34 throughout the growth curve of axenically cultured promastigotes. Relative abundance of protein PP1-240 is analogous at this stage, according to what has been observed by means of Western blot. This finding supports that expression of PP1-240 is constitutive in axenically cultured promastigotes. In the case of cluster PP1-34, a light increase of the protein abundance has been detected at the stationary phase of axenic culture of promastigotes according to Western blot assays. For this reason, a post-transcriptional regulatory mechanism controlling expression of this protein may exist.

qRT-PCR studies have been also carried out to evaluate the steady-state transcript levels of PP1-240 and cluster PP1-34 in the populations of metacyclic promastigotes, both derived from the gut of the sand fly vector *P. perniciosus* (Pro-Pper) or from the non-agglutinating subpopulation with peanut lectin within the stationary phase population in axenic culture (PNA⁻), and also amastigotes, compared to axenic promastigotes in logarithmic and stationary phase. The gene expression fold changes were lower than 2 in all cases with variation, although these differences were statistically significant. The most relevant ones consist of up-regulation of genes LinJ.15.0240, LinJ.34.0820 and LinJ.0850 in Pro-Pper vs. PNA⁻. These data reveal the influence of the culture conditions in the gene expression profiles of *L. infantum*. Protein PP1-240 is more abundant in intracellular amastigotes obtained from *in vitro* infections of the U937 cell line, with respect to axenic amastigotes, according to the Western blot assays. These assays are not viable in the case

of Pro-Pper currently because of the reduced amount of biological material from the parasite that can be obtained from the gut of the vector.

The indirect immunofluorescence assays (IFA) have confirmed the expression profile observed by means of Western blot for protein PP1-240 and the proteins from the cluster PP1-34 in the life cycle of *L. infantum*. Therefore, protein PP1-240 has been detected by both methods in both promastigotes and amastigotes, whereas the cluster PP1-34 was only detected in promastigotes. Protein PP1-240 is distributed in the whole extension of the flagellar appendix and the flagellar pocket, while PP1 encoded by cluster PP1-34 are localized mainly in the flagellar pocket. This area has an essential role in morphogenesis of trypanosomatids and is involved in endocytosis and exocytosis. Likewise, correct formation of the flagellar pocket is crucial for viability and infectivity of the parasite. Therefore, sub cellular location observed in the case of protein PP1-240 and the proteins from cluster PP1-34 may present a key role in infectivity and cellular differentiation processes which take place during the life cycle of *Leishmania*.

With the aim of obtaining information about the biological functionality of PP1s of *L. infantum*, three *knock-in* promastigote lines were generated using the pIR integrative plasmid vector. Global gene expression of these *knock-in* cell lines was analyzed by RNA-Seq at days 1, 3 and 5 of the growth curve. In the case of PP1-240, two *knock-in* cell lines were generated, pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T, with the aim of constitutively over-expressing the whole PP1-240 sequence and a truncated version lacking the N-terminus (PP1-240T), respectively. In the case of cluster PP1-34, the knock-in pIR-PP1C-34 cell line was generated for over-expression of the common catalytic region encoded by this cluster.

RNA-Seq analysis of lines pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T have revealed differential expression of 103 and 92 genes, respectively. In both lines, more than 80% of changes in relative expression were detected during the first day of the growth curve. These results are correlated to the high mRNA and protein levels described previously for pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T transfectants at day 1. In both cases, RNA-Seq analysis revealed over-expression of the respective proteins at days 1, 3 and 5 of the growth curve. However, this up-regulation was higher at day 1, namely 4 and 2,5 times, respectively. In addition, the global changes consist of down-regulation in more than 85% cases.

According to the Gene Ontology (GO) functional nomenclature and enrichment analysis in GO functions, those genes differentially expressed in both pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T are related basically with the following biological processes: gene expression, translation, transport of molecules, and metabolic activities. However, certain metabolic processes observed in pIR-PP1-240, such as those related with pteridin, were not detected in pIR-PP1-240T, whereas terms describing other processes related with riboflavin or transport of metal ions were found in the pIR-PP1-240T transfectant.

Clustering analysis performed on the basis of the euclidean distance by means of the Ward hierarchical method using edgeR v.3.12.1 software on the set of RNA-Seq data has revealed that the expression profiles of lines pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T are similar at day 1. Namely, the study of the sets of down-regulated genes at day 1 yields a total of 48 common genes between both lines, including genes of known function and hypothetical proteins. In fact, this intersection between both sets represents more than one half of the total number of differentially expressed genes in both lines. Therefore, the expression profiles detected in pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T indicate that the protein PP1-240 maintains certain activity despite deletion of the N-terminus. Likewise, the results suggest that the N-terminus of protein PP1-240 may have a relevant function in the interaction with certain regulatory proteins, whereas said interaction may occur through the surface of the catalytic subunit PP1-240 in the case of other proteins, as it has been described in the majority of PP1s.

The study of the cell line pIR-PP1C-34 by means of RNA-Seq has revealed differential expression of 279 at days 1, 3 and 5 of the growth curve. Approximately 95% of differentially expressed genes are uniformly distributed between days 1 and 3 of the growth curve. However, these results are not correlated with the fold-change found for PP1C-34, where a progressive decrease of the over-expression levels were detected throughout the growth curve. The detailed study of differentially expressed genes in pIR-PP1C-34 has revealed down-regulation of a considerable number of genes which has been previously detected in transfectants pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T.

According to the gene ontology studies including functional enrichment analysis, the genes over-expressed in pIR-PP1C-34 at days 1 and 3 show biological functions related to gene expression regulation, translation, macromolecule biosynthetic processes and protein folding. These processes are essentially linked to the cell components of the nucleus, ribosomes and mitochondria. These results show an expression profile similar to those of transfectants pIR-PP1-240 and pIR-PP1-240T. In previous phosphoproteomics assays, variations of the phosphorylation profiles were detected during the differentiation process of promastigotes. These changes are related to post-translational modifications, mainly with the cellular functions of initiation of translation, protein folding and protein catabolism. However, up-regulation of certain genes related with the basal body and dynein complexes is remarkable in the case of pIR-PP1C-34. The dynein complexes are related to protein phosphorylation, movement associated to microtubules and cytokinesis. This expression profile has been detected exclusively in the pIR-PP1C-34 transfectant and has been also observed in mammalian cells, where PP1 activity is associated with cytoskeleton organization.

The comparative study of the gene expression profiles of all three *knock in* lines have revealed that up-regulation of the corresponding PP1s of interest has triggered down-regulation of 45 common genes, of which 16 are genes of known function. This fact may be due to the interaction mechanisms of the PP1s that has been described with PIP, where this association is carried out through the protein surface of the conserved catalytic region of the PP1s.

In summary, the studies performed in this doctoral thesis have revealed the following: i) the high sequence conservation degree of the *L. infantum* protein-phosphatases PP1-240 and cluster PP1-34; ii) the global expression profile changes in the generated over-expression transfectants induce a down-regulation in more than 85% of genes; iii) studied PP1 are related with the cellular process of transcription, translation, post-translational modifications, cell cycle, transport and surface proteins; iv) PP1-240 is probably associated with cell differentiation processes in *L. infantum* as suggests the sub-expression of SHERP and META1 genes in the knock-in promastigote line pIR-PP1-240; v) the PP1-34 cluster is involved in cellular processes related to the cytoskeleton and the flagellum.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- LEISHMANIASIS.

La leishmaniasis es una parasitosis vectorial causada por protozoos del género *Leishmania*. Desde el punto de vista sanitario, constituye un problema de salud pública y veterinario, ya que afecta a hospedadores mamíferos como el hombre y el perro. A nivel mundial, se encuentra presente en 98 países localizados principalmente en regiones tropicales y subtropicales. La distribución geográfica de la leishmaniasis está condicionada por la presencia de los vectores artrópodos y el nivel de desarrollo del país, ya que es una enfermedad estrechamente vinculada a la pobreza (OMS, 2010). La transmisión de la leishmaniasis se produce por la picadura de un insecto hematófago perteneciente al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Killick-Kendrick, 1999; Ready, 2013). En el hombre la leishmaniasis puede estar causada por más de 20 especies y es transmitida al menos por 30 especies de flebotomos. La presentación clínica de la enfermedad depende de la respuesta inmunitaria del hospedador y la especie parasitaria implicada. En el hombre, la enfermedad puede ser clasificada principalmente como leishmaniasis cutánea (LC), caracterizada por la presencia de lesiones ulcerativas únicas en el área de inoculación del parásito; leishmaniasis mucocutánea (LMC), debido a la diseminación del agente infeccioso a la mucosa naso-orofaríngea; y leishmaniasis visceral (LV), por la presentación sistémica de la enfermedad y con un carácter potencialmente mortal si no se trata (Herwaldt, 1999). En la cuenca mediterránea, la LV es una zoonosis causada por *L. infantum*, donde el perro constituye el reservorio principal.

1.1.1.- Etiología.

1.1.1.1.- Clasificación taxonómica del género *Leishmania*.

Los protozoos responsables de la leishmaniasis pertenecen al género *Leishmania*. Estos parásitos fueron identificados por primera vez en 1885 por Cunningham y descritos posteriormente en 1900 por Leishman y en 1903 por Donovan (Handman, 1999). Su clasificación taxonómica se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Leishmania* (Cavalier-Smith, 1998).

Dominio	Eukaryota
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Euglenozoa
Subfilo	Saccostoma
Clase	Kinetoplastea
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>

Introducción

De acuerdo al desarrollo del parásito en el tracto digestivo del vector, el género *Leishmania* se subdivide en los subgéneros *Leishmania* (región supra-pilórica) y *Viannia* (región peripilórica) (Lainson y Shaw, 1987). Las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* están presentes en el Nuevo Mundo y en el Viejo Mundo, mientras que las del subgénero *Viannia* están restringidas al Nuevo Mundo. A su vez, las especies de *Leishmania* se agrupan en diferentes complejos. La LV está causada por 3 especies que se incluyen dentro del complejo *L. donovani*: *L. infantum*, *L. donovani* y *L. chagasi*. En la Figura 1 se muestra un esquema de la taxonomía actualizada del género *Leishmania* (Rioux y col., 1990) (OMS, 2010).

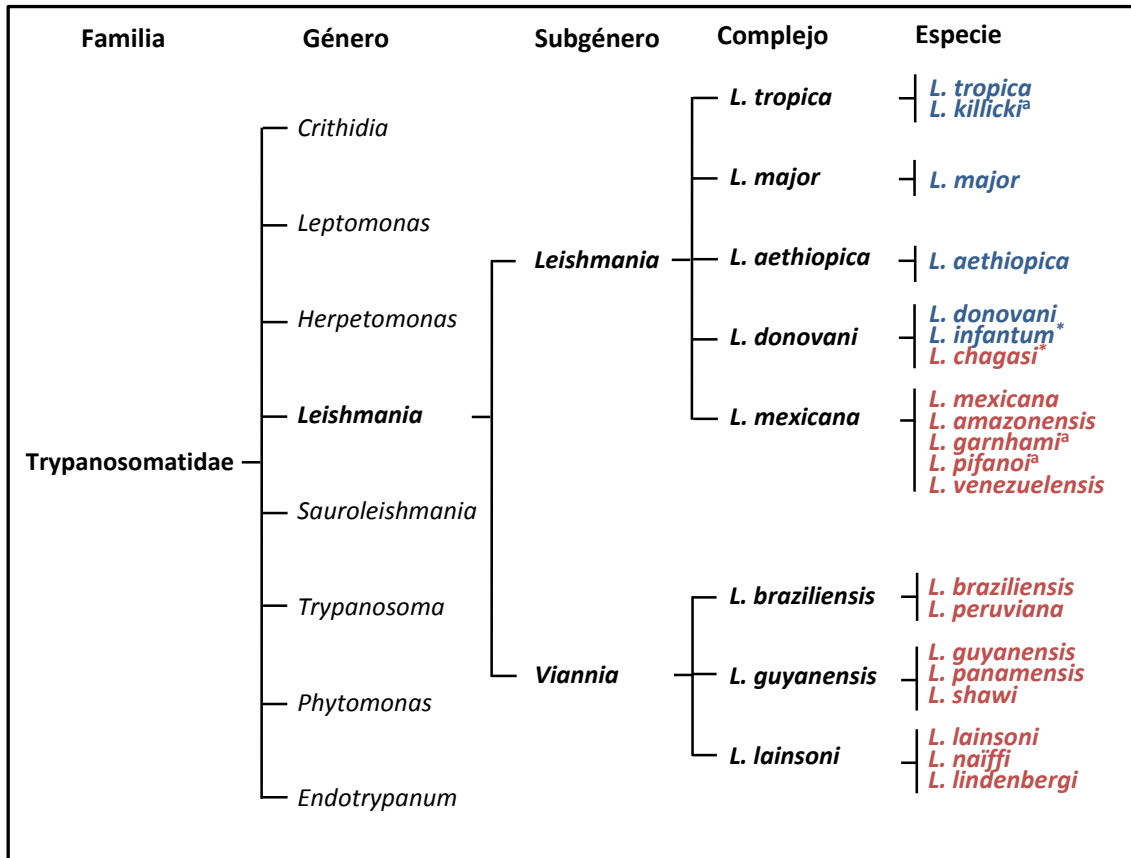


Figura 1. Clasificación de las especies del género *Leishmania* patógenas en el hombre. Se resaltan las especies de acuerdo a su distribución geográfica: Viejo Mundo (azul) y Nuevo Mundo (rojo). * *L. infantum* en el Viejo Mundo es sinónimo de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. ^a Estatus de especie en debate. (Adaptado de OMS, 2010; Akhoundi y col., 2016).

La identificación precisa de la especie de *Leishmania* es esencial para la comprensión de la epidemiología, control y tratamiento de la leishmaniasis (OMS, 2010). Inicialmente, las especies fueron clasificadas de acuerdo a métodos de caracterización extrínsecos basados en las manifestaciones clínicas, características geográficas y biológicas. A partir de 1970, se han desarrollado métodos de caracterización intrínsecos, como análisis inmunológicos, bioquímicos y genómicos (RFLP, PCR, hibridación con sondas de ADN...) (Bañuls y col., 2007).

En la actualidad, el análisis isoenzimático es la técnica convencional de referencia desde el punto de vista taxonómico (Rioux y col., 1990). Los parásitos de una especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos pertenecen a un único zimodema (MON). *L. infantum* representa la principal especie establecida en Europa, donde el perro es considerado el reservorio principal. En los estudios de caracterización de cepas se han identificado 31 zimodemas de *L. infantum* en la cuenca mediterránea, siendo el zimodema MON-1 el responsable del 90% de los casos de LV y el 20% de LC en el hombre (Alvar, 2001; OMS, 2010).

1.1.1.2.- Clasificación taxonómica y biología del vector.

Los vectores responsables de la leishmaniasis son dípteros pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae. Se han descrito aproximadamente 70 especies de flebotomos como posibles vectores de la leishmaniasis (Maroli y col., 2013; Ready, 2013). La transmisión del parásito se produce por la picadura de flebotomos hembra pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. El género *Sergentomyia* comprende a las especies de flebotomos responsables de transmitir *sauroleishmanias* en reptiles, no patógenas para el hombre. Su clasificación taxonómica se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica del insecto vector flebotomo.

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Mandibulata
Superclase	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Superfamilia	Psychodoidea
Familia	Psychodidae
Subfamilia	Phlebotominae
Género	<i>Phlebotomus</i> <i>Lutzomyia</i> <i>Sergentomyia</i>

Introducción

Los flebotomos son insectos holometábolos que llevan a cabo su metamorfosis a través de 4 fases de desarrollo: huevo, larva (4 estadíos), pupa y adulto. En las áreas tropicales realizan su ciclo vital completo durante todo el año, mientras que en la región paleártica está limitado al periodo comprendido entre los meses de mayo a octubre, sobreviviendo durante el invierno en el cuarto estadío larvario o diapausa (revisado por Alvar, 2001). El apareamiento de los flebotomos puede ocurrir en el hospedador mamífero o cerca de él, siendo las hembras atraídas por las feromonas producidas por los vectores machos (Ward y Morton, 1991). Las hembras grávidas depositan sus huevos en nichos ecológicos arenosos localizados en zonas de penumbra, con una humedad relativa alta, temperatura constante y enriquecidos con materia orgánica para el desarrollo de las larvas (Killick-Kendrick, 1999). La alimentación de los flebotomos se basa fundamentalmente en fuentes naturales de azúcares procedentes de plantas e insectos. Únicamente las hembras son hematófagas, obteniendo de la sangre los nutrientes necesarios para la producción de los huevos. El tiempo transcurrido desde la ingesta de sangre a la ovoposición se denomina ciclo gonotrófico. La duración de este ciclo está condicionada por el tipo de especie, la velocidad de digestión y la temperatura ambiental (Killick-Kendrick, 1999). La mayoría de las especies estudiadas realizan una sola ingesta por ovoposición, son concordantes gonotróficas, y presentan menos riesgo epidemiológico que las discordantes gonotróficas, las cuales requieren más de una ingesta (revisado por Alvar, 2001).

Las formas adultas son de color pardo-amarillento y su tamaño varía entre 2 y 3 mm (Molyneux y Ashford, 1983). Se caracterizan por su aspecto giboso, la presencia de alas lanceoladas, patas muy largas y cuerpo recubierto por vellosidades (Figura 2). A diferencia de los mosquitos, su vuelo es silente con velocidades menores a 1 m/s (Killick-Kendrick y col., 1986). El área de vuelo es generalmente corta y próxima a las zonas de cría, aunque algunas especies como *P. ariasi* pueden recorrer distancias de más de 2 km (Killick-Kendrick, 1990).

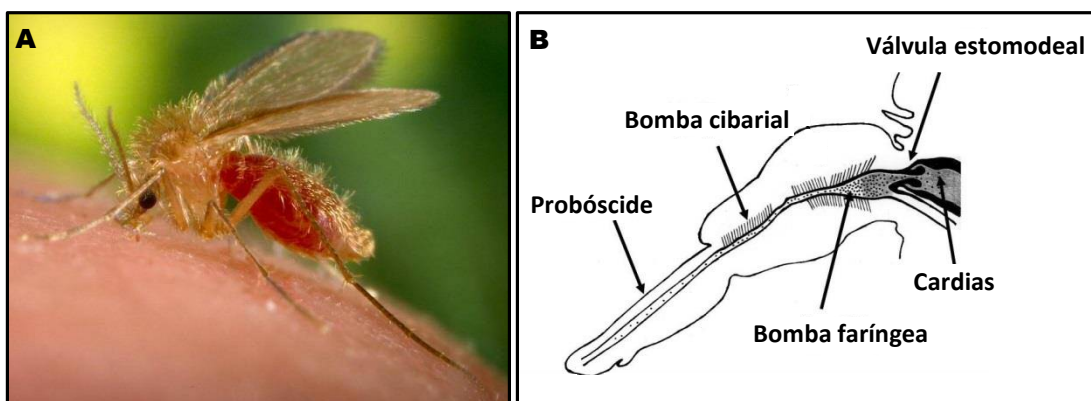


Figura 2. Características morfológicas del insecto vector flebotomo. (A) Flebotomo adulto hembra durante la ingesta de sangre. Imagen tomada por J. Gathany (B) Detalle del tubo digestivo anterior. Adaptado de Bates, 2007

La distribución de los flebotomos comprende principalmente ambientes peridomésticos en las regiones áridas o semiáridas del Viejo Mundo, y hábitats selváticos del Nuevo Mundo (Sharma y Singh, 2008). Su actividad es crepuscular o nocturna aunque algunas especies se alimentan durante el día (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008). Los hábitats de descanso se localizan próximos a los lugares de cría y se caracterizan por ser áreas frías, húmedas y oscuras (Killick-Kendrick, 1999). La densidad vectorial está condicionada por factores climáticos como la temperatura y la humedad (Sharma y Singh, 2008; Ready, 2013). En la cuenca mediterránea, *P. ariasi* y *P. perniciosus*, son los principales vectores responsables de la transmisión de *L. infantum* y presentan una dinámica estacional bifásica con densidades máximas durante los meses de julio y septiembre (revisado en Alvar, 2001).

1.1.1.3.- Ciclo biológico de *Leishmania*.

El ciclo biológico de *Leishmania* es heteroxeno y dimórfico porque se desarrolla en dos hospedadores diferentes con la alternancia de dos estadios. El promastigote es el estadio extracelular, móvil que se desarrolla en el interior del tubo digestivo del vector invertebrado, mientras que el amastigote es inmóvil y se multiplica intracelularmente en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador mamífero.

El ciclo se inicia cuando un flebotomo ingurgita macrófagos parasitados con amastigotes a partir de un hospedador mamífero (Figura 3). En el tracto digestivo del vector, los amastigotes liberados se diferencian rápidamente (24-48h) en promastigotes procíclicos con capacidad replicativa. A continuación, el parásito inicia una migración ascendente hacia la válvula estomodeal (5-10 días) mientras transcurre un proceso de diferenciación denominado metacicloogénesis. Dicho proceso da lugar al desarrollo de una forma más infectiva, sin capacidad replicativa, de morfología fusiforme y con un largo flagelo, denominada promastigote metacíclico (Sacks y Perkins, 1984). Durante la siguiente ingesta de sangre, el flebotomo inoculara junto con su saliva los promastigotes de la proboscide en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado. Una vez en la sangre circulante, los promastigotes que sobreviven a la respuesta inmunitaria innata son fagocitados por los macrófagos e incorporados en los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas, donde se diferencian a amastigotes (Chang y Dwyer, 1976). Dentro de estas vacuolas, los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta que la célula hospedadora es lisada. Los amastigotes liberados pueden ser fagocitados por otros macrófagos diseminando la infección, o ser ingeridos por un nuevo vector, cerrando así el ciclo.

Otras vías de transmisión de carácter no vectorial han sido descritas tanto en el hombre como en los perros. Estas vías se dan con baja frecuencia e incluyen la transmisión venérea (Symmers, 1960; Silva y col., 2009), congénita (Figueiró-Filho y col., 2004; Boggiatto y col., 2011) y las transfusiones sanguíneas (de Freitas y col., 2006; Dey y Singh, 2006). Además, el uso compartido de agujas en drogodependientes representa una vía de transmisión excepcional descrita en el hombre (Cruz y col., 2002).

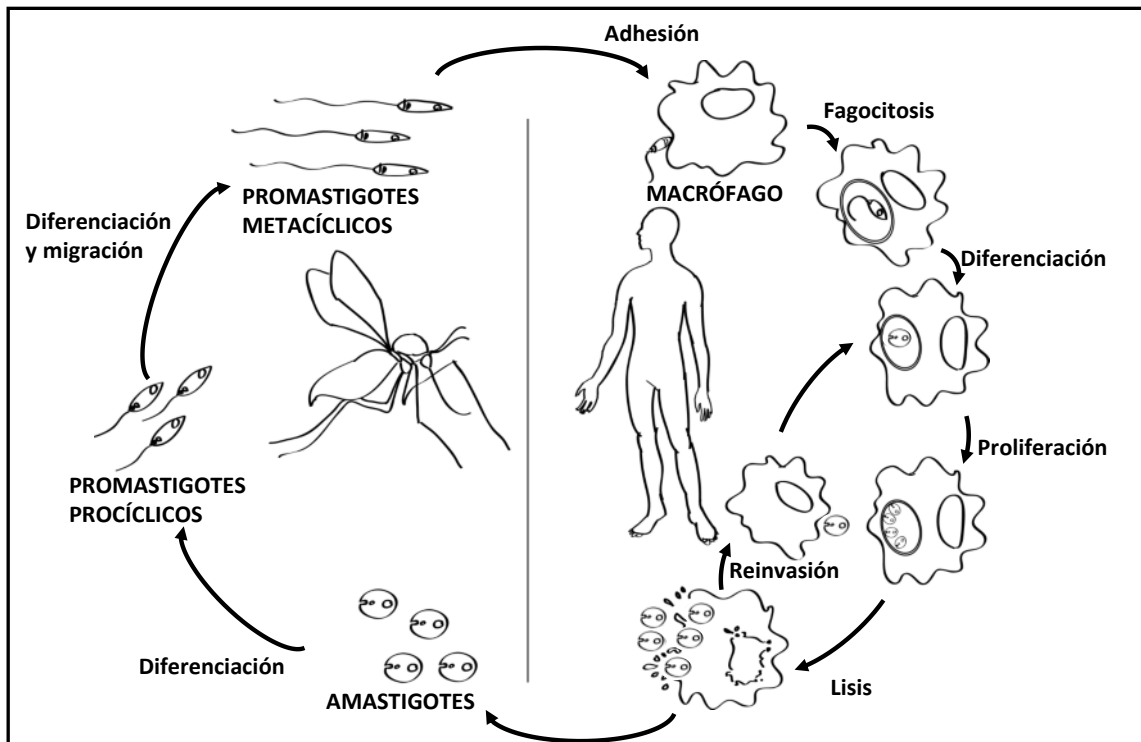


Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania*. Adaptado de Handman, 1999.

1.1.2.- Epidemiología.

1.1.2.1.- Leishmaniasis humana.

Actualmente, la leishmaniasis está presente a nivel mundial en 98 países y se considera endémica en la región tropical de África y América, en el subcontinente indio y en las regiones del suroeste de Asia y en la cuenca mediterránea. La infección en humanos está ocasionada por más de 20 especies de *Leishmania* y se han descrito hasta 30 especies de flebotomos capaces de transmitir la enfermedad. Según los datos oficiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010), se estima que 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección por *Leishmania* y 12 millones de personas están infectadas. Aproximadamente, se registran cada año entre 0,7-1,2 millones de casos de LC y entre 0,2-0,4 millones de casos de LV, con una tasa de mortalidad estimada por LV de 20.000-40.000 muertes por año (Alvar y col., 2012). Más del 90% de los casos de LV ocurren en las áreas rurales y suburbanas pobres de 6 países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Brasil y Etiopía. La LC presenta una distribución más amplia, el 75% de los casos se han descrito en 10 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Siria y Sudán del Norte (Alvar y col., 2012) (Figura 4). Sin embargo, existe una considerable subestimación de la incidencia real de la enfermedad, puesto que los principales países afectados carecen de sistemas de vigilancia y registro competentes. Además, la leishmaniasis sólo se considera enfermedad de declaración obligatoria en 33 países de los 98 afectados (Desjeux, 2004).

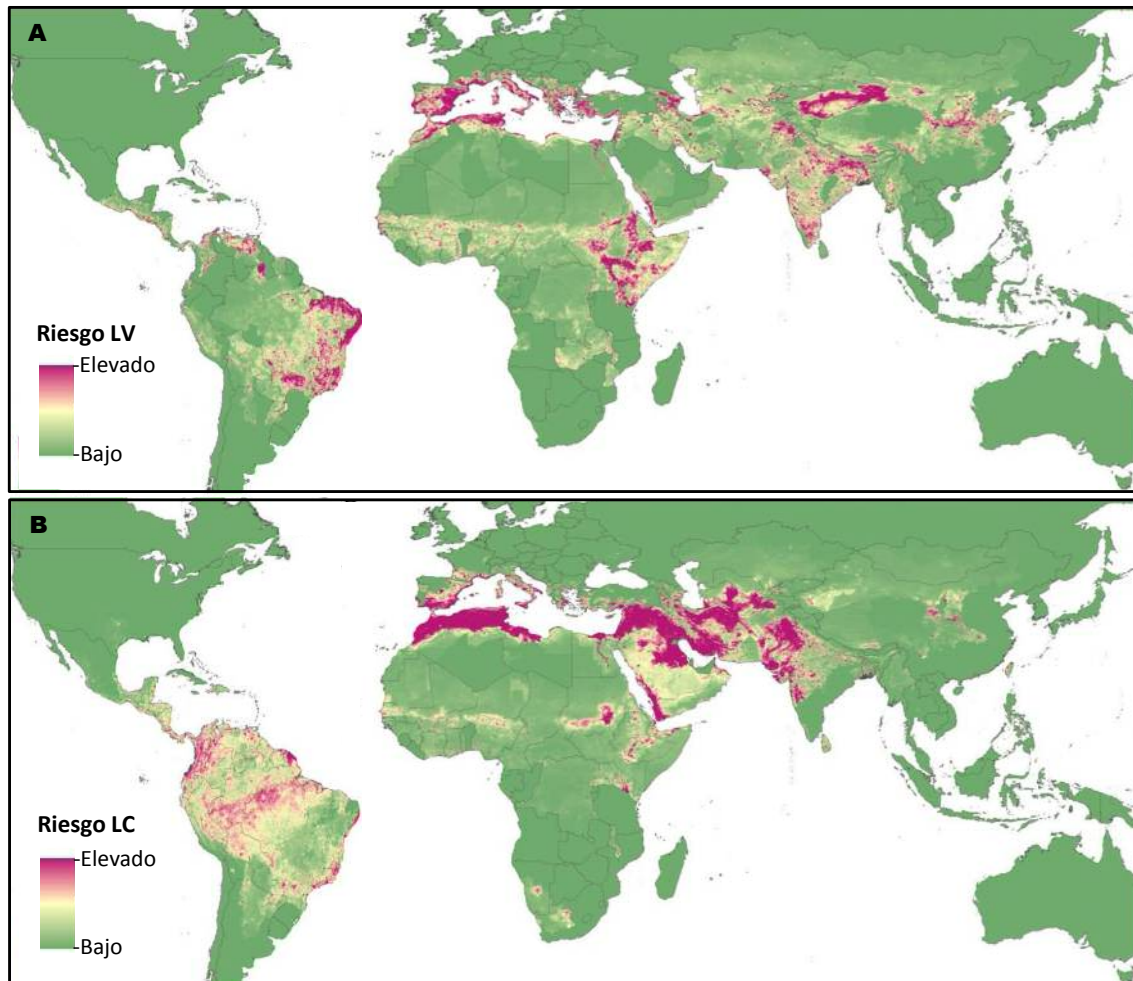


Figura 4. Distribución mundial del riesgo epidemiológico de la leishmaniasis. (A) Riesgo de leishmaniasis visceral (LV). (B) Riesgo de leishmaniasis cutánea (LC). Adaptado de Piggot y col, 2014.

La leishmaniasis presenta una incidencia creciente (Alvar y col., 2012; Pigott y col., 2014). Entre los factores de riesgo asociados al incremento del número de casos destacan los desplazamientos de las poblaciones, deforestación, pobreza, urbanización o cambios en la susceptibilidad del hospedador debido a inmunosupresión (quimioterapia, VIH...) o malnutrición (Desjeux, 2001). La terapia retroviral ha permitido reducir la incidencia de los casos de coinfección *Leishmania*/VIH registrados en Europa (Desjeux y Alvar, 2003; Cruz y col., 2006). Sin embargo, éstos continúan representando un problema en los países en vías de desarrollo, donde la situación se ve agravada por la aparición de resistencias a los antimoniales, primera línea terapéutica empleada frente a la leishmaniasis (Alvar y col., 2008). Asimismo, el calentamiento global está propiciando la expansión de la enfermedad a regiones más septentrionales como el Norte de Europa (Gradoni, 2013).

En España, la leishmaniasis es una zoonosis endémica causada por *L. infantum*. La transmisión del parásito se realiza a través de dos especies de flebotomos: *P. perniciosus*, ampliamente distribuido por la mayoría de las zonas áridas peninsulares y el archipiélago Balear; y *P. ariasi*, ligado a ambientes más frescos y húmedos de la península (Suárez y col.,

Introducción

2012). El Real Decreto 2210/1995 contempla la leishmaniasis como una enfermedad endémica de ámbito regional para su seguimiento a través de la Red Nacional de Vigilancia epidemiológica (RENAVE), aunque no está reconocida como enfermedad de declaración obligatoria (EDO) a nivel nacional. Desde el año 2000 al 2010, fueron registrados más de 1.000 casos de leishmaniasis en España a través de RENAVE, siendo los mayores índices registrados en Andalucía, Baleares, Cataluña, Madrid, y Valencia. Mientras tanto, el Registro de Altas Hospitalarias (Conjunto Único Básico de Datos, CMBD) reveló más de 2.500 casos para el mismo periodo, lo que pone de manifiesto una subnotificación de los casos de leishmaniasis en España (Suárez y col., 2012). En julio de 2009 se detectó en el suroeste de la Comunidad de Madrid (Fuenlabrada) el mayor brote de leishmaniasis registrado en Europa, 446 casos hasta diciembre de 2012 (Jiménez y col., 2013). Los estudios entomológicos han propuesto que la liebre podría estar actuando como reservorio selvático (Molina y col., 2012), puesto que la incidencia en los perros no se vio alterada durante ese periodo (Arce y col., 2013).

1.1.2.2.- Leishmaniasis canina.

La leishmaniasis canina es una zoonosis causada por *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. La identidad genética entre las dos especies sugiere que esta enfermedad fue importada al continente americano por perros infectados durante el periodo colonial, siendo consideradas por tanto especies sinónimas (Lukes y col., 2007).

La leishmaniasis canina es endémica en más de 70 países en los que está presente la leishmaniasis humana, representando la cuenca mediterránea y Brasil los principales territorios afectados (Baneth y col., 2008; OMS, 2010; Solano-Gallego y col., 2011). El número total de perros domésticos infectados por *L. infantum* a nivel mundial es desconocido (Gradoni, 2015). En el suroeste de Europa, se estima que al menos 2,5 millones de perros están infectados (Moreno y Alvar, 2002). La prevalencia de la leishmaniasis canina en este área presenta una gran variabilidad debido a la distribución focal de la enfermedad (Pennisi, 2015), con una seroprevalencia media del 10% (Franco y col., 2011). Factores socioeconómicos y posibles factores climáticos han motivado cambios en los patrones de distribución de la leishmaniasis canina en Europa. La infección por *L. infantum* se ha extendido hacia el norte de Italia, norte de España y los Pirineos franceses (Solano-Gallego y col., 2011). Asimismo, los desplazamientos de perros domésticos durante los periodos vacacionales y la importación de animales de compañía desde zonas endémicas, han favorecido la presencia de perros infectados en regiones no endémicas como Holanda, Reino Unido y Alemania (Teske y col., 2002; Naucke y Schmitt, 2004; Shaw y col., 2009). Aunque la leishmaniasis canina es considerada una enfermedad rural, su presencia está aumentando en zonas urbanas debido al número creciente de viviendas unifamiliares con jardín en la periferia de las ciudades y a los perros vagabundos que provienen de las zonas rurales (Tselentis y col., 1994; Cortes y col., 2007). Por otro lado, los perros han sido identificados como posibles reservorios o reservorios accidentales de otras

especies de *Leishmania* como *L. tropica* y *L. donovani* en el Viejo Mundo (Pennisi, 2015), así como de especies de los subgéneros *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, y *L. peruviana*) y *Leishmania* (*L. amazonensis*) en el Nuevo Mundo (Dereure y col., 2003). Además, *Leishmania* ha sido detectada en animales salvajes como zorros, lobos y chacales, constituyendo el ciclo selvático de la leishmaniasis (Alvar y col., 2004). El parásito también ha sido aislado en otros animales como roedores, lagartos y lagomorfos, así como en animales domésticos entre los que se encuentran las gallinas, los caballos (Gramiccia, 2011) y los gatos (Maia y Campino, 2011). Sin embargo, la significación epidemiológica de estos animales no está clara, pudiendo constituir un reservorio secundario o un hospedador accidental (Alvar y col., 2004).

1.1.3.- Manifestaciones clínicas.

1.1.3.1.- Leishmaniasis humana.

La presentación clínica de la leishmaniasis humana varía en función de la especie implicada así como de la respuesta inmunitaria del hospedador (Handman, 1999). En la Tabla 3 se detallan las principales especies patógenas aisladas en el hombre.

Tabla 3. Clasificación de las especies de *Leishmania* según la manifestación clínica principal que causan en el hombre. Adaptado de la OMS, 2010.

	Viejo Mundo		Nuevo Mundo	
	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
LV	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>		<i>L. chagasi</i>	
LC	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		<i>L. chagasi</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. shawi</i> <i>L. lindenbergi</i>
LMC				<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
LCD	<i>L. aethiopica</i>		<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	
LDPK	<i>L. donovani</i>			

L. infantum en el Viejo Mundo es sinónimo de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. ^a Estatus de especie en debate. LV, leishmaniasis visceral; LC, leishmaniasis cutánea; LMC, leishmaniasis mucocutánea; LCD, leishmaniasis cutánea diseminada; LDPK, leishmaniasis dérmica post-*Kala-azar*.

Introducción

Las manifestaciones clínicas presentes en el hombre son:

Leishmaniasis cutánea (LC).

En el Viejo Mundo, la LC es ocasionada principalmente por *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, aunque otras especies como *L. infantum* y *L. donovani* también pueden causar la enfermedad. En el Nuevo Mundo están implicadas al menos 15 especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Tabla 3) (OMS, 2010). La lesión clásica comienza en forma de pápula o nódulo en el punto de inoculación, que evoluciona a una lesión ulcerativa con induración de los bordes (Figura 5). La úlcera se cura gradualmente a lo largo de meses o años. Algunas lesiones no se ulceran pero persisten como nódulos o placas, y en ocasiones pueden aparecer lesiones satélites o linfadenopatías regionales (David y Craft, 2009). La leishmaniasis cutánea recidivante (LCR) es una presentación crónica de la LC causada por *L. tropica*.

Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD).

La LCD es una variante de la LC, cuyo agente causal es *L. aethiopica* en el Viejo Mundo, y *L. mexicana* y *L. amazonensis* en el Nuevo Mundo (OMS, 2010). La enfermedad comienza con una pápula o nódulo en el sitio de inoculación que se disemina a otras regiones de la piel (Figura 5). La LCD puede recordar clínicamente a la lepra lepromatosa (Grevelink y Lerner, 1996; Jhingran y col., 2008). La enfermedad presenta una respuesta parcial al tratamiento, dando lugar a recidivas y curso crónico en algunos casos.

Leishmaniasis mucocutánea (LMC).

La LMC es una enfermedad propia del continente americano, siendo *L. (V) braziliensis* el principal agente causal (Choi y Lerner, 2001), aunque también puede ser ocasionada por *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. amazonensis* (David y Craft, 2009). El 90% de los pacientes presentan una cicatriz debido a un episodio previo de LC (Machado-Coelho y col., 2005). Los parásitos se diseminan vía hematogena o linfática desde la piel a la mucosa nasofaríngea. Clínicamente, se caracteriza por lesiones nasales eritematosas y ulcerativas e infiltración del septo cartilaginoso anterior, que pueden progresar destruyendo la región nasofaríngea y la cavidad oral (Figura 5).

Leishmaniasis visceral o Kala-azar (LV).

La LV es causada por parásitos del complejo *L. donovani*, que incluye las especies *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo (OMS, 2010). Desde el punto de vista epidemiológico, la LV puede ser una antroponosis si la especie implicada es *L. donovani* o zoonosis si es causada por *L. infantum*. La infección puede mantenerse asintomática o seguir un curso agudo, subagudo o crónico tras un periodo de incubación de semanas o meses. La LV presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas, caracterizándose el síndrome clásico por la presencia de fiebre, caquexia severa, esplenomegalia y hepatomegalia (Figura 5). La infección por LV presenta generalmente un curso fatal si no se trata (revisado por Herwaldt, 1999). Además, se ha descrito una variante de la LV, la leishmaniasis viscerotrópica, que se caracteriza por manifestaciones sistémicas no específicas debido a la infección por *L. tropica* (Magill y col., 1993).

Leishmaniasis dérmica post-Kala-azar (LDPK).

La LDPK está causada principalmente por *L. donovani* y es endémica en la India y en África oriental, donde afecta hasta a un 10% y a un 50% de los individuos con LV, respectivamente. La enfermedad se manifiesta entre los 6 meses y los 3 años después de la recuperación clínica de la LV o durante el curso de la enfermedad, aunque es posible su aparición en personas sin antecedentes de leishmaniasis (Zijlstra y col., 2003). La presentación clínica varía desde máculas hipopigmentadas o eritematosas a pápulas o nódulos infiltrativos (Figura 5). Los individuos afectados por LDPK pueden actuar como reservorios de la enfermedad (OMS, 2010).

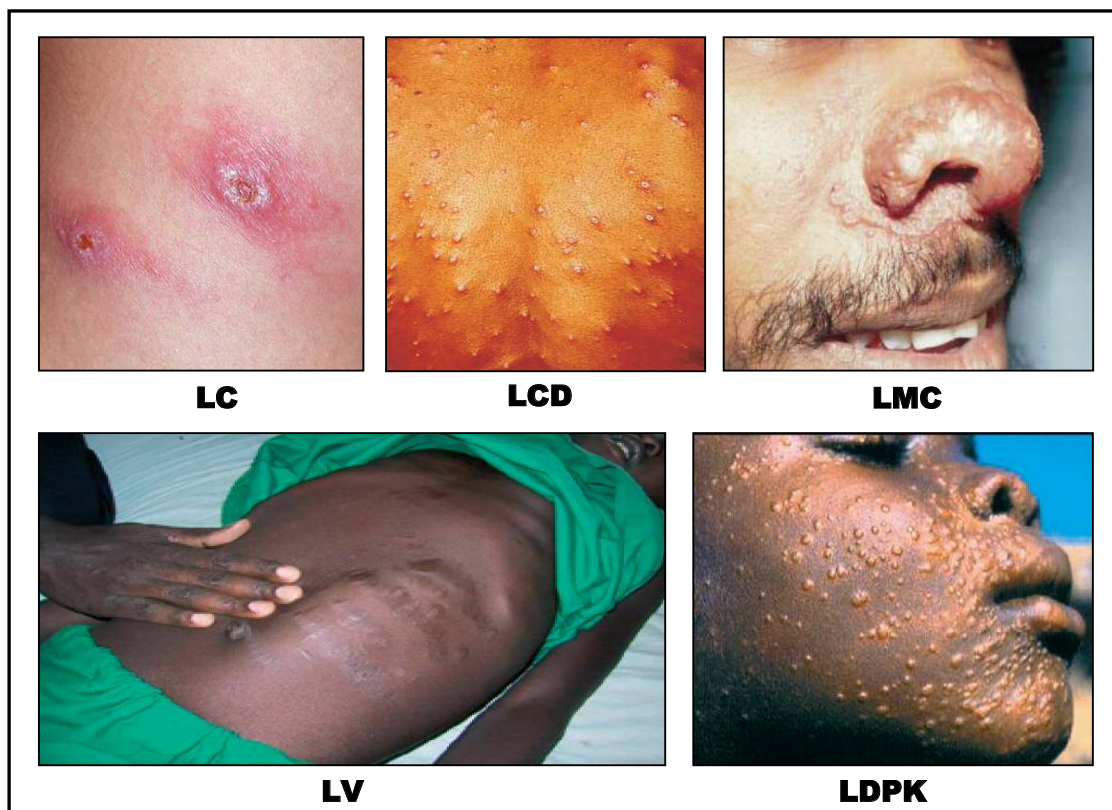


Figura 5. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana. LC, leishmaniasis cutánea (imagen de David y Craft, 2009); LCD, leishmaniasis cutánea diseminada (imagen de Turetz y col., 2002), LMC; leishmaniasis mucocutánea (imagen de Choi y Lerner, 2001); LV, leishmaniasis visceral (imagen de Chappuis y col., 2007); LDPK , leishmaniasis dérmica post-Kala-azar (imagen de Zijlstra y col., 2003).

1.1.3.2.- Leishmaniasis canina.

La leishmaniasis canina es un enfermedad sistémica cuyas manifestaciones clínicas son muy variables debido a factores relacionados con la patogenicidad del parásito y la respuesta inmunitaria individual del hospedador (Slappendel, 1988; Ciaramella y col., 1997). Sin embargo, a diferencia de lo observado en humanos, la leishmaniasis canina se caracteriza por un cuadro clínico complejo donde puede existir concurrencia de signos cutáneos y viscerales.

Introducción

La presentación clínica varía desde ausencia de síntomas a un síndrome severo generalizado, con un periodo de incubación que oscila entre los 2 y 8 meses (revisado por Alvar y col., 2004), aunque la enfermedad puede manifestarse años después de la infección (Slappendel, 1988). Las lesiones son consecuencia de la reacción inflamatoria ocasionada por la presencia del parásito en los distintos tejidos del hospedador como piel, huesos, mucosas, ojos o en órganos como bazo, hígado o riñones, siendo característico el depósito de inmunocomplejos en diferentes regiones anatómicas (revisado por Alvar y col., 2004). Los síntomas generales iniciales más frecuentes son pérdida de peso acompañada de astenia y apatía. En la mayoría de los casos se observa linfadenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia durante el periodo de patencia. Las lesiones dérmicas son la manifestación clínica más común de la enfermedad (Slappendel, 1988; Ciaramella y col., 1997), pudiendo observarse frecuentemente dermatitis exfoliativa no pruriginosa, alopecias, dermatitis ulcerativas, hiperqueratosis nasal y onicogriposis entre otras afecciones (Saridomichelakis y Koutinas, 2014). Los problemas oculares como blefaritis, uveítis anterior y queratoconjuntivitis también pueden aparecer. En ocasiones, cojeras, epistaxis, atrofia muscular y problemas neuronales o vasculares pueden ser observados (Figura 6). El fallo renal crónico es el resultado de la progresión de la enfermedad, y es la principal causa de mortalidad de la leishmaniasis canina (Costa y col., 2003; Clementi y col., 2011; Solano-Gallego y col., 2011).



Figura 6. Algunas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina. (A) Hiperqueratosis nasal; (B) epistaxis; (C) uveítis bilateral y opacidad corneal; (D) dermatitis exfoliativa difusa; (E) caquexia. Imágenes de Saridomichelakis y Koutinas, 2013 (A, D); y de Solano-Gallego y col., 2011 (B, C, E).

1.1.4.- Tratamiento.

En la actualidad, el tratamiento de la leishmaniasis se basa en estrategias de monoterapia o terapia combinada de diferentes fármacos (revisado por Alvar y col., 2006). Sin embargo, la aparición de resistencias, la toxicidad asociada a algunos de ellos y los fenómenos de recidivas hacen necesario la búsqueda de nuevos fármacos (Sundar, 2001; Singh y col., 2012). A continuación se describen los principios activos más empleados:

Los **antimoniales pentavalentes** fueron introducidos en 1945 para el tratamiento de la leishmaniasis y actualmente continúan siendo la primera línea terapéutica de elección (Baneth y Shaw, 2002). Existen dos formulaciones comerciales: el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimonio de meglumina (Glucantime®). Ambos compuestos se consideran similares en términos de eficacia y toxicidad (Chulay y col., 1988). El mecanismo de acción no se conoce con exactitud, pero se cree que su actividad es debida a la inhibición selectiva de enzimas implicadas en la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos, bloqueando la formación de ATP y GTP (Berman y col., 1987). Aunque estos fármacos presentan una eficacia elevada, su administración parenteral, duración de tratamiento y efectos adversos limitan su uso (Croft y Yardley, 2002).

La **anfotericina B** es un antibiótico poliénico que altera la permeabilización de la membrana del parásito por la interacción selectiva con el ergosterol (Ramos y col., 1996). La elevada nefrotoxicidad de la anfotericina B (Fungizona®) ha motivado el desarrollo de formulaciones liposomales (Ambisome®) que limitan sus efectos adversos y aumentan su eficacia (Sundar y col., 2010). Actualmente, el Ambisome® constituye el tratamiento de elección frente a la LV en humanos en regiones con resistencias a los antimoniales (Bern y col., 2006). Sin embargo, el elevado coste y la vía de administración i.v. dificultan su empleo en los países en desarrollo.

La **miltefosina** es un alquilfosfolípido que induce apoptosis en *Leishmania*. Se administra por vía oral y existen dos presentaciones comerciales: Impavido® (leishmaniasis humana) y Milteforan® (leishmaniasis canina). Entre sus limitaciones destacan la elevada vida media, que puede favorecer la aparición de resistencias, así como los efectos teratógenos observados en el modelo de ratón (Sundar y Olliaro, 2007).

El **alopurinol** es un fármaco leishmanioestático de administración oral que se comercializa con el nombre de Zyloric®. Su administración combinada con el antimonio de meglumina se considera la terapia más eficaz contra la leishmaniasis canina (Baneth y Shaw, 2002).

Otros fármacos empleados como **segunda línea terapéutica** son la pentamidina y la paromomicina. Además se han descrito diferentes principios activos con efectos leishmanicidas o leishmanioestáticos como la sitamiquina, domperidona y derivados del imidazol (Baneth y Shaw, 2002).

1.2.- PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE *LEISHMANIA*.

1.2.1.- Morfología y ultraestructura.

A nivel morfológico, *Leishmania* presenta dos estadios claramente diferenciados: el promastigote y el amastigote. El promastigote es fusiforme (5-20µm) y tiene un flagelo que emerge del cuerpo celular, mientras que el amastigote es esférico (6-8µm) y carece de flagelo emergente. En ambos estadios se observan una serie de estructuras que los caracterizan (Figura 7).

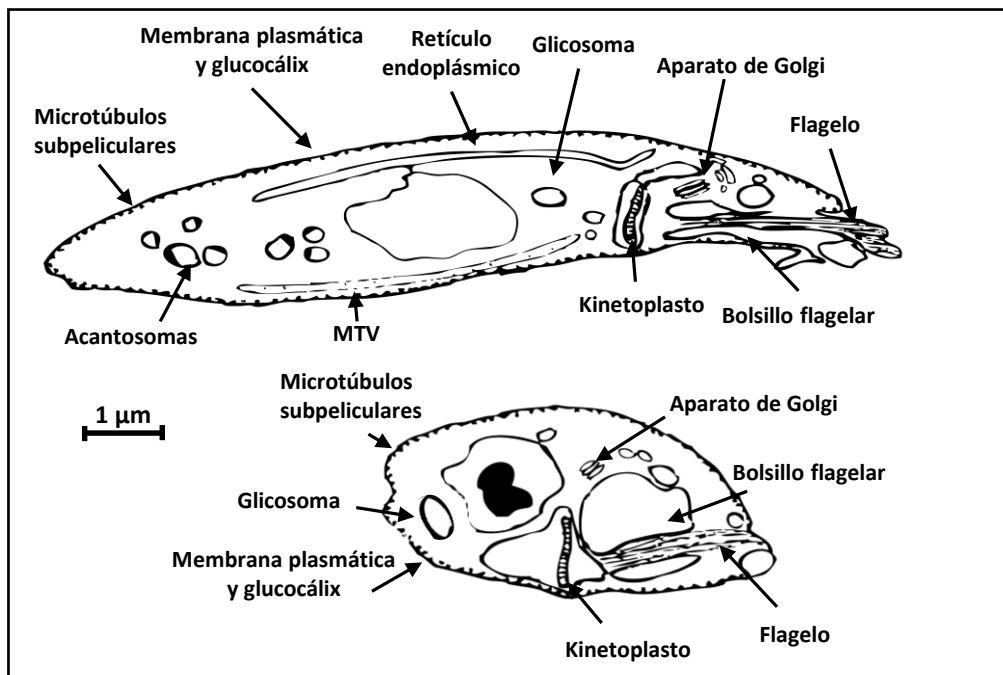


Figura 7. Morfología y ultraestructura del promastigote y el amastigote de *Leishmania*. MVT, túbulo multivesicular. Adaptado de Handman y col., 2008.

La zona externa de la membrana plasmática está tapizada por un glucocálix que es fundamental para la supervivencia del parásito. Las moléculas que componen esta cubierta se anclan a la membrana a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Entre los principales glicoconjugados de superficie se encuentran el lipofosfoglicano (LPG), el proteofosfoglicano (PPG) y la glicoproteína de superficie gp63 o leishmanolisina (Ilg, 2001; Sacks y Kamhawi, 2001). El LPG es el componente más abundante del glucocálix de los promastigotes y juega un papel esencial en el anclaje del parásito al tracto digestivo del flebotomo. Además, el LPG es considerado el principal factor determinante de la competencia del vector entre las especies de *Leishmania*, mostrando un polimorfismo estructural intra- e inter-específico (Sacks, 2001). La superficie de los amastigotes presenta una menor abundancia de LPG y en su lugar, hay una gran cantidad de GPI libre y de glicoesfingolípidos adquiridos de la vacuola parasitófora de la célula hospedadora (Turco y Sacks, 1991; Winter y col., 1994).

En ambos estadíos, la membrana plasmática se invagina en una bolsa que aloja el flagelo y se denominada bolsillo flagelar. Este área presenta una mayor concentración de moléculas propias del glicocálix y está relacionada con los procesos de endocitosis y exocitosis celular (Gluezn y col., 2010). Por debajo de la membrana plasmática se encuentra una red de microtúbulos subpeliculares dispuestos en espiral (Hou y col., 1992). Esta red confiere una morfología relativamente estable y cierto movimiento contráctil, extendiéndose por todo el cuerpo celular con excepción del bolsillo flagelar.

Leishmania presenta una única mitocondria o kinetoplasto que contiene el ADN mitocondrial (ADNk). Dicho material genético se localiza próximo al cuerpo basal del flagelo y está compuesto por una red concatenada de aproximadamente 50 maxicírculos (20-40 kb) y miles de minicírculos (0,8-1,6 kb). Los maxicírculos son análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores y codifican principalmente para ARNr y diferentes subunidades de la cadena respiratoria. Por su parte, los minicírculos codifican los ARN guía (ARNg), los cuales participan en un proceso de edición del ARNm de algunos genes mitocondriales mediante la inserción o delección de uracilos (Brennicke y col., 1999). Además, *Leishmania* presenta otros orgánulos específicos como el glicosoma y el megasoma. El glicosoma es un compartimento único en los tripanosomátidos que guarda semejanza con los peroxisomas. En él tienen lugar la mayor parte de las etapas del metabolismo de los glúcidos (Opperdoes y Michels, 1993). El megasoma es un orgánulo lisosomal muy voluminoso que contiene entre otras enzimas, una alta proporción de cisteín-proteasas asociadas a la capacidad invasiva de los amastigotes (McKerrow y col., 1993). Los acantosomas constituyen otro tipo de vacuolas asociadas al almacenamiento, ya que contienen reservas de polifosfato, calcio, sodio, zinc y magnesio (Docampo y Moreno, 1999). Además de los lisosomas convencionales, los parásitos del género *Leishmania* poseen el túbulo multivesicular (MVT), un lisosoma relacionado con la degradación de algunas proteínas del retículo endoplásmico y que se extiende a lo largo del cuerpo celular (Mullin y col., 2001).

1.2.2.- Cultivo *in vitro*.

Dada la dificultad que conlleva el estudio de los promastigotes en el tracto digestivo del vector, fueron desarrollados en las décadas de los años 1960 y 1970 medios de cultivo axénico para su estudio *in vitro* (Neal y Miles, 1963; Lemma y Schiller, 1964; Steiger y Steiger, 1977; Berens y Marr, 1978). Los medios de cultivo empleados son indefinidos, ya que contienen sangre o suero que aportan nutrientes para el desarrollo del parásito. Los promastigotes son incubados generalmente a temperaturas de entre 26-27°C imitando las condiciones del tracto digestivo del vector y son mantenidos en cultivo mediante pases sucesivos cada 7-10 días aproximadamente. Los cultivos axénicos son estables, consistentes y por lo tanto útiles para el estudio de diferentes aspectos de la biología del parásito. Sin embargo, el pase de los promastigotes en cultivo *in vitro* da lugar a la atenuación de su virulencia e infectividad. Este efecto es revertido mediante la infección de animales de laboratorio con los promastigotes axénicos de manera periódica (revisado por Zilberstein, 2008).

Introducción

El proceso de metacicloogénesis que tiene lugar en el tracto digestivo del vector se puede mimetizar mediante cultivo *in vitro* (da Silva y Sacks, 1987; Winter y col., 1994). El aislamiento de promastigotes metacíclicos de *L. major* y *L. infantum* se lleva a cabo a partir de cultivos en fase estacionaria por selección negativa con una lectina, la aglutinina de cacahuete (*Arachys hypogaea*, PNA) (Spath y Beverley, 2001; Alcolea y col., 2009). Los promastigotes procíclicos son aglutinados por centrifugación diferencial (PNA⁺) porque la lectina se une a los residuos de D-galactosa del LPG. Sin embargo, estos residuos están bloqueados por D-arabinosa en los promastigotes metacíclicos, perdiendo su capacidad aglutinante (PNA⁻) (Sacks y col., 1985; Spath y Beverley, 2001).

Por otro lado, el cultivo *in vitro* de promastigotes a temperaturas elevadas (37°C) y pH ácido (5,5) induce su diferenciación a amastigotes (Bates, 1993; Zilberstein y Shapira, 1994; Alcolea y col., 2010b). Este hecho ha permitido el desarrollo de diferentes protocolos para el cultivo *in vitro* de amastigotes axénicos (Bates, 1993; Debrabant y col., 2004). Sin embargo, debido a diferencias en los perfiles de expresión génica (Holzer y col., 2006; Rochette y col., 2009; Alcolea y col., 2010a; Alcolea y col., 2010b; Alcolea y col., 2014), los amastigotes axénicos no se consideran equivalentes a los amastigotes intracelulares obtenidos de macrófagos mamíferos, pese a poseer tasas de infección similares en modelos experimentales (Debrabant y col., 2004).

1.2.3.- Metabolismo.

Las principales fuentes de energía empleadas por *Leishmania* varían a lo largo de su ciclo biológico, ya que el parásito debe adaptarse a la disponibilidad de nutrientes asociada a los distintos hospedadores.

La glucólisis representa una ruta esencial para la obtención de energía en los promastigotes, aunque las enzimas implicadas en el proceso se expresan en todos los estadios (revisado por Opperdoes y Coombs, 2007; Rosenzweig y col., 2008b). La ruta de las pentosas fosfato también está activa en *Leishmania*, constituyendo la principal fuente de NADPH para el metabolismo anabólico y protección frente al estrés oxidativo. Además, esta ruta proporciona precursores necesarios para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (revisado por McConville y col., 2008). Ambas vías están estrechamente relacionadas y la mayoría de sus enzimas están compartimentalizadas en el glicosoma, el principal orgánulo del metabolismo de carbohidratos en tripanosomátidos. Además, disacáridos como la sacarosa pueden ser catabolizados y utilizados como fuente de carbono por el promastigote (revisado por McConville y col., 2008).

La actividad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos está incrementada en el estadio amastigote (Rosenzweig y col., 2008b), probablemente debido a la menor disponibilidad de glucosa y a la exposición a elevados niveles de lípidos y aminoácidos. Asimismo, las enzimas implicadas en la beta-oxidación de los ácidos grasos están sobre-expresadas en amastigotes (Rosenzweig y col., 2008b). Este proceso catabólico puede ser llevado a cabo tanto en la mitocondria como en el glicosoma, aunque la mayoría de los genes codifican para péptidos señal mitocondriales (revisado por McConville y col., 2008). En ausencia de

glúcidos, *Leishmania* puede emplear los aminoácidos como fuente principal de energía. Los estudios sobre el metabolismo de *Leishmania* spp. sugieren que la captación de aminoácidos y su catabolismo son importantes en la proliferación de los amastigotes en los fagolisosomas. La mayor parte de los aminoácidos pueden ser catabolizados en todos los estadios de *Leishmania* spp., con excepción del triptófano, lisina e histidina; mientras que la capacidad biosintética de aminoácidos de *Leishmania* se asemeja a la de los metazoos (revisado por McConville y col., 2008).

En los tripanosomátidos, la biosíntesis de ácidos grasos se lleva a cabo por dos vías: el sistema sintasa tipo II (FAS II) y el sistema de elongación de ácidos grasos (FAE). El sistema FAS II se localiza en la mitocondria y está compuesto por múltiples enzimas: una sintasa, una deshidratasa y dos reductasas. Entre los componentes mejor caracterizados del sistema FAE destacan 4 elongasas presentes en la membrana del RE de *Trypanosoma brucei*. A diferencia de lo que ocurre en otros organismos, ambas rutas pueden dar lugar a la síntesis de ácidos grasos *de novo* (revisado por Ramakrishnan y col., 2013). La síntesis de esfingolípidos *de novo* se realiza a partir de la enzima serina palmitoiltransferasa, específica del estadio promastigote, mientras que en amastigotes los esfingolípidos deben ser obtenidos a partir del hospedador mamífero. Por su parte, la síntesis de isoprenoides y esteroides se realiza en el glicosoma. A diferencia de lo que sucede en mamíferos, en *Leishmania* predominan esteroides como el ergosterol y sus derivados (revisado por McConville y col., 2008).

En lo que se refiere a los ácidos nucleicos, *Leishmania* no es capaz de sintetizar las purinas *de novo* aunque sí las pirimidinas. Las bases de purina internalizadas por el parásito son convertidas en sus respectivos nucleótidos por la acción de tres fosforribosil transferasas (PRT). En *L. major*, la adenina-PRT se localiza en el citosol mientras que la hipoxantina-guanina-PTR (HGPRT) y la xantina-PTR se localizan en el glicosoma (Zarella-Boitz y col., 2004). Asimismo, *Leishmania* es un organismo auxótrofo para diversas vitaminas y cofactores como las bipterinas y folatos, que deben ser obtenidos a partir del hospedador mediante transportadores específicos. En el interior del parásito, los folatos son reducidos por la enzima bifuncional dihidrofolato reductasa-timidina sintasa (DHFR-TS) mientras que la pteridina reductasa 1 (PTR1) actúa sobre los folatos y las pteridinas no conjugadas (revisado de Vickers y Beverley, 2011). Además, *Leishmania* requiere la captación exógena del grupo hemo, puesto que carece de las dos primeras enzimas implicadas en su ruta biosintética (revisado por Flannery y col., 2013). El hierro también puede ser obtenido del medio extra-celular a través del transportador LIT1 tras la acción previa de la enzima reductasa férrica (LFR-1) (Flannery y col., 2011).

Por otro lado, los tripanosomátidos son capaces de sintetizar cuatro tioles de bajo peso molecular: glutatión, glutationilpermidina, tripanotión y ovotiol A. Estas moléculas constituyen un sistema tiol-redox único, donde el tripanotión representa el principal elemento portador de grupos tiol para la protección celular frente al estrés oxidativo y químico (revisado por Krauth-Siegel y col., 2003).

1.3.- ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

1.3.1.- Estructura genómica.

Los genomas de los tripanosomátidos son diploides. En *Leishmania*, las especies del Viejo Mundo (*L. major* y *L. infantum*) presentan 36 pares de cromosomas, mientras que las especies del Nuevo Mundo tienen 35 (*L.(V.) braziliensis*) ó 34 pares de cromosomas (*L. mexicana* y *L. amazonensis*).

En la última década se ha llevado a cabo la secuenciación genómica de diferentes kinetoplastidos como *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. Entre las especies de *Trypanosoma* más estudiadas destacan *T. cruzi* y *T. brucei*, agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis africana, respectivamente. En el caso de *Leishmania*, *L. major* fue la primera especie secuenciada y ha sido empleada como referencia en estudios genómicos sobre tripanosomátidos (Ivens y col., 2005). Aunque el genoma de las diferentes especies de *Leishmania* ha sido secuenciado, los estudios de genómica comparativa se han centrado en el análisis de tres especies fundamentalmente: *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* (Peacock y col., 2007; Smith y col., 2007). A pesar de la divergencia geográfica y evolutiva de dichas especies, se observan pequeñas variaciones a nivel de organización genómica y secuencia. Los genomas presentan un tamaño medio aproximado de 33 Mpb y se ha predicho la existencia de unos 8.300 genes codificantes de proteínas y 900 genes de ARN. Sólo el 35% de las proteínas estimadas presentan una función biológica conocida, atribuida en base a ensayos experimentales (3,7%) y análisis de secuencias (31,5%) (revisado por Myler, 2008). A pesar de la divergencia entre los géneros de *Leishmania* hace 20-100 millones de años, las tres especies analizadas presentan una sintenia superior al 99%. De los ~8.300 genes, sólo ~200 han sido identificados como diferencialmente distribuidos entre los tres genomas. *L. braziliensis* posee 47 genes que están ausentes en las otras especies, y *L. infantum* y *L. major* presentan 27 y 5 genes característicos, respectivamente (Ivens y col., 2005; Peacock y col., 2007; Smith y col., 2007). Por tanto, esto sugiere que sólo unos pocos genes específicos de especie podrían contribuir en la patogenia y el tropismo celular.

El análisis comparativo de *L. major* con *T. cruzi* y *T. brucei* ha revelado la presencia de un núcleo conservado de 6.200 genes codificantes de proteínas con un elevado nivel de sintenia (El-Sayed y col., 2005). Sin embargo, aproximadamente 1.000 genes están presentes de manera exclusiva en el género *Leishmania*. Estos genes muestran una distribución genómica aleatoria y la mayoría son de función desconocida (revisado por Myler, 2008; Papadopoulou y col., 2008).

1.3.2.- Regulación de la expresión génica en el nivel transcripcional.

El proceso de transcripción en los tripanosomátidos presenta grandes diferencias respecto a la mayoría de los organismos eucariotas y se caracteriza por la presencia de unas estructuras únicas que permiten llevar a cabo una regulación de la expresión génica principalmente a nivel post-transcripcional.

Los genes están organizados en largas unidades policistrónicas que son transcritas como ARNm precursor (Martinez-Calvillo y col., 2010). El procesamiento de los transcritos policistrónicos en unidades monocistrónicas implica dos reacciones mecánicamente acopladas: el corte y empalme en *trans* o *trans-splicing* y la poliadenilación (revisado por Liang y col., 2003a). El *trans-splicing* consiste en la adición de un mini-exón de ARN o *spliced leader* (SL), con un tamaño de 39 a 41 nucleótidos, en el extremo 5' del ARNm a través de una reacción de *trans*-esterificación. Esta reacción se produce en dos etapas, dando lugar a un intermediario en forma de Y, lo que difiere de la reacción de *cis-splicing*. El proceso de *trans-splicing* es dirigido por una región polipirimidínica rica en uracilos que precede al aceptor del SL, un dinucleótido AG-3' que se localiza entre 50 a 100 pb antes del sitio de inicio de la traducción. La eficiencia del *trans-splicing* depende de la longitud y composición de la región polipirimidínica así como de las secuencias presentes en las regiones no traducidas en 5' (UTR-5') (Figura 8) (revisado por Liang y col., 2003a). La señal que determina la poliadenilación en el extremo 3' se encuentra entre 100 y 300 nucleótidos antes de la señal de empalme en *trans* del siguiente gen. Por tanto, la disposición de genes en tándem permite un procesamiento coordinado de los genes adyacentes, puesto que una deficiencia en el *trans-splicing* dará lugar a una poliadenilación aberrante en el gen localizado anteriormente. Sin embargo, una cuarta parte de los ARNm pueden ser procesados de manera independiente. Esto es posible en regiones donde la poliadenilación está dirigida por señales de *trans-splicing* que no preceden a marcos abiertos de lectura (revisado por Clayton y Shapira, 2007; Martinez-Calvillo y col., 2010).

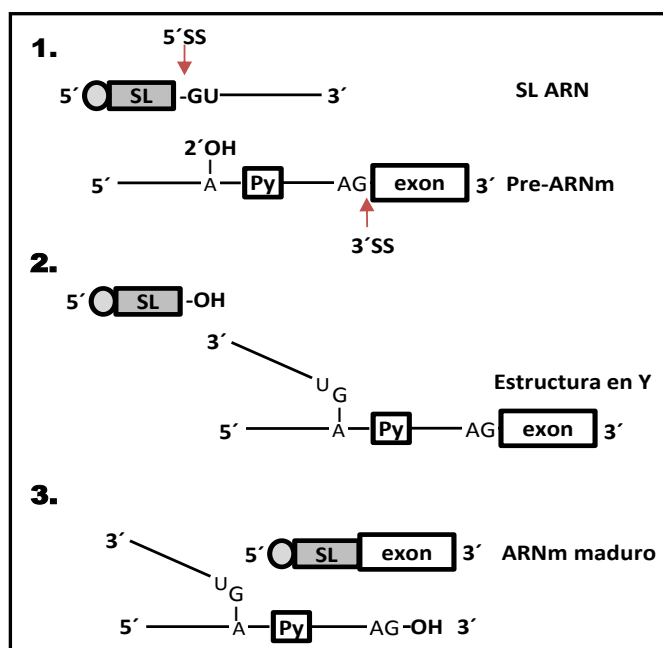


Figura 8. Mecanismo de *trans-splicing* descrito en tripanosomátidos. 1. Se indican el sitio de corte GU 5' (5'SS) en el *spliced leader* (SL ARN) y el sitio de corte AG 3' (3'SS) en el ARNm precursor (Pre-ARNm). 2. Reacción de transesterificación: formación del Intermediario en Y. 3. ARNm maduro. PY, región polipirimidínica. Adaptado de Lian y col., 2003.

Introducción

Al igual que en otros organismos eucariotas, han sido identificadas tres tipos de ARN polimerasas (ARN pol). La ARN pol I transcribe el ARNr, y excepcionalmente genes estructurales en *T. brucei*, como la glicoproteína variable de superficie (VSG) y las prociclinas ácidas (PARPS). La ARN pol II dirige la transcripción de genes codificantes de proteínas; y la ARN pol III transcribe el ARNr 5S y ARNt (Martinez-Calvillo y col., 2010). Sin embargo, aún no ha sido identificado en tripanosomátidos ningún promotor ARN pol II canónico que dirija el inicio de la transcripción, con excepción de los genes codificantes del SL-ARN (Gilinger y Bellofatto, 2001). Por tanto, en ausencia de promotor definido, las unidades policistrónicas son transcritas constitutivamente y están compuestas por decenas a centenas de genes codificantes de proteínas, generalmente sin función conexas. A diferencia de otros organismos eucariotas, las regiones codificantes de proteínas no están interrumpidas por intrones, con alguna excepción como el gen precursor de la poli A polimerasa en *L. major* (revisado por Myler, 2008). Estas regiones pueden llegar a tener un tamaño de ~1.259 kb y están separadas por regiones de cambio de hebra o *strand switch regions* (SSR) con un tamaño de 0,9 a 14 kb (Myler y col., 2000; Martinez-Calvillo y col., 2004). Evidencias experimentales sugieren que la transcripción policistrónica se inicia bidireccionalmente entre las regiones de cambio de hebra, en sentido divergente, hacia los telómeros (Martinez-Calvillo y col., 2003) o convergente, desde los telómeros (Martinez-Calvillo y col., 2004); y están separadas frecuentemente por genes codificantes de ARNt, ARNr o ARNsn (revisado en Myler, 2008).

1.3.3.- Regulación de la expresión génica en el nivel post-transcripcional.

A pesar de que las unidades policistrónicas son transcritas constitutivamente, es posible encontrar distintos niveles de expresión de ARNm a lo largo del ciclo biológico de los tripanosomátidos. En ausencia de un promotor definido, la regulación de la expresión génica es llevada a cabo fundamentalmente a nivel post-transcripcional a través del procesamiento y estabilidad del transcrito, así como a través de la eficiencia de la traducción y la estabilidad de la proteína. Los elementos en *cis* presentes en las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, así como los factores de interacción en *trans* con las regiones no codificantes, desempeñan un papel esencial en estos mecanismos de control (revisado por Clayton y Shapira, 2007; Keene, 2007).

1.3.3.1.- Procesamiento del ARNm.

En los organismos eucariotas, la estabilización del ARNm se lleva a cabo mediante la adición de la proteína de unión a poli A (PABP) en el extremo 3' y por el complejo de unión a la caperuza (CBC) en el extremo 5'. En tripanosomátidos, se han identificado proteínas homólogas a las principales enzimas implicadas en la degradación del ARNm de levaduras y mamíferos, siendo descritas dos rutas de degradación: la ruta constitutiva y la ruta regulada. En la ruta constitutiva, el ARNm es deadenilado por enzimas de los complejos PAN2/PAN3 y CAF1/NOT, seguido por el proceso de degradación de la caperuza o *decapping*. Aunque la actividad de deadenilación y *decapping* ha sido demostrada en

extractos de *Trypanosoma* spp. (Milone y col., 2002), las enzimas implicadas en dichos procesos no han sido identificadas (revisado por Clayton y Shapira, 2007). La acción posterior de nucleasas en sentido 5'-3' o del exosoma en sentido 3'-5', median la degradación final del ARNm. La ruta regulada o ruta de degradación rápida, probablemente está implicada en el control del ARNm de vida corta que es expresado en un estadio específico del parásito. Esta ruta se desencadena por secuencias presentes en las regiones 3'-UTR, las cuales permiten la interacción con proteínas específicas que reclutan la maquinaria de degradación. La ruta regulada parece ser independiente de la deadenilación e implica enzimas de eliminación de la caperuza y actividad exonucleasa en sentido 5'-3' por proteínas como XRNA, ortóloga de XRN1 en eucariotas (Haile y Papadopoulou, 2007) (Figura 9).

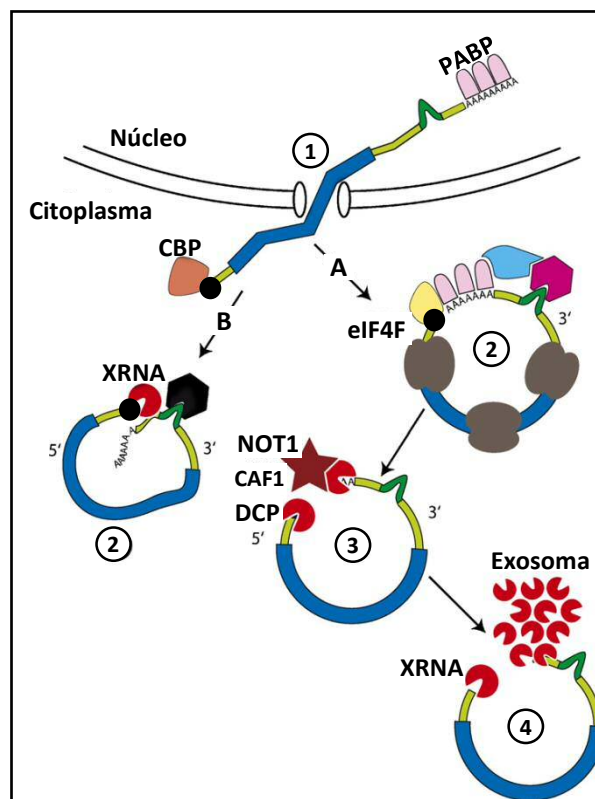


Figura 9. Destino del ARNm en tripanosomátidos. Se representa el marco abierto de lectura (azul), las regiones 5' y 3' UTR (verde claro), y la caperuza (esfera negra). 1) Salida del ARNm del núcleo unido al complejo de unión a la caperuza (CBP) y la proteína de unión a poli A (PABP). (A) **Ruta constitutiva:** 2-A) Tras una ronda de traducción, el factor eIF4E se une a la caperuza promoviendo la interacción posterior con eIF4G para constituir el complejo eIF4F. Este complejo interactúa con PABP estabilizando el ARNm. La traducción se ve favorecida por la unión de proteínas adicionales (rosa y azul turquesa). 3-A) El ARNm puede ser deadenilado por el complejo CAF1/NOT, seguido por el proceso de *decapping* en el que participan las proteínas DCP (rojo). 4-A) El ARNm es degradado por el exosoma y XRNA. (B) **Ruta regulada:** 2-B) El ARNm puede ser atacado por enzimas de *decapping* y XRNA. Este proceso es promovido por la interacción de las secuencias presentes en la región 3' UTR (horquilla verde oscuro) con proteínas específicas (hexágono negro). Adaptado de Clayton y Shapira., 2007.

Introducción

Los elementos SIDER, derivados de retroposones extintos, han sido identificados en el genoma de diversas especies de *Leishmania* con una distribución uniforme y en relación con las regiones 3'-UTR. Ensayos experimentales han puesto de manifiesto que su presencia está asociada a un descenso en la estabilidad del transcrito. Por lo tanto, estos elementos podrían haber sido reciclados por *Leishmania* spp. como un mecanismo de regulación de la expresión génica post-transcripcional (Bringaud y col., 2007; Requena y col., 2008).

Algunos ARNm presentan elementos ricos en AU (AREs, *AU-rich elements*) en las regiones 3'-UTR. Estos elementos en *cis* pueden ser reconocidos por proteínas que estabilicen o desestabilicen el ARNm debido a la inhibición o promoción de la deadenilación; siendo en este último caso degradado el ARNm por la acción de enzimas en sentido 5'-3' ó 3'-5'. Hasta la fecha, pocos son los factores en *trans* descritos en tripanosomátidos. Aunque los estudios genómicos basados en dominios proteicos han evidenciado la existencia de proteínas de unión a ARN (RBP, *RNA binding proteins*), la mayoría continúan sin estar bien caracterizadas. Existen tres tipos principales de RBPs en tripanosomátidos implicadas en la regulación post-transcripcional de la expresión génica: proteínas con motivos de reconocimiento de ARN (RRM, *RNA-recognition motif*), proteínas con dominios de dedos de Zinc tipo CCCH y proteínas de la familia PUF (Pumilio y Factor de Unión 3-ferm) (revisado por Clayton y Shapira, 2007).

1.3.3.2.- Traducción.

La traducción es el último paso en el flujo de la información génica, y la regulación a este nivel permite una respuesta inmediata, reversible y un ajuste preciso de la abundancia de proteína. Este punto de control crítico favorece una respuesta adaptativa eficaz del parásito para hacer frente a los cambios fisiológicos y situaciones ambientales de estrés que tienen lugar durante el complejo ciclo biológico de *Leishmania* (revisado por Myler, 2008)

La regulación a nivel traduccional se ha descrito en algunos genes de *Leishmania*, como en el caso de las histonas (Soto y col., 2004), proteínas de choque térmico HSP70 y HSP83 (Larreta y col., 2004; Folgueira y col., 2005), las amastinas de superficie (McNicoll y col., 2005) y la proteína homóloga quinasa activada por el mitógeno LmxPK4 (Kuhn y Wiese, 2005). Las regiones 3'-UTR representan elementos esenciales para la regulación de la expresión de las mencionadas proteínas a nivel post-transcripcional.

Los estudios de expresión génica han revelado que sólo de un 0,2 a un 5% de los genes están diferencialmente expresados a nivel de ARNm entre los estadios de amastigote y promastigote (Akopyants y col., 2004; Cohen-Freue y col., 2007; Alcolea y col., 2010a); por tanto, la mayoría del genoma se expresa constitutivamente (Leifso y col., 2007). Por el contrario, los estudios proteómicos revelan que hasta un 18% de las proteínas de *Leishmania* se encuentran diferencialmente expresadas entre los distintos

estadios (Bente y col., 2003; McNicoll y col., 2006; Rosenzweig y col., 2008b; Alcolea y col., 2011). Además, los niveles de expresión de proteínas muestran una baja correlación con los niveles de ARNm (McNicoll y col., 2006; Cohen-Freue y col., 2007). Todas estas observaciones ponen de manifiesto la importancia del control traduccional y post-traduccional en la regulación de la expresión génica en estos parásitos.

1.3.3.3.- Modificaciones post-traduccionales.

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) tienen un efecto directo sobre la estabilidad, localización subcelular y actividad de las proteínas. Aunque existen muchos estudios sobre las variaciones cualitativas y cuantitativas de los perfiles de expresión génica en promastigotes y amastigotes, se sabe muy poco acerca del papel que desempeñan las MPT en el proceso de diferenciación de *Leishmania* (Bente y col., 2003; McNicoll y col., 2006; Rosenzweig y col., 2008b; Alcolea y col., 2011). El primer análisis sobre MPT se realizó en promastigotes de cultivo axénico de *L. donovani* (Rosenzweig y col., 2008a), en el que se registraron 26 acetilaciones, 20 metilaciones, 16 fosforilaciones y 13 glicosilaciones (Rosenzweig y col., 2008a). Dichas MPT se hallaron fundamentalmente durante la fase de diferenciación de promastigote a amastigote (Rosenzweig y col., 2008a), al igual que las variaciones en la abundancia de proteínas observadas en estudios previos (Rosenzweig y col., 2008b).

El avance en las estrategias de enriquecimiento de proteínas y péptidos fosforilados así como la instrumentalización de técnicas de espectrometría de masas, ha supuesto un avance en el mapeo a gran escala de los sitios de fosforilación en tripanosomátidos (Marchini y col., 2014). El primer análisis de fosfoproteómica fue llevado a cabo en promastigotes y amastigotes de *L. donovani* (Morales y col., 2008). Las fosfoproteínas identificadas estaban involucradas principalmente en procesos celulares como estrés, respuesta a choque térmico, abundancia de ARN/proteína, metabolismo y señalización celular (Morales y col., 2008). Un estudio posterior, determinó que un 38% de las fosfoproteínas identificadas estaban diferencialmente expresadas en los distintos estadios de *L. donovani*. Entre las fosfoproteínas detectadas en la forma amastigote se encuentran chaperonas de la familia HSP90 y HSP70, la proteína inducida por estrés ST1/HOP, la ciclofilina 40 y proteínas ortólogas a la enzima peptidil-prolil isomerasa de *L. infantum* LinJ.19.1560 (Morales y col., 2010). Más recientemente, en un estudio sobre la caracterización del fosfoproteoma de amastigotes axénicos de *L. donovani*, se identificó la presencia de 126 proteínas fosforiladas (Hem y col., 2010). La fosforilación se detectó principalmente en residuos de serina (86%), y en menor medida en residuos de treonina (12%) y tirosina (2%). Las proteínas fosforiladas identificadas estaban implicadas en funciones biológicas relacionadas con la abundancia de proteínas, respuesta a estrés y transducción de señales. Este último grupo estaba compuesto por proteína-quinasas y proteína-fosfatasa, destacando el papel de estas enzimas como moduladoras del estado de fosforilación proteico (Jesus y col., 2014).

Introducción

1.3.3.3.1.- Importancia de la fosforilación como mecanismo de regulación de las rutas de señalización celular en tripanosomátidos.

La fosforilación es una de las MPT más importantes en la regulación de los procesos celulares en los organismos vivos. En la célula, las proteína-quinasas y fosfatasa presentan un papel funcional antagónico, promoviendo la fosforilación o defosforilación de los residuos de serina, treonina y tirosina de las cadenas laterales de las proteínas, respectivamente. Esta modificación covalente puede inducir cambios conformacionales en las proteínas, modulando su actividad enzimática, estabilidad o localización subcelular. La fosforilación reversible de proteínas reguladoras permite la transducción de estímulos externos al interior de la célula a través de rutas de señalización. Así pues, la fosforilación es un mecanismo de regulación empleado para el control de diversos procesos como ciclo celular, motilidad, respuesta inmune, diferenciación celular, transcripción génica, traducción y metabolismo, entre otros (Cohen, 1989; Cyert y Thorner, 1989; Hershey, 1989; Tonks y Charbonneau, 1989; Alexander, 1990; Walsh y col., 1991).

Los tripanosomátidos presentan un ciclo biológico complejo con alternancia de dos hospedadores, donde los parásitos deben reconocer y adaptarse rápidamente a los distintos ambientes para poder sobrevivir. Sin embargo, las rutas de señalización celular implicadas en los procesos de diferenciación de estos parásitos, aún no han sido caracterizadas. La publicación de los genomas de diferentes tripanosomátidos ha permitido determinar el conjunto de proteína-quinasa (quinoma) y proteína-fosfatasa (fosfatoma) codificadas por estos organismos. De acuerdo al estudio comparativo de los quinomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, las proteínas quinasa representan un 2% del genoma (Parsons y col., 2005). Entre ellas, cabe destacar la ausencia de tirosina quinasa y tirosina quinasa de tipo receptor, así como dominios SH2 de interacción con fosfotirosinas. Además, algunos grupos están sobre-representados en comparación con el hombre, como es el caso de las MAP-quinasa (MAPK), las quinasa dependientes de ciclinas (Cdk) y las quinasa con especificidad dual. Otro grupo identificado son las proteínas quinasa únicas, las cuales constituyen del 12 al 15% del quinoma. Estas enzimas no se han incluido en ningún grupo previamente establecido debido a la ausencia de subdominios completos y residuos catalíticos (Parsons y col., 2005; Marchini y col., 2014).

Por otro lado, el análisis del fosfatoma también reveló diferencias en la distribución de las proteína-fosfatasa respecto a la observada en eucariotas. Las serina-treonina fosfatasa (STP) constituyen el grupo principal, representando el 65%, 66% y 69% del fosfatoma de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*, respectivamente (Brenchley y col., 2007). Por el contrario, las STP sólo suponen el 24% del fosfatoma humano (Marchini y col., 2014). Las fosfatasa con especificidad dual son el segundo mayor grupo descrito en tripanosomátidos, constituyendo el 24% del fosfatoma respecto al 31% observado en el hombre. Las tirosina-fosfatasa (PTP) representan únicamente el 2-3% del genoma de tripanosomátidos, en consonancia con la ausencia de tirosina-quinasa. Esta proporción de PTP difiere sustancialmente del 31% observado en el hombre (Brenchley y col., 2007; Marchini y col., 2014) (Figura 10).

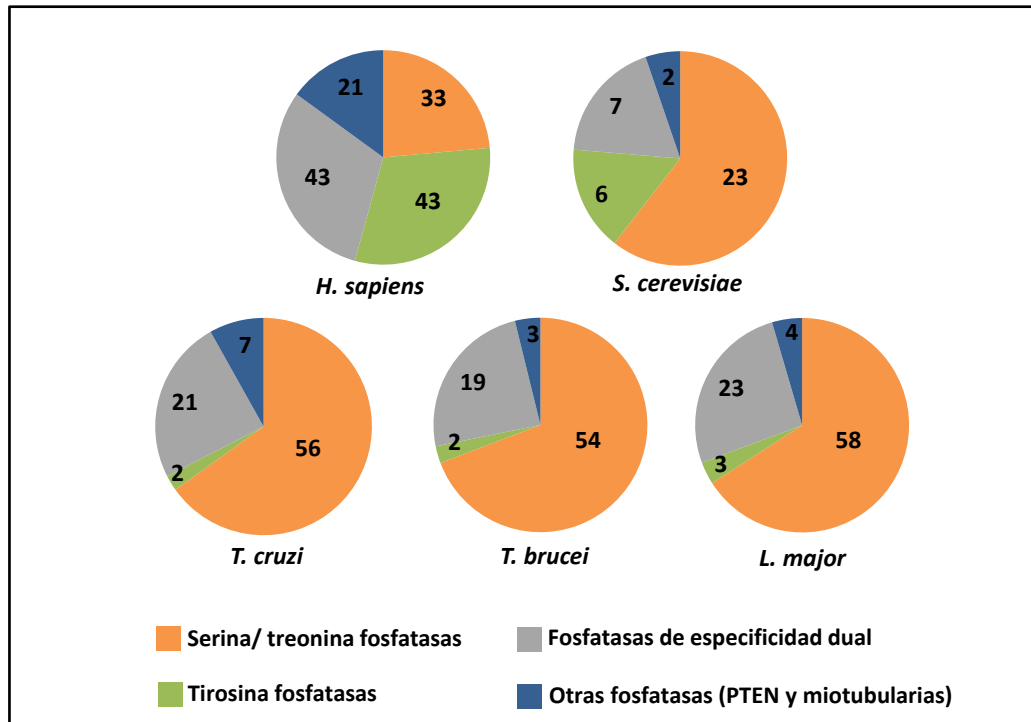


Figura 10. Número de fosfatasa presentes en diferentes organismos (fosfatoma). Se representa el fosfatoma de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* comparado con los de *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*. Adaptado de Brenchley, 2007.

La caracterización del quinoma y el fosfatoma de los tripanosomátidos pone en evidencia la importancia de la fosforilación como mecanismo de regulación en estos parásitos. Sin embargo, el reconocimiento preciso de los sitios de fosforilación, la identificación de sustratos, así como la integración de las proteína-quinasas y proteína-fosfatasa en rutas de señalización celular no pueden ser deducidos a partir del estudio de los genomas (Parsons y col., 2005; Brenchley y col., 2007). Este hecho hace necesario el desarrollo de ensayos funcionales para la caracterización de las rutas de señalización celular en tripanosomátidos.

1.4.- PROTEÍNA-FOSFATASAS.

Las proteína-fosfatasa son las enzimas responsables de eliminar los ésteres de fosfato presentes en proteínas fosforiladas. Un tercio de las proteínas de los organismos eucariotas son controladas por fosforilación en residuos de serina, treonina y/o tirosina. De acuerdo a su especificidad de sustrato las proteína-fosfatasa se pueden clasificar en dos sub-grupos: tirosina fosfatasa (PTP) y serina-treonina fosfatasa (STP).

Introducción

1.4.1.- Tirosina fosfatasas.

Las PTP se distribuyen en 4 grupos (I-IV) en base a su dominio catalítico y preferencia de sustrato (Moorhead y col., 2009) (Figura 11). Las fosfatasas de clase I constituyen el grupo principal de los organismos vertebrados y está formado por las PTP clásicas y las PTP de especificidad dual (DSP). Las PTP clásicas muestran actividad específica tirosina fosfatasa y se clasifican en los grupos tipo receptor o no receptor, dependiendo de la presencia o ausencia de dominios transmembrana, respectivamente. Las DSP forman el grupo de PTP más diverso, desfosforilando una gran variedad de sustratos además de los residuos de tirosina. Este grupo está compuesto por DSP de tipo eucariota que incluye fosfatasas PRL (*Phosphatases of Regenerating Liver*) y de la familia CDC14; DSP atípicas; *slingshots*, MAPK fosfatasas y dos grupos de fosfatasas capaces de desfosforilar fosfolípidos-PTEN y miotubularinas (MTM). Las fosfatasas de clase II incluyen las fosfatasas de bajo peso molecular (LMPTP), y las de clase III están compuestas por la familia CDC25. Estas últimas presentan actividad específica frente a tirosina y treonina. El cuarto grupo está formado por las tirosina fosfatasas EyA (*Eye Absent*) y la familia heterogénea de enzimas haloácido deshalogenasas (HAD), las cuales reconocen una amplia variedad de sustratos.

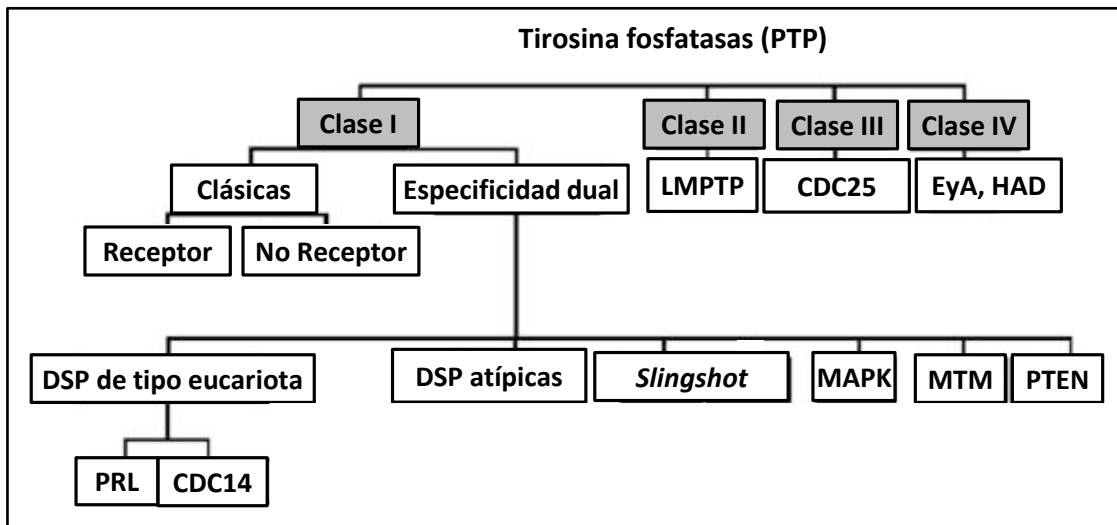


Figura 11. Clasificación de las tirosina-fosfatasas en organismos eucariotas. Adaptado de Szöör, 2010.

1.4.2.- Serina-treonina fosfatasas.

Las STP son las enzimas responsables de eliminar los residuos de serina y treonina de las proteínas, catalizando más del 90% de las reacciones de desfosforilación en las células eucariotas (Brautigan, 2013). En base a su homología de secuencia, dependencia de iones metálicos, mecanismo catalítico y sensibilidad a moléculas inhibitorias, las STP se clasifican en tres familias (Figura 12): fosfatasas de fosfoproteínas (PPP); fosfatasas de proteínas dependientes de metales (PPM) y fosfatasas basadas en aspartato con motivo DxDxT/V, representadas por las fosfatasas del dominio carboxilo terminal de la ARN pol II

(FCP/SCP) (revisado por Cohen, 1997). Estas familias se subdividen a su vez en varios grupos. Las PPP incluyen diferentes tipos de proteína-fosfatasa: PP1, PP2A, PP2B (PP3 o calcineurina), PP4, PP5, PP6 y PP7 y las PPP de tipo bacteria (*Shelps*, *Alphs*) (Barton y col., 1994; revisado por Cohen, 1997). Las PPM son proteínas dependientes de Mn^{2+}/Mg^{2+} y están representadas por las proteínas PP2C y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP).

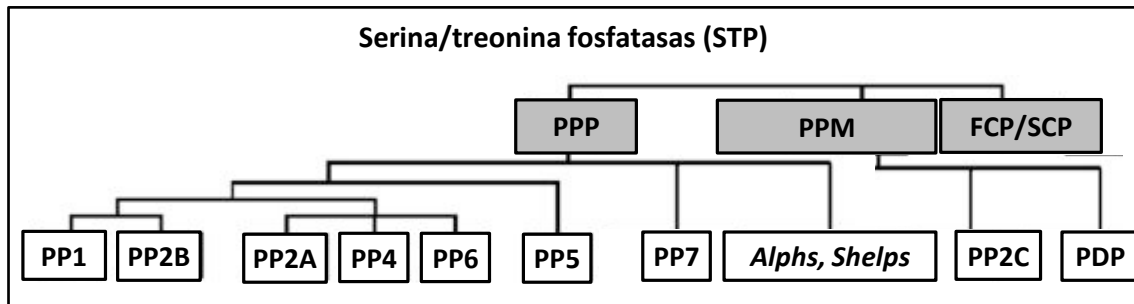


Figura 12. Clasificación de las serina-treonina fosfatasas en organismos eucariotas. Adaptado de Szöör, 2010.

Las familias PPP y PPM incluyen enzimas dependientes de metales con una estructura tridimensional similar. Sin embargo, los genes codificantes de dichas proteínas presentan una baja homología, y a diferencia de lo que ocurre en las PPM, la actividad de las PPP es dirigida por la interacción con subunidades reguladoras (Cohen, 2002; Hendrickx y col., 2009). Por su parte, las proteínas tipo FCP/SCP utilizan un mecanismo de catálisis basado en el aspartato y el único sustrato conocido es el dominio C-terminal (CTD) de la ARNpol II (Kamenski y col., 2004).

1.4.3.- Proteína-fosfatasas de tipo 1 (PP1).

Las PP1 son las proteína-fosfatasas más importantes en términos de diversidad de sustrato y se encargan de hidrolizar la mayoría de los ésteres de fosfato unidos a serina/treonina en las células eucariotas (revisado por Bollen y col., 2010). Cada PP1 funcional u holoenzima está compuesta por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora.

1.4.3.1.- Subunidad catalítica.

La subunidad catalítica de las PP1 representa una de las proteínas más conservadas en los organismos eucariotas, con una identidad de secuencia aproximada del 70% (Tabla 4) y un tamaño molecular medio de 35-38 kDa (Barton y col., 1994; Lin y col., 1999). Asimismo, los estudios de complementación en levaduras mediante proteínas PP1 de mamífero, reflejan la conservación funcional de estas enzimas (Gibbons y col., 2007).

Introducción

Tabla 4. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las PP1 de diferentes organismos. Se representan los porcentajes de identidad de distintos organismos dentro de los grupos: **plantas** (*Arabidopsis thaliana*, *Tobacco*, *Brassica oleracea*, *Medicago varua*, *Phaseolus vulgaris*, *Oryza sativa*, *Zea mays*); **algas** (*Acetabularia cliftonii*, *Gonyaulax polyedra*); **animales** (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Homo sapiens*); **hongos** (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *Emericella nidulans*) y **protistas** (*Paramecium tetraurelia*, *T. brucei*). Adaptado de Lin y col. 1999.

% Identidad	Plantas	Algas	Animales	Hongos	Protistas
Plantas	66,0-91,8	65,9-78,7	63,9-79,1	65,5-77,0	54,5-74,1
Algas		74,8-88,7	75,2-81,8	71,8-77,7	58,0-76,5
Animales			79,8-100	72,4-84,5	56,5-80,5
Hongos				76,3-89,8	55,4-77,9
Protistas					58,7-99,7

Los organismos eucariotas contienen de uno (*S. cerevisiae*) a ocho genes (*A. thaliana*) codificantes de PP1 (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004). El genoma de los mamíferos presenta tres genes precursores de 4 subunidades catalíticas que difieren en sus extremos N-terminal y C-terminal: PP1 α ; PP1 β/δ ; y dos subtipos de PP1 γ derivados de *splicing* alternativo, PP1 γ 1 y PP1 γ 2 (Barker y col., 1994). Dichas isoformas muestran similitud en su especificidad de sustrato y se expresan ubicuamente en los diferentes tejidos, con excepción de PP1 γ 2, cuya presencia destaca en la región testicular (da Cruz e Silva y col., 1995).

Estudios cristalográficos previos han permitido definir la estructura tridimensional de diferentes PP1 de mamífero (Egloff y col., 1995; Goldberg y col., 1995; Kelker y col., 2009). La subunidad catalítica está compuesta por 10 hélices α y 3 láminas β . En el centro de la molécula se observan 11 cadenas β organizadas en dos láminas β dispuestas en *β -sandwich*. Dicha estructura está rodeada por 7 hélices α en un lado (dominio hélice mayor) y un subdominio de 3 hélices α y una lámina β en el otro lado (dominio hélice menor) (Figura 13). En la zona central del *β -sandwich*, las 3 láminas β conectan con dos hélices α formando el motivo β - α - β - α - β , que representa el sitio activo de la enzima. La presencia de dos iones metálicos en el centro activo sugiere que esta enzima desfosforila los sustratos a través de una hidrólisis mediada por metales en un único paso (Shi, 2009). Los residuos del centro activo implicados en la coordinación con iones metálicos y la interacción con el sustrato se encuentran muy conservados en los organismos eucariotas (Barton y col., 1994). Por otro lado, el centro catalítico se sitúa en el punto de bifurcación de tres ranuras dispuestas en Y denominadas ranura COOH terminal, ranura ácida y ranura hidrofóbica (revisado por Shi, 2009) (Figura 13). Estudios de interacción con inhibidores de PP1 han puesto de manifiesto la importancia de la ranura hidrofóbica junto con un bucle formado

por la cadenas β 12 y β 13 en la regulación enzimática de las PP1 (Connor y col., 1999; Gibbons y col., 2005).

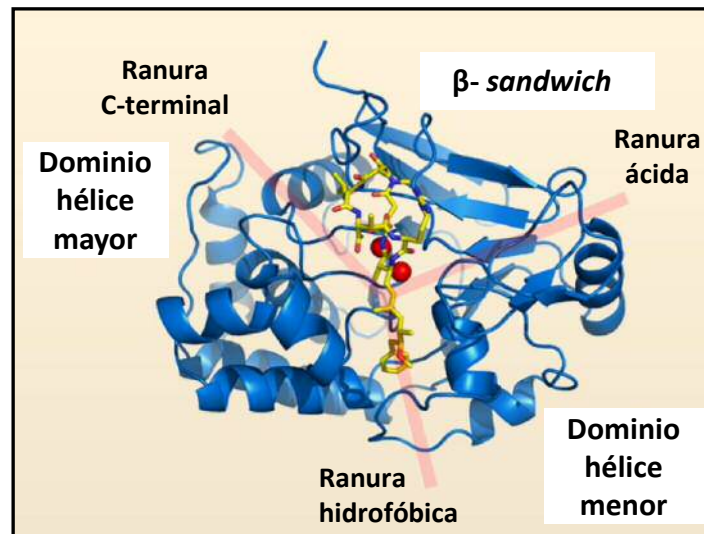


Figura 13. Estructura tridimensional de la subunidad catalítica PP1 del hombre. Se muestra en azul la subunidad catalítica de PP1 unida al ácido okadaico (amarillo) y en rojo la estructura en Y definida por las ranuras ácido, hidrofóbica y C-terminal. Las esferas rojas representan el centro metálico binuclear. Adaptado de Shi y col., 2009.

1.4.3.2.- Subunidad reguladora.

Las PP1 actúan de una manera muy específica y estrictamente regulada (revisado por Bollen y col., 2010). Esto se debe a la capacidad de las PP1 para formar complejos con un gran número de subunidades, las cuales controlan su localización, actividad y especificidad de sustrato. En los organismos vertebrados se han identificado cerca de 200 subunidades reguladoras o proteínas de interacción con PP1 (PIP) (revisado por Heroes y col., 2013). Estos complejos dan lugar a un conjunto diverso de holoenzimas con actividad dirigida a distintos sustratos y mecanismos de regulación propios. No obstante, en ciertos estudios bioinformáticos se ha estimado la existencia de cientos de PIP aún sin identificar (Hendrickx y col., 2009).

Este sistema de regulación combinatorio permite equilibrar el contraste observado en relación al número de STP (~25) y el de serina-treonina quinasas (~400) en las células eucariotas, lo que sugiere diferentes estrategias de diversificación enzimática durante la evolución (Ceulemans y col., 2002).

1.4.3.3.- Mecanismo de especificidad de PP1.

Aunque algunas PIP sólo interactúan con una isoforma de manera específica, la mayoría se unen a todas ellas (revisado por Heroes y col., 2013). La base de esta interacción la constituyen las ranuras de superficie de la subunidad catalítica y la presencia

Introducción

de motivos de unión en las PIP. Dichos motivos son degenerados y están compuestos por un número variable de residuos (4-8), determinando la afinidad por la subunidad catalítica. Por tanto, la especificidad de la unión entre las PIP y las PP1 está definida por la presencia de diferentes motivos en una combinación única así como la secuencia de los mismos (Bollen, 2001) (Figura 14).

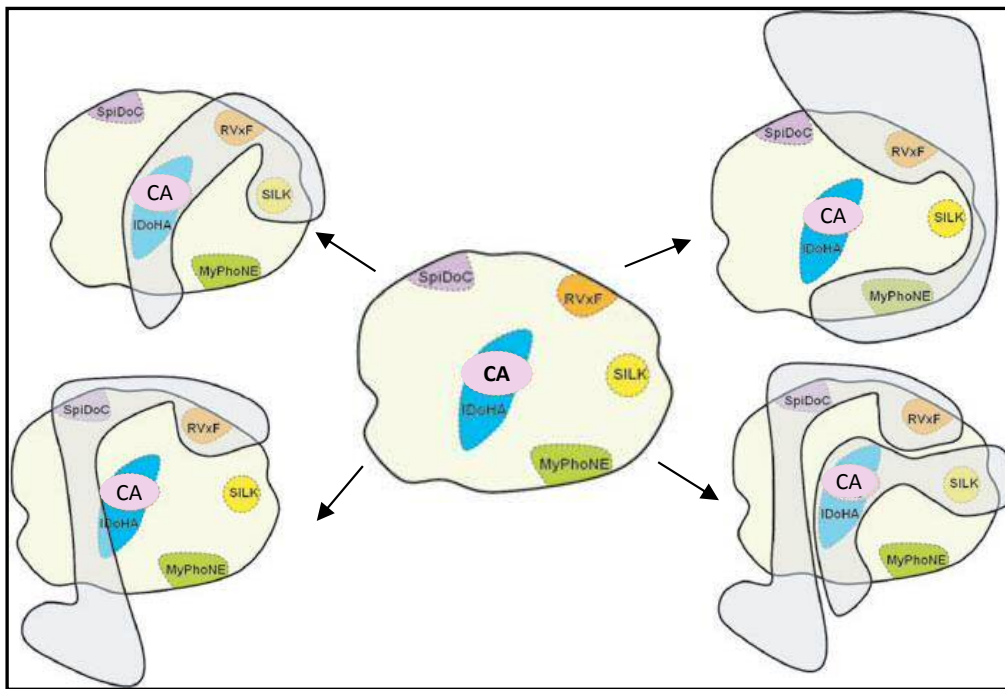


Figura 14. Representación esquemática del sistema de interacción de las PIP con las PP1. Se representan los principales motivos de unión a las PP1 observados en PIP (Tabla 5) CA: centro activo. Adaptado de Heroes, 2013.

Se han caracterizado funcionalmente diferentes motivos de unión a las PP1 (Tabla 5). Entre ellos, destaca principalmente RVxF, ya que ha sido detectado en el 90% de las PIP identificadas (revisado por Heroes y col., 2013). Este motivo está compuesto por la secuencia consenso $[RK]_{x_{0-1}}[VI]\{P\}[FW]$, donde x es cualquier residuo y $\{P\}$ representa todos los aminoácidos excepto prolina. La unión mediada por RVxF permite el anclaje del PIP a través de la ranura hidrofóbica de la subunidad catalítica sin inducir cambios en la conformación ni actividad enzimática. Sin embargo, esta interacción determina la especificidad de la enzima, induciendo la aproximación de otras PIP y promoviendo interacciones secundarias que pueden contribuir a la selección de la isoforma (Wakula y col., 2003).

Tabla 5. Motivos de unión a PP1 presentes en las PIP. Se describe una PIP y su función para cada motivo detallado. Adaptado de Heroes 2013.

Motivo	PIP	Función
RVxF	Subunidad G	Anclaje
SILK	Inhibidor 2	Selección de sustrato
MyPhoNE	MYpt1	Selección de sustrato
SpiDoC	Espinofilina	Inhibición
IDoHA	Inhibidor 2	No descrita
RNYF	iASPP	No descrita
Pseudosustrato	Inhibidor 1	Inhibición
AnKCap	Mypt1	Selección de sustrato

Algunas PIP actúan directamente como sustratos de las PP1 y su estado de fosforilación regula su función. Por el contrario, otras controlan la actividad de las PP1 actuando como subunidades de orientación de sustrato o inhibiendo su actividad. Además, ciertas PIP pueden comportarse al mismo tiempo como sustrato y reguladoras de la holoenzima (revisado por Bollen y col., 2010).

1.4.3.4.- Funciones de las PP1.

Las proteína-fosfatasas intervienen en la regulación de una gran variedad de procesos celulares. A continuación se detallan las principales funciones moleculares en las que participan las PP1 mediante la descripción de algunas interacciones con las subunidades reguladoras.

Transcripción.

Las PP1 son un elemento regulador clave de la transcripción. Las PIP más abundantes descritas a nivel nuclear son: PNUTS y NIPP1. Aunque hasta el momento el dominio CTD de la ARNpol II es el único sustrato endógeno confirmado para la holoenzima PNUTS: PP1, se sabe que PNUTS presenta una función de reparación del ADN y regulación de los factores de transcripción p53 y Rb (Allen y col., 1998). Por su parte, NIPP1 es un potente inhibidor de PP1 con distribución núcleo-citoplasmática. (revisado por Rebelo y col., 2015)

El factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding*) es otra PIP de localización nuclear. La desfosforilación de CREB por PP1 da lugar a una inhibición de la expresión génica dependiente del AMPc (Hagiwara y col., 1992). PP1 también se asocia a otros factores de transcripción nucleares como Hox 11, el factor celular hospedador C1 (HCF1) y el factor potenciador específico de miocito 2A (MEF2) (revisado por Rebelo y col., 2015). Asimismo, se ha identificado la proteína SARP (*Several Ankyrin Repeat Protein*) como una subunidad de interacción de PP1 en mamíferos. La presencia de cremalleras de leucina en la región C-terminal sugiere que esta proteína podría actuar como un factor de transcripción (Browne y col., 2007).

Introducción

PITK (*Phosphatase Interactor Targeting K*) es una subunidad de dirección de PP1 que media su interacción con el factor de transcripción denominado ribonucleoproteína nuclear heterogénea K (hnRNP K). La afinidad de PITK se ve afectada por la fosforilación de dos serinas próximas al motivo de unión de PP1. Por tanto, la actividad transcripcional de hnRNP K puede estar regulada por la actividad de las PP1 (Kwiek y col., 2006). Además, se ha descrito la asociación de PP1 con diferentes factores de empalme como PSF, p54nrb y SIPP1, entre otros (revisado por Rebelo y col., 2015).

Traducción.

En los eucariotas, la síntesis proteica está controlada por la fosforilación reversible de numerosos factores de iniciación y elongación de la transcripción. En este contexto, se ha descrito la importancia de la regulación del factor eIF2 α por las PP1. Este factor promueve la traducción de proteínas por reclutamiento de ARNt^{Met} y de subunidades ribosómicas en el sitio de inicio de la traducción. Sin embargo, en condiciones de estrés celular, la fosforilación del factor eIF2 α da lugar a la represión de la traducción y la expresión de diferentes genes. Entre ellos se encuentran la proteína GADD34 (*Growth Arrest and DNA-damage protein 34*). Cuando las condiciones de estrés disminuyen, la enzima PP1 interacciona con GADD34 para desfosforilar el factor eIF2 α y restaurar la tasa de síntesis celular (Connor y col., 2001; Novoa y col., 2001).

Por otro lado, se ha identificado la proteína S6 como un sustrato de las PP1. La fosforilación de S6 permite a la subunidad 40S formar el complejo de inicio de la traducción más eficientemente. Sin embargo, las PIP implicadas en el proceso son desconocidas. Se sabe que tanto el inhibidor PIPP1 como el activador L5 interaccionan con las PP1 y están asociados a la fracción ribosomal (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004)

Ciclo celular.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto una localización nuclear dinámica de las PP1, sugiriendo funciones específicas de isoformas (Andreassen y col., 1998; Trinkle-Mulcahy y col., 2003). A continuación, se detallan algunas funciones atribuidas a las PP1 durante la transición de la fase G1/S y G2/M, así como durante el proceso de mitosis.

Al final de la mitosis, las PP1 impiden la progresión a la fase S mediante la inactivación de la proteína del retinoblastoma Rb por desfosforilación. Esta proteína está implicada en el reclutamiento de factores estimuladores de la transición de la fase G1 a la S, y su activación requiere la inhibición de las PP1 por las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) (Liu y col., 1999).

Durante el periodo de transición entre las fases G2/M, las PP1 regulan la maduración del centrosoma por la activación de BRCA1. Además, se ha observado la unión de las PP1 con otras proteínas centrosomales como SFI1, Cep 192, Cep 170 y el inhibidor-3, lo que sugiere funciones adicionales de las PP1 sobre la duplicación, maduración o separación de centrosomas (revisado por Rebelo y col., 2015). Asimismo, las PP1 ejercen una regulación positiva en el inicio de la mitosis por la activación de Cdc25 y Cdk1, quinasas mitóticas esenciales para la división celular (revisado por Rebelo y col., 2015).

Al principio de la mitosis, las PP1 pueden prevenir la separación prematura de los centrosomas duplicados por inactivación de diferentes quinasas. Entre ellas destaca la proteína de interacción Aurora A, la cual presenta una actividad antagónica a PP1. Además, se han identificado otras PIP implicadas en la separación de centrosomas como el complejo trimérico formado por PP1, Neck2A y C-Nap1, así como la proteína PPP142 con repeticiones ricas en leucina descrita recientemente (revisado por Rebelo y col., 2015). Otra PIP relevante identificada durante el proceso de mitosis es la enzima LAP1, la cual constituye una proteína de la envoltura nuclear (Santos y col., 2014).

En *D. melanogaster* el proceso de ensamblaje del huso mitótico está regulado por la activación de la proteína de interacción Mars. Esta proteína actúa como una subunidad de orientación de las PP1 facilitando la desfosforilación de dTACC, un elemento estabilizador de los microtúbulos del centrosoma (Tan y col., 2008). Otras de las funciones atribuidas a PP1 son el mantenimiento de la unión del cinetocoro y microtúbulos, y el silenciamiento del punto de control del ensamblaje del huso mitótico. Entre las PIP que intervienen en dichos procesos se encuentran la quinasa Aurora B, la proteína del cinetocoro KNL1 y la proteína asociada al centrómero CENP-E (revisado por Rebelo y col., 2015).

Asimismo, las PP1 participan en la última etapa de la mitosis por regulación del desensamblaje del huso, descondensación de los cromosomas y reensamblaje de la envoltura nuclear. Se ha observado que el complejo PP1Y/*Repo-man* regula la orientación cromosómica de Aurora B y media la desfosforilación de la histona H3 al final de la mitosis. Dicha desfosforilación parece estar relacionada con la descondensación de los cromosomas en levaduras y nematodos (Hsu y col., 2000). Por otro lado, la interacción de PP1 *in vitro* con la subunidad de orientación AKAP-2 promueve la desfosforilación de la proteína lámina B, una enzima implicada en el reensamblaje de la envoltura nuclear (Steen y col., 2000). También se ha relacionado la actividad de las PP1 con el proceso de salida de la mitosis por desfosforilación de proteínas mitóticas, así como durante la citoquinesis, dada la presencia de PP1Y en el surco de segmentación y en el centro de la placa media (revisado por Rebelo y col., 2015).

Metabolismo.

En las células eucariotas, la presencia de bajos niveles de glucosa conducen a la activación de un complejo quinasa que estimula la importación de glucosa, gluconeogénesis, y el uso de fuentes de energía alternativa como ácidos grasos, etanol, glicerol, piruvato y lactato. En levaduras, este complejo enzimático denominado Snif1 está regulado por una PP1 compuesta por las subunidades Reg1 y Sip5 (Tu y Carlson, 1995). Dicha holoenzima inactiva Snif1 por desfosforilación cuando los niveles de glucosa son restablecidos, restaurando la glucosa como fuente principal de energía y reiniciando el metabolismo anabólico.

Además, la enzima PP1 representa un elemento esencial en la regulación de los niveles de glucógeno por desfosforilación y activación de la glucógeno sintasa (GS). Se han descrito al menos 7 subunidades de dirección de glucógeno. Cinco de ellas, G_M, G_L,

Introducción

R5/PTG, R6 y R3E, presentan el motivo de unión RVxF. Aunque el glucógeno es metabolizado por una vía común en los diferentes tejidos, la regulación y respuesta celular varía dependiendo de la subunidad reguladora. G_M , es la principal PIP presente en el músculo estriado, mientras que G_L y R3E son las subunidades mayoritarias expresadas en el hígado (Ceulemans y Bollen, 2004). Por su parte, el complejo R5/PTG se encuentra en diferentes tejidos. Cabe destacar que las proteínas R5/PTG y G_L descienden bajo condiciones deficientes de nutrientes (Browne y col., 2001).

Organización del citoesqueleto.

La organización y dinámica del citoesqueleto de actina está estrictamente regulado por fosforilación reversible, donde las PP1 juegan un papel fundamental. Se han descrito al menos dos familias de subunidades reguladoras: neurabinas y Mypts. Aunque estas proteínas pueden estar presentes en diferentes tipos celulares, las neurabinas y Mypts se hallan a niveles elevados en los tejidos neuronales y en el músculo esquelético, respectivamente (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004).

Regulación de transportadores.

Se ha descrito la implicación de PP1 en la regulación de diferentes receptores, canales y bombas iónicas. Entre ellos caben destacar dos receptores del RE de liberación de calcio, rianodina (RyRs) y el receptor inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3Rs); los receptores ionotrópicos de glutamato NMDA y AMPA; y los receptores de crecimiento transformante beta tipo I y II ($TGF\beta R-I$ y $TGF\beta R-II$) (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004).

1.4.4.- PP1 en tripanosomátidos.

Aunque la actividad fosfatasa se detectó en *T. brucei* hace más de un cuarto de siglo (Walter y Opperdoes, 1982), se sabe muy poco acerca del papel fisiológico que desempeñan las PP1 en los tripanosomátidos.

En la década de los 90, se caracterizaron dos PP1 de *T. brucei* denominadas PP1A y PP1B. A pesar de la temprana divergencia de los kinetoplastos, los análisis de secuencia revelaron una elevada homología de las PP1 de *T. brucei* (66%) respecto a la subunidad catalítica de las PP1 de mamífero (Erondu y Donelson, 1991). Además, se observó que estos genes derivan de la misma unidad de transcripción que el gen codificante de la subunidad mayor de la ARNpol II (Evers y Cornelissen, 1990).

Los ensayos *in vivo* basados en el empleo de inhibidores específicos de STP han contribuido al estudio funcional de estas enzimas en tripanosomátidos. El tratamiento de *T. brucei* con ácido okadaico (AO) evidenció defectos en la citocinesis y segregación de orgánulos con la aparición de células multinucleadas (Washington y col., 2002). Sin embargo, los análisis mediante ARNi de las subunidades catalíticas PP1 y PP2A en *T. brucei* no condujeron a la alteración del fenotipo asociado a AO (Li y col., 2006). No obstante, el tratamiento con AO indujo la síntesis de ADN y división nuclear en células bloqueadas en

fase G1 o G2/M por depleción de quinasas relativas a Cdc2, apareciendo formas multinucleadas. Por otro lado, el cultivo de *T. brucei* en presencia de AO dio lugar a la sub-expresión del gen β -tubulina (Li y Donelson, 1995), empleado habitualmente como *house-keeping*.

En *T. cruzi*, la aplicación de caliculina A (CA) a bajas concentraciones estimuló la diferenciación *in vitro* de tripomastigotes en formas redondeadas tipo amastigote, las cuales expresaban marcadores específicos del estadio intracelular (Grellier y col., 1999). Dos isoformas de PP1, denominadas *TcPP1 α* y *TcPP1 β* , fueron identificadas a nivel de ARNm en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*. El tratamiento de los epimastigotes con CA indujo arresto en el crecimiento celular asociado a la duplicación de orgánulos como el flagelo, kinetoplasto y núcleo.

La actividad STP apenas ha sido estudiada en *Leishmania* (Burns y col., 1993; Banerjee y col., 1999; Mills y col., 2007), siendo desconocido el papel que desempeñan las PP1 en estos organismos. De acuerdo a las anotaciones recogidas en la base de datos *TriTrypDB*, las especies de *Leishmania* codifican para 7 (*L. donovani* y *L. braziliensis*) u 8 (*L. infantum*, *L. major* y *L. mexicana*) fosfatasa tipo PP1 (Tabla 6). Cabe destacar la disposición en tándem de varias isoformas, determinando la presencia de un *cluster* de genes compuesto por 3 ó 4 PP1 de localización cromosómica variable según la especie: cromosoma 20 (*L. braziliensis*) cromosoma 33 (*L. mexicana*) y cromosoma 34 (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*) (*TriTrypDB*, Aslett y col., 2010).

Tabla 6. Listado de PP1 codificadas por diferentes especies de *Leishmania* según las anotaciones recogidas en la base de datos *TriTrypDB*. Se destacan en azul las PP1 dispuestas en tándem en las especies estudiadas. Base de datos *GeneDB* (www.genedb.org).

<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>
LinJ.15.0240	LmjF.15.0220	LdBPK_150240.1	LmxM.15.0220	LbrM.15.0230
LinJ.28.0730	LmjF.28.0690	LdBPK_280730.1	LmxM.28.0690	LbrM.28.0710
LinJ.31.2700	LmjF.31.2630	LdBPK_312700.1	LmxM.30.2630	LbrM.20.0710
LinJ.34.0820	LmjF.34.0780	LdBPK_340830.1	LmxM.33.0780	LbrM.20.0720
LinJ.34.0830	LmjF.34.0790	LdBPK_340840.1	LmxM.33.0790	LbrM.20.0730
LinJ.34.0840	LmjF.34.0800	LdBPK_340850.1	LmxM.33.0800	LbrM.20.0820
LinJ.34.0850	LmjF.34.0810	LdBPK_340900.1	LmxM.33.0810	LbrM.31.2970
LinJ.34.0900	LmjF.34.0850		LmxM.33.0850	

Los estudios de expresión génica llevados mediante *microarrays* de ADN (Alcolea, 2010; Alcolea y col., 2016a) pusieron de manifiesto la regulación diferencial de diversas PP1 a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum* (Figura 15). Entre ellas, se detectó la sobre-expresión de la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 en promastigotes en cultivo axénico respecto a amastigotes intracelulares obtenidos mediante infección *in vitro* de una línea celular fagocítica (Alcolea y col., 2010a). Asimismo, se halló la sobre-expresión del gen LinJ.34.0840 en promastigotes extraídos del vector *P. perniciosus* respecto a promastigotes de cultivo axénico (Alcolea y col., 2016a).

Introducción

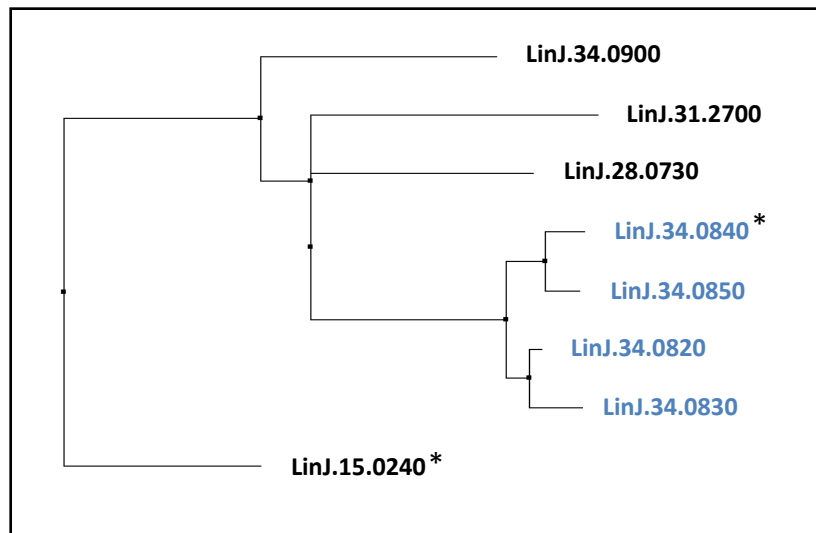


Figura 15. Cladograma basado en la identidad de secuencia de las PP1 presentes en el genoma de *L. infantum*. (*): PP1 diferencialmente expresadas según los estudios de expresión génica diferencial previos. (Alcolea, 2010; Alcolea y col., 2010a; Alcolea y col., 2016a). Se destacan en azul las PP1 dispuestas en tándem en el cromosoma 34.

En base al papel esencial que desempeñan las PP1 como elementos reguladores de diversos procesos celulares en organismos eucariotas y el escaso conocimiento disponible en tripanosomátidos, se ha llevado a cabo en esta tesis el estudio de diferentes PP1 de *L. infantum*. Teniendo en cuenta los análisis de expresión génica citados, se ha caracterizado la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 y las PP1 localizadas en el cromosoma 34 de *L. infantum* (LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840, LinJ.34.0850). Estas investigaciones representan un avance en el conocimiento de la biología molecular del parásito y contribuyen al estudio de las PP1 como posibles dianas de acción en el área de la terapéutica clínica frente a la leishmaniasis.

2. OBJETIVOS

La fosforilación reversible de proteínas representa un papel clave en la regulación de diversos procesos celulares en organismos eucariotas, considerándose las PP1 las principales enzimas efectoras de la desfosforilación proteica en residuos de serina/treonina. En *Leishmania*, los estudios sobre MPT han puesto de manifiesto la importancia del estado de fosforilación proteico durante los procesos de diferenciación del parásito. Asimismo, el análisis comparativo de los fosfotomas ha evidenciado el valor de la desfosforilación como mecanismo de regulación en kinetoplastidos. Sin embargo, se desconoce la función que desempeñan las PP1 en *Leishmania* spp. El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es la caracterización funcional de la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 (PP1-240) y del *cluster* de PP1 – LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840, LinJ.34.0850 – localizado en el cromosoma 34 de *L. infantum* (*cluster* PP1-34). Para ello se han definido 4 objetivos concretos:

Objetivo 1. Análisis de la estructura primaria de la proteína PP1-240 y de las codificadas por el *cluster* PP1-34.

Objetivo 2. Análisis de la expresión génica de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en el ciclo biológico de *L. infantum*.

Objetivo 3. Estudio de la localización subcelular de la proteína PP1-240 y de las codificadas por el *cluster* PP1-34 en promastigotes y amastigotes de *L. infantum*.

Objetivo 4. Caracterización de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en promastigotes axénicos de *L. infantum* mediante la generación de líneas *knock-in*. Estudio de las alteraciones inducidas en la expresión génica diferencial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

3.1.1.- Estirpes bacterianas.

La Tabla 7 muestra las diferentes cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo.

Tabla 7. Cepas de *E. coli*. Se indica la cepa, genotipo, referencia, y plásmido con el que se transformó cada cepa.

Cepa	Genotipo	Referencia	Plásmido
Artic express (DE3)	<i>E. coli</i> B F- ompT hsdS(rB – mB –) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]	<i>Agilent Technologies</i>	pETM-41
BL21 (DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	<i>Novagen</i>	pETM-41
DH5α	F- Φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	pIRmcs3 (-) pIRmcs3-GFP (-)
M15[pREP4]	F-, Φ80ΔlacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR	<i>QIAGEN</i>	pQE-30
Shuffle	F' lac, pro, lacIq / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)PvuII phoR ahpC* galE (or U) galK λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) ΔtrxB rpsL150(StrR) Δgor Δ(malF)3	<i>NEB</i>	pQE-30/ pETM-41

3.1.2.- Parásitos.

Durante el desarrollo de este tesis doctoral, se utilizó el aislado de *L. infantum*, M/CAN/ES/98/10445 (zimodema MON-1) proporcionado por los Dres. Alfredo Toraño y Mercedes Domínguez (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda).

3.1.3.- Línea celular humana.

Se utilizó la línea celular humana mielomonocítica U937 (ATCC CRL1593.2) para llevar a cabo ensayos de infección *in vitro* y aislamiento de amastigotes de *L. infantum*, que procede de efusiones pleurales de un paciente con linfoma histiocítico (Sundstrom y Nilsson, 1976).

3.1.4.- Insecto vector.

A partir de cultivos de células estimuladas de la línea U937 infectados *in vitro* con promastigotes del aislado MCAN/ES/98/10445 de *L. infantum*, se realizaron infecciones de de una colonia de hembras de *P. perniciosus* por el Dr. Ricardo Molina (Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda). A continuación se extrajo el ARN (sección 3.4.3) para llevar a cabo los estudios de expresión génica de los genes en estudio mediante qRT-PCR (sección 3.11.1). La colonia de flebotomos se mantuvo a 28°C y 95-100% de humedad relativa con un fotoperiodo 17:7 (luz:oscuridad) (Molina, 1991).

Materiales y métodos

3.1.5.- Animales de experimentación.

Los anticuerpos policlonales frente a las proteínas de interés fueron obtenidos a partir de conejos de la raza *New Zealand White* (sección 3.8) en el servicio de experimentación animal del CIB-CSIC), de acuerdo a la normativa en vigor (Directiva 2010/63/EU).

3.2.- CULTIVOS CELULARES.

3.2.1.- Cultivos bacterianos.

3.2.1.1.- Medios de cultivo.

Los cultivos de *E. coli* en suspensión se realizaron con agitación orbital (200 rpm) en medio Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, NaCl 0,5% y extracto de levadura 0,5%), en presencia de ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (35 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) en los casos en los que las bacterias habían sido transformadas con plásmidos que contenían genes de resistencia a estos antibióticos. Para crecer las bacterias en medio sólido se añadió agar al 1,5% al medio LB. Las bacterias se conservaron a -80°C en LB con glicerol al 20%.

3.2.1.2.- Transformación de bacterias competentes.

La preparación de bacterias competentes de *E. coli* para transformación por choque térmico se realizó mediante tratamiento con RuCl₂, MnCl₂ y CaCl₂ (Hanahan y Meselson, 1983). En primer lugar, se sembró la estirpe correspondiente en cada caso de *E. coli* en 10 ml de medio φ (triptona peptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,6 g/l, KCl 0,37 g/l, pH 7,6) y se incubó a 37°C durante 16 horas en agitación orbital. A continuación, se diluyó el cultivo 40 veces y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) de 0,5 aproximadamente. Se enfrió el cultivo en un baño de agua-hielo (0°C) durante 15 min y se recogieron las bacterias por centrifugación a 1.800g a 4°C durante 10 min. El sedimento fue resuspendido suavemente en 120 ml de solución TfBI (RuCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8), se dejó enfriar en hielo durante 15 min, se centrifugó nuevamente y se resuspendió el sedimento en 16 ml de solución tampón TfB II (RuCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, MOPS 10 mM, glicerol 15% a pH 6,8). Para su conservación, las bacterias competentes se congelaron rápidamente en nieve carbónica en alícuotas de 100 µl y se mantuvieron a -80°C.

El procedimiento de transformación por choque térmico se inició mezclando cada alícuota de 100 µl de bacterias competentes con 100-200 ng en 10 µl del ADN plasmídico de interés. Se mantuvo dicha mezcla a 4°C durante 30 min. Seguidamente, se incubó la mezcla en un baño de agua a 42°C durante 45s y se enfrió rápidamente en hielo, donde se mantuvo durante 2 min. Para permitir la expresión del marcador de resistencia correspondiente, se añadió 1ml de medio LB y se incubó la mezcla a 37°C durante 1 h en agitación orbital. Por último, se sembraron 100 µl de la misma en placas LB-agar con el

antibiótico a la concentración adecuada y se llevó a cabo la crioconservación del volumen restante según se indica en la sección 3.2.1.1.

3.2.2.- Obtención de promastigotes, amastigotes y líneas knock-in de *L. infantum*.

3.2.2.1.- Procedimientos básicos de cultivo.

Los cultivos de *L. infantum* y de células humanas de la línea U937 fueron realizados en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 con una cabina de flujo laminar de tipo II. Para este fin, se utilizaron frascos *Roux* y medio RPMI 1640 *Gibco (Thermo Fisher Scientific)* suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*Sigma-Aldrich*) inactivado a 56°C durante una hora (HIFBS) en presencia de penicilina 100 UI/ml y estreptomina 100 µg/ml (*Thermo Fisher Scientific*), al que se hará referencia como medio completo. En el caso de los amastigotes axénicos, se acidificó el medio a pH 5,5 con HCl y se esterilizó por filtración (0,22µm). Los cultivos de promastigotes se iniciaron a una densidad celular de 2×10^6 células/ml y se incubaron a 27°C, mientras que los de amastigotes axénicos y células U937 se realizaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, a una densidad celular inicial de 2×10^6 y 2×10^5 células/ml respectivamente. La cinética de crecimiento de los promastigotes se registró cada 24h en cámara de *Neubauer*. La centrifugación de los promastigotes y amastigotes se llevó a cabo a 2.000g durante 10 min, y la de las células U937 a 200g.

Para la criopreservación de las células en nitrógeno líquido (-196°C), se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en HIFBS a una densidad celular de 10^7 ó 10^8 células/ml (células humanas y parásitos, respectivamente), e inmediatamente se introdujeron en un contenedor *Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene)* para conseguir un descenso gradual de la temperatura (-1°C/min) una vez situado a -80°C, antes de transferir los viales al nitrógeno líquido.

3.2.2.2.- Aglutinación de promastigotes con aglutinina de cacahuete (PNA) y selección negativa.

Se centrifugaron los promastigotes en fase estacionaria a 2.000g durante 10 min, se resuspendieron en medio completo a una densidad celular de 2×10^8 células/ml y se incubaron con 50 µg/ml de aglutinina de cacahuete (PNA) (*Sigma-Aldrich*) a temperatura ambiente durante 30 min. La aglutinación y la sedimentación de los promastigotes fue controlada visualmente. El sedimento fue resuspendido en 2 ml de sobrenadante remanente y se llevó de nuevo al volumen inicial con más medio completo fresco con la misma concentración de PNA y fue centrifugado a 200g durante 10 min. El procedimiento de centrifugación fue repetido para la recuperación de los promastigotes PNA⁺. Finalmente, el último sobrenadante fue centrifugado a 2.000g para recuperar los promastigotes PNA⁻. La separación fue comprobada por microscopía óptica (*Leica, Wetzlar, Alemania*).

Materiales y métodos

3.2.2.3.- Infección de *P. perniciosus* con *L. infantum* y aislamiento de promastigotes del tubo digestivo.

El aislamiento de promastigotes metacíclicos del tubo digestivo del vector fue realizado por los Dres. Ricardo Molina y Maribel Jiménez (Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, ISCIII, Majadahonda). Para este fin, se centrifugó un cultivo de promastigotes axénicos y se resuspendió a una densidad celular de 10^6 /ml en sangre de conejo desfibrinada e inactivada por calor (56°C, 1 h). Con este inóculo se alimentó a un grupo de 150-200 flebotomos hembra mantenidos en una cámara climática a 27-28°C con humedad relativa del 90-100% y fotoperiodo de 17h de iluminación y 7 de oscuridad hasta el quinto día, en el cual se realizó la disección para extraer y examinar los tubos digestivos de las hembras infectadas mediante microscopía óptica. Los promastigotes metacíclicos fueron obtenidos de la parte anterior del tubo digestivo medio, en la válvula estomodeal, disgregándolo suavemente por presión con un cubreobjetos después de separar la región de interés sobre una gota de PBS. Se centrifugaron los promastigotes e inmediatamente se procedió a la extracción del ARN, utilizando glucógeno como portador para mejorar el rendimiento.

3.2.2.4.- Obtención de amastigotes intracelulares de *L. infantum* por infección *in vitro* de células U937 estimuladas.

Inicialmente, la línea celular humana U937 se cultivó en medio completo en frascos *Roux* a 37°C y en presencia de 5% de CO₂. A continuación, las células fueron diferenciadas por estimulación con estimulada con 5-forbol-1-miristato-3-acetato o PMA (20 ng/ml) (*Sigma-Aldrich*) durante 72h en frascos *Roux* para la obtención de extractos proteicos totales de amastigotes intracelulares (sección 3.6.2) o en cámaras de cultivo celular de ocho pocillos (*LabTek*) para evaluar los niveles de infección *in vitro* por microscopía óptica. Las infecciones se llevaron a cabo en medio completo en una proporción promastigotes: células U937 10:1 durante 2h. A continuación, se realizaron dos lavados de las células con medio completo a las 2 y 16h post-infección para eliminar los promastigotes libres. Las muestras procedentes de las cámaras de cultivo fueron tomadas a las 24, 48 y 72h post-infección para estimar el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula. Para este propósito, se realizaron tres lavados más antes de tratar las células con una solución hipotónica (180 µl de medio completo con 220 µl de agua por pocillo) durante 5 min. Las células se sometieron a cuatro lavados con 150 µl de etanol-ácido acético 3:1. Seguidamente, las células fueron fijadas con la mencionada solución etanol-acético durante 10 min. Este proceso de fijación se repitió 3 veces. Posteriormente, las células se secaron al aire y se retiraron los pocillos de la cámara de cultivo para poder teñir las células con la solución *Diff-Quick* (*Dade Behring*). Finalmente, las preparaciones se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se empleó *Entellan Neu* (*Merck*) como medio de montaje. El porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada se estimó a partir de tres réplicas biológicas del experimento y el análisis estadístico se basó en el test de la t de *Student* mediante el programa *Sigmaplot 11*.

Con el propósito de obtener amastigotes intracelulares para posteriores análisis de expresión génica diferencial, se extrajo el cultivo de macrófagos infectados por raspado con una espátula estéril y se lisaron los macrófagos con 100µl de una solución de 0.1% SDS en RPMI 1640 durante 30s a temperatura ambiente, manteniendo así intactos los amastigotes. La lisis se detuvo mediante la adición de 1ml de medio completo y se centrifugó, obteniendo en el sedimento los amastigotes intracelulares.

3.2.2.5.- Generación de líneas de promastigotes *knock-in* de *L. infantum* mediante transfección.

La obtención de las líneas celulares *knock-in* para la sobre-expresión de los genes en estudio se llevó a cabo de acuerdo a un procedimiento previamente descrito (Alzate y col., 2006) con las modificaciones que se indican a continuación.

Los genes de interés se clonaron en los vectores integrativos pIR-mcs3 (-) y pIR-mcs3-GFP (-) como se describe en la sección 3.4.10 mediante el empleo de los oligonucleótidos detallados en la Tabla 9. Estas construcciones fueron introducidas por choque térmico en las células DH5α para su mantenimiento. A continuación, se extrajo el ADN plasmídico (sección 3.4.1) y se linealizaron las construcciones por digestión con la enzima Sma I (*Thermo Fisher Scientific*). Mientras tanto, los promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica media fueron resuspendidos en el tampón de electroporación (132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM de acetato de magnesio, 90µM de acetato de calcio, ajustado a pH 7,0 con ácido acético) esterilizado por filtración (0,22 µm). Seguidamente, los promastigotes fueron lavados y resuspendidos en el mismo tampón a una concentración final de 7x10⁶ células/ml y se transfirieron a una cubeta de electroporación (400µl) con una distancia entre los electrodos de 0,2 cm (BTX). El pulso eléctrico se aplicó en presencia del plásmido digerido (1,5 -3 µg de ADN) mediante un electroporador *Electro Cell Manipulator 600* (BTX). Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 1,5 kV y 24 Ω durante 0,28 ms (modo *High voltage*). Durante las primeras 24h tras el pulso de corriente eléctrica, los promastigotes se cultivaron en medio completo suplementado con 20% de HIFBS y 10% de sobrenadante de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria esterilizado por filtración (0,22 µm). Transcurrido este tiempo, se añadió el agente de selección nourseotricina (Jena Bioscience, Jena, Alemania) a 100 µg/ml, incrementándose la concentración a 120 µg/ml a los siete días de cultivo. El proceso de selección se llevó a cabo tomando como referencia el control negativo o promastigotes sometidos a pulso eléctrico en ausencia de vector. La integración de las construcciones en las diferentes líneas *knock-in* se comprobó mediante PCR a partir de ADNg y secuenciación de los productos de PCR (sección 3.4.10.6). Los promastigotes transfectados con los vectores pIR y pIR-GFP se emplearon como líneas control en todos los experimentos realizados.

3.3.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

3.3.1.- Aislamiento de ADN plasmídico.

La extracción de ADN plasmídico a pequeña escala se realizó por el método de lisis alcalina con el kit *High pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2.- Extracción de ADN genómico de *L. infantum*.

La purificación de ADN genómico de *L. infantum* se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Sambrook y col. (1989), exceptuando la concentración de SDS. Se centrifugó un cultivo en fase estacionaria (2×10^9 promastigotes) a 2.000g durante 10 min a 4°C. A continuación, se lavó tres veces con PBS y se resuspendió en 8 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 9,5, EDTA 0,1M pH 8,0, ARNasa A pancreática 20 µg/ml y proteinasa K 0,1 mg/ml. Se añadió inmediatamente SDS al 2% gota a gota y agitando suavemente hasta completar 10 ml de volumen total. A continuación, se purificó el ADN mediante cuatro extracciones líquido-líquido seguidas de precipitación como se indica a continuación. En primer lugar, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, se emulsionó suavemente por inversión del tubo durante 15 min y se centrifugó a 2.000g durante 15 min para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa evitando contaminarla con la interfase y se repitió dos veces. La última extracción se llevó a cabo de la misma manera con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Para precipitar el ADN, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C, y se mantuvo a -20°C durante al menos 1h. Se sedimentó el ADN genómico precipitado durante 30 min a 8.500 rpm en una centrífuga *Sorvall RC-5B* ó *5C* con un rotor flotante HB-4 (*Dupont*, Wilmington, Estados Unidos). A continuación, se llevó a cabo un lavado con etanol al 70% y se dejó secar el sedimento para evaporar los residuos de etanol. Finalmente, se resuspendió en agua *milliQ*.

3.3.3.- Extracción de ARN total de *L. infantum*.

El aislamiento de ARN total de *L. infantum* se llevó a cabo con el método de Chomczynski y Sacchi, 1987 utilizando *TRizol Reagent (Invitrogen)* (Chomczynski y Sacchi, 1987). En primer lugar, se realizaron tres lavados de las células con PBS, y se resuspendieron a una densidad celular de 1×10^6 ó 2×10^8 respectivamente, según se tratase del parásito o de la célula hospedadora, en 1 ml de *TRizol Reagent*, y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 s y se mantuvo la emulsión a temperatura ambiente durante 2 min. La separación de las fases se llevó a cabo centrifugando a 12.000g durante 15 min a 20°C y se recuperó el ARN total presente en la fase acuosa, evitando su contaminación con el ADN de la interfase. Cuando la cantidad inicial de células era muy pequeña (del orden de 10^4 - 10^6) se añadieron 5 µg de glucógeno como portador en solución libre de ARNasas

(Ambion) a la fase acuosa recuperada. La precipitación del ARN total se llevó a cabo añadiendo 0,5 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 min. En este punto del proceso se puede llevar a cabo el almacenamiento del ARN a -80°C . A continuación, se centrifugó a 12.000g durante 10 min a 20°C . Se con etanol al 75% en agua libre de RNAsas (Ambion), se dejó secar y se resuspendió en agua libre de RNAsas (Ambion). El ARN total fue purificado con *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante, eluyendo con agua libre de RNAsas (Ambion).

3.3.4.- Amplificación de ARNm.

La amplificación del ARN mensajero se llevó a cabo a partir del ARN total purificado con *MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit* (Ambion), según las instrucciones del fabricante.

3.3.5.- Síntesis de ADNc.

En primer lugar, se mezclaron 5-10 μg de ARNm con 5 μg de oligonucleótidos al azar (*Invitrogen*) en un volumen de 18,3 μl y se calentó dicha mezcla a 70°C durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, se enfrió a 4°C rápidamente. Seguidamente, se añadió *First-Strand Buffer 1X*, una mezcla de deoxinucleótidos a 0,52 mM cada uno, ditiotreitolo (DTT) 10 mM y transcriptasa inversa *SuperScript III RT* (*Invitrogen*) 600 U. Se dejó transcurrir la reacción a 46°C durante 3h y a continuación, se degradó el ARN añadiendo 7 μl de una disolución de NaOH 0,5 M y EDTA 50 mM e incubando a 70°C durante 30 min. Se llevó a cabo la neutralización con 3 μl de acetato sódico 3 M pH 5,2, y se purificó ADNc mediante *QIAquick PCR Purification Kit* (*QIAGEN*) según las instrucciones del fabricante.

3.3.6.- Electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras de ADN y ARN se diluyeron en tampón de carga 6X (*New England Biolabs*). Las células de electroforesis utilizadas fueron la *Mini-SubCell GT* o la *Wide Mini-Sub Cell GT* (*BioRad*). Los geles de agarosa se prepararon al 1 % p/v en tampón TAE (TrisHCl 40 mM, 37 EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM) incorporando el fluoróforo extrínseco *GelRedTM* (*Biotium*) al 0,01% v/v. La separación electroforética se llevó a cabo a 5 V/cm (75 mA) durante 60-90min con una fuente de alimentación *PowerPacTM Basic* (*BioRad*). Posteriormente, se irradió el gel con luz ultravioleta (UV) y se tomó la imagen utilizando el sistema *Gel Doc XR System* y el programa *Quantity One v.4.6*.

3.3.7.- Análisis de ARN mediante electroforesis capilar de alta resolución.

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, Van Nuys, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se descontaminaron de RNAsas los electrodos del analizador con *RNase ZAP* en primer lugar. Se preparó un *chip RNA 6000 Nano assay* con la ayuda del soporte *Chip Priming Station*, añadiendo una mezcla de *RNA 6000 Nano Gel Matrix* y *RNA 6000 Dye Concentrate*, y se carga cada muestra en un volumen de 1 μl en un *chip RNA*

Materiales y métodos

Nano LabChip® junto con el marcador RNA 6000 Nano marker y, en otro pocillo independiente, RNA 6000 Ladder.

3.3.8.- Análisis de ácidos nucleicos mediante espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.

La concentración de los ácidos nucleicos se calculó mediante un espectrofotómetro para micro-volúmenes ND-1000 midiendo la absorbancia a 260 nm (NanoDrop, Wilmington, Estados Unidos) multiplicando por el factor 50, 40 ó 33 para el ADN de doble hebra, el ARN y el ADN de cadena sencilla, respectivamente. Se consideraron las razones $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ y $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ como indicadores de su pureza.

3.3.9.- Purificación de ADN por precipitación con etanol.

La purificación de muestras de ADN en solución con alto contenido en sales se llevó a cabo por precipitación con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C durante una hora. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 13.000g durante 20 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 70%. Finalmente, se el ADN a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen adecuado de agua *milliQ* según las aplicaciones posteriores.

3.3.10.- Clonaje en vectores de expresión.

3.3.10.1.- Plásmidos.

A continuación se detallan los vectores (Tabla 8) empleados en esta tesis doctoral.

Tabla 8. Vectores utilizados en este trabajo. Se define el nombre del plásmido, finalidad y referencias.

Plásmido	Descripción	Referencia
pETM-41	Clonaje y expresión del gen codificante de la proteína PP1-840 con un <i>tag</i> de 6 histidinas en N-terminal y C-terminal para su purificación por cromatografía de afinidad con níquel y un <i>tag</i> de MBP en C-terminal para favorecer la solubilización de la proteína recombinante.	EMBL
pIRmcs3 (-)	Clonaje de los genes codificantes de las proteínas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34 para generación de las respectivas líneas <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i> .	Hoyer y col., 2004
pIRmcs3-GFP (-)	Clonaje genes codificantes de las proteínas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34 para generación líneas <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i> .	Hoyer y col., 2004
pQE-30	Clonaje y expresión de genes codificantes de las proteínas PP1-240, PP1C-34 y PP1-840 con un <i>tag</i> de seis histidinas en N-terminal para su purificación por cromatografía de afinidad con níquel.	QIAGEN
pGRO7	Expresión de las chaperonas <i>groES</i> y <i>groEL</i> .	TAKARA

3.3.10.2.- Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos necesarios para la amplificación por PCR de los genes de interés (Tabla 9) fueron diseñados utilizando el programa informático *Geneious* v. 5.5 y fueron sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del CIB-CSIC.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se detalla la pareja de oligonucleótidos utilizada para cada construcción generada. Las regiones subrayadas corresponden con la diana de restricción, indicada al final de la secuencia entre paréntesis. TH: representa la temperatura de hibridación determinada experimentalmente. Fw: forward, Rv: reverse.

Construcción	Oligonucleótido (5'-3') (Diana de restricción)	TH (°C)
pQE-30-PP1-240	Fw- GCCATGCATGCGCACACGAAGCGAGGGAG (SphI) Rv- GCCATAAGCTTTCAGTCGTGGCTCAGAGGGTT (HindIII)	60
pQE-30-PP1C-34	Fw- GCCGGATCCGAAGAGGAGATCCGCGCTGT (BamHI) Rv- GCCAAGCTTCTAACGGGATGCGGGAATGA (HindIII)	62
pQE-30-PP1-840	Fw- GCCGGATCCAGCGAATCCGTGTTTCCCCT (BamHI) Rv- GCCAAGCTTCTAACGGGATGCGGGAATGA (HindIII)	60
pETM41-PP1-840	Fw- GCCCATGGACAGCGAATCCGTGTTTCCCCT (NcoI) Rv- GCCGCGGCCGCACGGGATGCGGGAATGATG (Not I)	69
pIR-PP1-240	Fw- GCCATAGATCTATGGCACACGAAGCGAG (BglII) Rv- GCCATAGATCTTCAGTCGTGGCTCAGAGGGT (BglII)	69
pIR-PP1-240T	Fw- GCCATAGATCTATGGAGGGCCTCATCGTGCA (BglII) Rv- GCCATAGATCTTCAGTCGTGGCTCAGAGGGT (BglII)	69
pIR-PP1C-34	Fw- GCCATAGATCTATGGAAGAGGAGATCCGCGCTG Rv- GCCATAGATCTCTAACGGGATGCGGGAATGATGA	66
pIR-PP1-240-GFP	Fw- GCCATAGATCTATGGCACACGAAGCGAG (BglII) Rv- GCCATAGATCTGTCGTGGCTCAGAGGGTTG (BglII)	60
pIR-PP1-240T-GFP	Fw- GCCATAGATCTATGGAGGGCCTCATCGTGCA (BglII) Rv- GCCATAGATCTGTCGTGGCTCAGAGGGTTG (BglII)	69
pIR-PP1C-34-GFP	Fw- GCCATAGATCTATGGAAGAGGAGATCCGCGCTG (BglII) Rv- GCCATAGATCTACGGGATGCGGGAATGATG (BglII)	69

3.3.10.3.- Preparación de insertos.

Las secuencias de los genes putativos de interés de *L. infantum* estudiados se obtuvieron de la base de datos *GeneDB* (www.genedb.org), y a partir de ellas se diseñaron oligonucleótidos cebadores incorporando en sus extremos 5' las dianas de restricción adecuadas (Tabla 9). La amplificación de los insertos con dichos oligonucleótidos fueron realizadas en las siguientes condiciones: un primer ciclo de 95 °C durante 5 min; seguido de 30 ciclos de 98 °C durante 20 seg., TH (Tabla 3.3) durante 15 segundos, 72 °C durante 2 min; y un ciclo final de 72 °C durante 3 min. En la mezcla de reacción se empleó ADN genómico de *L. infantum* como molde (sección 3.4.2) y la ADN polimerasa *Kapa HiFi HotStart* (5 u/μl) junto al tampón de reacción con MgCl₂ y la mezcla de dNTPs en las proporciones estándar indicadas por el fabricante. A continuación, se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se extrajo el inserto de

Materiales y métodos

interés empleando el kit *Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen)*. Cada inserto se precipitó con etanol (sección 3.4.9) y se digirió con las enzimas de restricción adecuadas (Tabla 9) según las indicaciones del fabricante (*New England Biolabs*). Una vez realizada la separación electroforética, se extrajo nuevamente el inserto digerido de la agarosa y se precipitó con etanol (sección 3.4.9). La concentración final de ADN se cuantificó mediante espectroscopía de absorción UV (sección 3.4.8).

3.3.10.4.- Preparación de los vectores.

Tras el aislamiento de ADN plasmídico tal y como se detalla en la sección 3.4.1, éste se digirió con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso (Tabla 9). Para evitar la religación de los vectores utilizados, se defosforilaron los extremos cohesivos con fosfatasa de gamba antártica (*New England Biolabs*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector digerido y defosforilado se purificó por extracción de gel de agarosa empleando el kit *Qiaquick Gel Extraction (Qiagen)*, seguida de precipitación con etanol (sección 3.4.9). Finalmente, el ADN resuspendido en agua milliQ, se cuantificó por espectroscopía de absorción UV (sección 3.4.8)

3.3.10.5.- Ligación.

La reacción de ligación se llevó a cabo con la ADN ligasa T4 (*New England Biolabs*) en un volumen final de 10 µl a 16°C durante 16 h. Con el producto de ligación se transformaron las correspondientes estirpes de *E. coli* (Tabla 7) mediante choque térmico (sección 3.2.1.2).

3.3.10.6.- Secuenciación de ADN.

Se comprobó la integración del inserto en el vector mediante secuenciación por el método de *Sanger (Secugen S.L., CIB-CSIC)* y posterior alineamiento frente a la secuencia putativa correspondiente del genoma de *L. infantum* obtenida de la base de datos *TriTrypDB*.

3.4.- EXPRESIÓN EN SISTEMA HETERÓLOGO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

3.4.1.- Expresión y lisis de las proteínas recombinantes.

3.4.1.1.- Expresión de PP1-240, PP1C-34 y PP1-840 en la cepa M-15 de *E. coli*.

Los genes codificantes de las proteínas PP1-240, PP1C-34 y PP1-840 fueron clonados en el vector pQE-30 (sección 3.4.10) para su expresión en la cepa M15 de *E. coli* en forma de proteína de fusión con un dominio de seis histidinas en su extremo N-terminal.

Los preinóculos de los cultivos bacterianos (~25 ml de cultivo) se iniciaron a partir de células conservadas a -80°C en glicerol y se cultivaron durante ~16 h a 37°C en LB-ampicilina (100µg/ml) kanamicina (50µg/ml) suplementado con MnCl₂ 1mM. A continuación, se iniciaron los cultivos de 1 L hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,5 UDO_{600nm} aproximadamente. A continuación, se llevó a cabo la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes añadiendo 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubaron los cultivos en agitación durante 3 h a 30°C. Los cultivos se centrifugaron a 4.000g durante 15 min a 4°C y el sedimento se lavó con un volumen de 50 ml de NaCl al 0,9%. En este punto se puede conservar el sedimento a -20°C. La lisis se llevó a cabo en 40 ml de un tampón a pH 8 que contiene KCl 1M, imidazol 30 mM, Brij 58 1%, glicerol 10%, benzamidina 1 mM y un comprimido de *cocktail* de inhibidor de proteasas (*Roche*). Para facilitar la ruptura de la pared celular, se llevaron a cabo 4 ciclos de sonicación de 1 min en hielo seguidos de 2 min de enfriamiento. A continuación, se centrifugó durante 1 h a 27.000g a 4°C. Posteriormente, en el caso de PP1-240 y PP1C-34, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de tampón de unión (hidrocloruro de guanidinio 5 M, imidazol 40 mM). Seguidamente, se resuspendió el sedimento en el tampón de unión y fue sonicado nuevamente y centrifugado durante 1 h a 27.000g. El sobrenadante resultante fue recuperado y almacenado a -80°C para la purificación en condiciones desnaturalizantes de las proteínas recombinantes sobre-expresadas (sección 3.5.2).

3.4.1.2.- Coexpresión de PP1-840 y las chaperonas *groES/groEL* en la cepa M-15 y *SHuffle* de *E. coli*.

Se llevó a cabo la coexpresión de la proteína PP1-840 junto con las chaperonas *groES/groEL* en las cepas de expresión de *E. coli* M15 y *SHuffle*. Para ello se introdujo por choque térmico la construcción pQE30-PP1-840 y el vector pGRO7 en las mencionadas estirpes bacterianas. La expresión de la proteína recombinante PP1-840 se realizó de acuerdo al procedimiento previamente descrito (Kelker y col., 2009) con las modificaciones que se indican a continuación.

Los preinóculos de los cultivos bacterianos (~25 ml) se iniciaron en LB suplementado con MnCl₂ 1 mM y los antibióticos de selección correspondientes a partir de células conservadas a -80°C en glicerol y se cultivaron en agitación durante ~16 h a 37°C. A continuación, se estableció un cultivo de 1l a partir del cultivo iniciador para el crecimiento de las células a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de ~0,5 UDO_{600nm}. Seguidamente, se añadió L-arabinosa a 2 g/l para inducir la expresión de las chaperonas *groES/groEL*. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 1 UDO_{600nm}, la temperatura se descendió a 10°C y se añadió IPTG a 0,05 mM para inducir la expresión de PP1-840 durante 20h aproximadamente. Posteriormente, las células se recuperaron por centrifugación a 4.000g durante 15 min, se resuspendieron en LB fresco suplementado con MnCl₂ 1 mM y cloranfenicol 200 µg/ ml, y se incubaron en agitación durante 2 h a 10°C para eliminar la actividad ribosomal y favorecer el *refolding in vivo* de las proteínas PP1-840 (Kelker y col.,

Materiales y métodos

2009). Transcurrido ese tiempo, los cultivos se centrifugaron a 4.000g durante 15 min a 4°C y se resuspendieron en un volumen de 50 ml de NaCl al 0,9%. A continuación, las células fueron recuperadas por centrifugación durante 15 min, resuspendidas en el *buffer* de lisis pH 8 (Tris 500 mM, imidazol 40 mM, KCl 1M, MnCl₂ 1 mM, Triton X-100 0,3%, glicerol, 10%, lisozima 0,2mg/ml, un comprimido del *cocktail* de inhibidor de proteasas (Roche)) y se almacenaron a -80°C. Transcurridas 24 h, las células fueron descongeladas a TA y se lisaron por sonicación siguiendo los ciclos descritos en el apartado anterior. Finalmente, las células se centrifugaron a 27.000g durante 1 hora a 4°C y el *pellet* y el sobrenadante recuperados se almacenaron a 4°C para su análisis mediante SDS-PAGE (sección 3.6.5).

3.4.1.3.- Expresión de PP1-840-MBP en la cepa BL21 (DE3), *Artic express* y *SHuffle* de *E. coli*.

El gen codificante de la proteína PP1-840 se clonó en el vector pETM-41 (sección) para su expresión como una proteína de fusión con un *tag* de seis histidinas en N-terminal y C-terminal y *tag* MBP en su extremo C-terminal en las cepas BL21 (DE3), *Artic Express* y *SHuffle* de *E. coli*.

Para la expresión de la proteína PP1-840-MBP se estableció un cultivo de 1 L a partir de un preinóculo cultivado durante 37°C como ha sido descrito en la sección anterior. Las células se cultivaron a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de ~0,5 UDO_{600nm}. Seguidamente, se descendió la temperatura a 10°C y se añadió IPTG a 0,05 mM para inducir la expresión de la proteína PP1-840-MBP de acuerdo al protocolo modificado de Kelker y col. (2009) detallado en la sección anterior. El sobrenadante de la proteína PP1-840-MBP producida en la cepa de expresión *SHuffle* de *E. coli* fue purificada en condiciones nativas como se describe en la sección 3.5.2.

3.4.2.- Purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de proteínas recombinantes producidas según los procedimientos descritos en las secciones 3.5.1.1 y 3.5.1.3 se llevaron a cabo mediante cromatografía de afinidad al níquel en columnas *HiTrap FF* de 1 ml el sistema *FPLC ÄKTA* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Inglaterra) a temperatura ambiente. Una vez lisadas las células y centrifugado el extracto como se indica en las secciones 3.5.1.1 y 3.5.1.2, se filtró el sobrenadante (0,22 µm), se añadió a la columna con níquel previamente equilibrada con tampón de unión a un flujo de 0,5 ml/min y se lavó con 30 ml de tampón de unión a un flujo de 1 ml/min. La elución se llevó a cabo en gradiente lineal con los tampones de unión y elución que se indican en la Tabla 10 y recogiendo fracciones de 0,5 ml que se almacenaron a 4°C.

Tabla 10. Tampones de unión y elución empleados para la purificación de las PP1 en estudio.

	Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes	Purificación de proteínas en condiciones nativas
Tampón de unión	Hidrocloruro de guanidinio 5 M Imidazol 40 mM	KCl 1M Tris 50 mM Glicerol 10% MnCl ₂ 1 mM Imidazol 40 mM <i>cocktail</i> de inhibidor de proteasas (Roche)
Tampón de elución	Hidrocloruro de guanidinio 5 M Imidazol 700 mM	KCl 1M Tris 50 mM Glicerol 10% MnCl ₂ 1 mM Imidazol 700 mM <i>cocktail</i> de inhibidor de proteasas (Roche)

3.5.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

3.5.1.- Obtención de extractos proteicos totales de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. infantum*.

A partir de un cultivo de promastigotes, se centrifugaron 2×10^8 células a 2000g durante 5 min y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, el sedimento se resuspendió en 100 μ l de tampón lisis (urea 8,4 M, tiourea 2,4 M, CHAPS 4 % p/v, DTT 50 mM, Tritón X-100 1%, un comprimido del *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche) y nucleasa *Benzonase* 50 μ g/ml (Merck Millipore)) y se agitó suavemente por inversión durante 30 min a 4°C. Finalmente, las muestras se centrifugaron 10 min a 8.000g y se recuperó el sobrenadante que fue almacenado a -80°C.

3.5.2.- Obtención de extractos proteicos totales de amastigotes obtenidos por infección de células U937 de *L. infantum*.

Para recuperar los amastigotes obtenidos por infección *in vitro* de células U937 en frascos Roux (sección 3.2.2.5), fue necesario desprender las células con un raspador. A continuación, el sedimento celular se centrifugó a 250g durante 10 min y fue resuspendido en un volumen adecuado para realizar el recuento. Seguidamente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 μ l de solución de lisis A (0,1% SDS en RPMI 1640) por cada 10^6 macrófagos, agitando vigorosamente durante 1 min y dejándolas reposar durante 30 segundos adicionales a temperatura ambiente. La lisis se detuvo rápidamente mediante la adición de 1 ml de medio completo. Se sedimentaron los amastigotes a 15.000g durante 2 min y se lavaron una vez con PBS. Por último, se realizó el recuento de los amastigotes en cámaras de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania) y se resuspendieron en el tampón de lisis B (urea 8,4 M, tiourea 2,4 M, CHAPS al 4 % p/v, DTT 50 mM, Tritón X-100 al 1%, un comprimido del *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche) y nucleasa *Benzonase* 50 μ g/ml (Merck Millipore)).

3.5.3.- Cuantificación de proteínas.

Los extractos proteicos de *L. infantum* y las proteínas recombinantes purificadas fueron cuantificadas por el método de *Bradford* (Bradford, 1976), previa dilución de las mismas en agua *milliQ* (1:5 ó 1:10). La lectura de la absorbancia se realizó a 595 nm en un lector de placas *Varioskan™ Flash* (*Thermo Fisher Scientific*).

3.5.4.- Estudio de los niveles de expresión de proteínas por *Western blot*.

Los niveles de expresión de las proteínas en estudio tanto en la cepa silvestre como en las líneas celulares *knock-in* derivadas de los vectores pIRmcs3(-) y pIRmcs3-GFP(-) fueron determinadas mediante *Western blot* siguiendo un protocolo previamente descrito (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1997). Para ello, se obtuvieron extractos proteicos de promastigotes a lo largo de su ciclo de diferenciación (día 1 a día 6) y/o de amastigotes-*like* y/o amastigotes intracelulares (sección 3.6.1 y sección 3.6.2). Los extractos proteicos previamente cuantificados (sección 3.6.3) se separaron mediante SDS-PAGE al 10% (20 µg/pocillo) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 0,45 µm (*BioRad*). Para el estudio de los niveles de expresión de PP1-240 tanto en la cepa silvestre como en el transfectante pIR-PP1-240 se empleó el anticuerpo policlonal primario anti-PP1-240 (1:500), mientras que para la determinación de los niveles de expresión de PP1-240T en el transfectante pIR-PP1-240T se utilizó el anticuerpo policlonal primario anti-PP1-240N (1:500). El análisis de los niveles de expresión del *cluster* PP1-34 se llevó a cabo con el anticuerpo policlonal primario anti-PP1C-34 (1:500). Los anticuerpos primarios mencionados fueron generados como se detalla en la sección 3.8 y se usaron en combinación con un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo (1:2.000) (*Dako, Agilent*). El análisis de los niveles de expresión de las PP1 en estudio derivadas de la línea pIR-GFP se realizó con un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP (1:2.000) (Roche) asociado a un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón (dilución 1:1.000) conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) (*Dako, Agilent*).

En todos los casos, para la evaluación de la carga de los extractos proteicos por pocillo se reincubaron las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo policlonal primario de conejo anti-GAPDHg (1:10.000) proporcionado por el Dr. Paul A. Michels en combinación con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo conjugado con HRP (1:2000) (*Dako, Agilent*). Previamente, las membranas fueron incubadas en agitación manual cada 5 min con el tampón de *stripping* (β -mercaptoethanol 100 mM, SDS al 2%, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8) a 50°C durante 45 min, lavadas con PBS-*Tween* 20 al 0,1% e incubadas con la solución de bloqueo (PBS-*Tween* 20 al 0,1% con leche desnatada al 5%) durante toda la noche. La reacción de quimioluminiscencia para el revelado del *Western blot* se llevó a cabo utilizando el reactivo *ECL Western blotting Detection kit* (*GE Healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 60s. Se secó el exceso de reactivo y posteriormente se detectó la señal con el analizador *Image Reader LAS-3000* (*GE Healthcare*).

3.5.5.- Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

La separación electroforética de proteínas se llevó a cabo mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 10%, o en gradiente. En primer lugar, las muestras se incubaron a 95°C durante 10 min en tampón de carga (TrisHCl 0,3 M a pH 6,8, azul de bromofenol 0,0001% [p/v], glicerol al 15% [v/v], SDS al 6% [p/v], ditioneitol (DTT) al 5% [p/v]), y a continuación se aplicó una corriente eléctrica de 120 V durante 2h en presencia del tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% [p/v]) en una célula de *MiniProtean*[®] II (BioRad). La tinción de las proteínas se realizó con el colorante *Coomassie Brilliant Blue* (USB, Cleveland, Estados Unidos). El exceso de colorante se eliminó incubando el gel teñido durante 30 min con solución de desteñido (ácido acético 3.7% [p/v], metanol 10% en agua *milliQ*). Se utilizó el marcador de pesos moleculares preteñido *PageRuler Plus Prestained* (*Thermo Fisher Scientific*).

3.6.- ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE *L. INFANTUM* POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Las preparaciones para el estudio por inmunofluorescencia indirecta (IFI) se realizaron sedimentando 2×10^5 promastigotes sobre un área circular de $0,2 \text{ cm}^2$ en un portaobjetos o a partir de células U937 infectadas *in vitro* con amastigotes en cámaras de cultivo de ocho pocillos como se describe en la sección 3.2.2.5. En ambos casos, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 5 min a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo tres lavados con PBS en una jarra *Couplin* durante 5 min. y se permeabilizaron las células durante 5 min con Triton X-100 al 0,5% en PBS, tras lo cual se repitieron los lavados. A continuación, se incubaron las células con solución de bloqueo (PBS-*Tween* 20 al 0,1% con leche desnatada al 5%) a 37°C en una cámara húmeda. Seguidamente, las preparaciones se incubaron en la solución de bloqueo con los anticuerpos primarios correspondientes a una dilución 1:50 (anti-PP1-240N o anti-PP1C-34) durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se lavó nuevamente con PBS durante 5 min y se incubaron los portaobjetos en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (*Jackson Immunoresearch, West Grove, Estados Unidos*) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Diez minutos antes de finalizarla incubación con el anticuerpo secundario, se añadieron 10 μl de una disolución de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) (*Thermo Fisher Scientific*) a 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Finalmente, se lavó cuatro veces con PBS en oscuridad y se montaron las preparaciones con *Mowiol 4-88* (*Sigma-Aldrich*). En el caso de los controles negativos se omitió la incubación con el anticuerpo primario, añadiendo PBS en su lugar. Para la detección de fluorescencia se utilizó un microscopio láser confocal espectral *Leica TCS-SP5-AOBS*. Los parámetros de intensidad del láser y de ganancia se ajustaron a cero con el control negativo (suero preinmune 1:50).

3.7.- ENSAYO DE ACTIVIDAD.

Para la comprobación de la actividad serina treonina fosfatasa de la proteína PP1-840, se empleó el *kit* comercial *RediPlate*TM 96 *EnzChek* (*Molecular probes*) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo enzimático se basó en la incubación de la proteína PP1-840-MPB purificada en condiciones nativas (sección 3.5.1.3 y 3.5.2) (3,5-15 µg) con el sustrato comercial 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP) y el estudio de la cinética de actividad de PP1-840-MBP (3,5 µg) a lo largo del tiempo (40 min). La desfosforilación de DiFMUP da lugar a la formación del producto fluorescente 6,8-difluoro-4-metilumbeliferilo (DiMU) con un espectro de excitación y emisión máximo de 358/452nm que fue cuantificado en un lector de placas *Varioskan*TM *Flash* (*Thermo Fisher Scientific*). La actividad enzimática se determinó a partir de un curva patrón de DiFMU teniendo en cuenta que 1 nmol de DiFMU producido equivale a 1 nmol de fosfato liberado. Se llevaron a cabo dos réplicas técnicas del experimento. La proteína recombinante humana PP1 β (*Abcam*) se empleó como control del experimento (0,35 µg).

3.8.- PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

Las proteínas de interés fueron dializadas a 4°C frente a PBS y, para la producción de los anticuerpos anti-PP1-240 y anti-PP1C-34, se inmunizaron conejos de la raza *New Zealand White* (sección 3.1.5) con las proteínas purificadas en la sección 3.5.2. Se generó otro anticuerpo policlonal frente al extremo terminal de la proteína o anti-PP1-240N a partir del péptido (MAHTKRGRFTVDLSMCTLSSLPTDLSVEKENDVLYRLELL PERYTskVLEEQR) sintetizado químicamente y conjugado con BSA (*Proteogenix*). Antes de la inoculación de los antígenos, se tomaron 5 ml de sangre de la vena marginal de la oreja con la finalidad de obtener el suero pre-inmune.

El protocolo de inmunización de inició con 0,5-1 mg de antígeno. Para ello se preparó una emulsión mezclando 0,5 ml del antígeno en solución salina con 0,5 ml de adyuvante completo de *Freund*. Las siguientes tres inmunizaciones se realizaron con la mitad de la dosis inicial emulsionada con el adyuvante incompleto de *Freund*. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea con un intervalo de tiempo de 3 semanas. Una vez administrada la cuarta dosis, se extrajeron aproximadamente 5 ml de suero y se tituló el anticuerpo frente a la proteína recombinante purificada y frente a extractos proteicos de *L. infantum*. El sacrificio del animal sedado se realizó mediante punción intracardiaca con el fin de obtener un volumen aproximado de 75 ml de suero.

3.9.- ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS.

3.9.1.- Estudio de los niveles de expresión de PP1-240 y del cluster PP1-34 mediante qRT-PCR a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum*.

A partir del ARNm amplificado (sección 3.4.4), se sintetizó el ADNc con *Superscript III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*) (sección 3.4.5) y las reacciones de RT-PCR cuantitativa

relativa en tiempo real (qRT-PCR) se llevaron a cabo en un termociclador 7900HT *Fast Real-Time PCR* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid). Para el estudio de los niveles de expresión de PP1-240, se diseñaron unos oligonucleótidos específicos (Tabla 3.5) mediante el programa *Geneious* v.5.5, que fueron empleados a una concentración de 0,3 μM junto con el reactivo *iQ™ SYBR Green Supermix* (1x) (*BioRad*). En cuanto a las PP1 codificadas por el cromosoma 34, el análisis por qRT-PCR se realizó mediante sondas *TaqMan FAM-MGB* (*Thermo Fisher Scientific*) dirigidas frente a la región codificante del extremo N-terminal previamente diseñadas con el programa *Primer Express* v.3.0.1 (Tabla 11). La mezcla de reacción estaba compuesta por los oligonucleótidos correspondientes a 0,3 μM , sondas *TaqMan* 0,25 μM y *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (1X)* (*Thermo Fisher Scientific*) en un volumen final de 15 μl en placas de 384 pocillos. Se analizaron tres diluciones seriadas 1:3 por triplicado de ADNc de cada condición experimental a una concentración inicial de 5ng/ μl . La cuantificación se realizó mediante el método ΔCt (*cycle threshold*) corregido con la eficiencia (Bookout y col., 2006) y normalizando los resultados obtenidos frente al gen de referencia LinJ.30.300 codificante de la gGAPDH. Para determinar si las diferencias de expresión génica evaluadas mediante este método eran significativas, se llevó a cabo el contraste de hipótesis con el test de la t de *Student* con el programa *SigmaPlot* 11.0.

Tabla 11. Sondas *TaqMan* y oligonucleótidos empleados para los estudios por qRT-PCR. Fw: forward, Rv: reverse.

	Olignucleótidos	Sondas <i>TaqMan</i> FAM-MGB
LinJ.15.0240	Fw- CACACACGAAGCGAGGGAGA Rv- TGC GCTGCTCTTCCAAAAC	-
LinJ.34.0820	Fw- GTTGGCGAAGAATTAGTCGTC RV- CCTACGCTCCTCGAATACG	FAM-GGTTATTTAATATAAGGGTAGGTTT
LinJ.34.0830	Fw- CTCACCCTCCTCCTCCACAGT Rv- CACGCACCGTCGCAATTT	FAM- CGCAGACGCTAATAG
LinJ.34.0840	Fw- CGTGTTTCCCCTGGTACAGAGTA Rv- GCGCTGGAAGCGATTGTC	FAM- AAGATGCTCACCGGCGG
LinJ.34.0850	Fw- GAGCAACGCAGCGATTTTG Rv- CCTTACCGTGAGCATCTTCT	FAM- TGGTGCAGACTCTCAT
LinJ.30.3000	Fw- CTCGGCGTGGACTACGTGAT Rv- CTCGGCCTGCAGCTTGTC	FAM- AGTCTACTGGCCTGTTCA

3.9.2.- Estudio de las líneas *knock-in* mediante RNA-Seq.

Para el estudio por RNA-Seq, se obtuvo el ARN total (sección 3.4.3) en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de los promastigotes transfectados con pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de calidad del ARN

Materiales y métodos

(Agilent 2100, Agilent Eukaryote Total RNA Nano Kit). Las librerías fueron generadas mediante el *kit TruSeq RNA Sample Prep (Illumina)*. La secuenciación masiva de la librería se realizó mediante el sistema *Illumina HiSeq 2500* en la empresa *GeneWiz* (Nueva Jersey, EEUU). A continuación, se analizó la calidad de las lecturas crudas (*raw*) mediante la herramienta *FastQC v.0.10.1* (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas fueron alineadas frente a la última versión del genoma de referencia de *L. infantum* (www.genedb.org) mediante el programa *Bowtie v.0.12.8* (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Finalmente se empleó el programa *edgeR v.3.12.1 Bioconductor* de la plataforma R v.3.2.2 (Robinson y col., 2010) para la visualización de la distribución de los datos crudos, normalización y cuantificación de la expresión diferencial. La normalización de los datos se realizó mediante el método *RPKM (Reads Per Kb of transcript per Million mapped reads)*. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de la *t* de *Student* ($p < 0,05$). Se consideró que un gen estaba diferencialmente expresado si su tasa de variación o *Fold change* era inferior a -1,7 o superior a 1,7 con un *p value* $< 0,05$.

3.9.2.1.- Clustering jerárquico.

Se realizó un agrupamiento de los genes a partir de las lecturas normalizadas (RPKM) en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento en todos los casos. Además, los genes diferencialmente expresados a día 1, fueron agrupados según su perfil de expresión génica diferencial. Ambos *clustering* se realizaron en base a la distancia euclídea aplicando el método jerárquico de *War* mediante el programa *edgeR v.3.12.1* (Robinson y col., 2010).

3.9.2.2.- Asignación de términos de Gene Ontology y análisis de enriquecimiento.

Los genes diferencialmente expresados fueron analizados para la asignación de términos de *Gene Ontology* y para establecer su distribución entre las categorías función molecular, proceso biológico y componente celular. Estos datos fueron representados en un diagrama de barras horizontales. Asimismo se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento en términos de *GO* estableciendo como referencia el genoma de *L. infantum*. Se consideró que el conjunto de datos está enriquecido en un término de *GO* si $p < 0,05$ según el test exacto de *Fisher*. Los términos de *GO* fueron representados en función del valor de *p*. En ambos estudios se empleó el programa *Blast2GO v.3.3.5* (Conesa y col., 2005).

3.9.3.-Estudio de la secuencia primaria de la proteína PP1-240 y del cluster PP1-34

Los alineamientos de secuencia se realizaron con el programa *Clustal Omega* y fueron posteriormente ajustados con el programa *Jalview*. El modelado de la estructura tridimensional de PP1-240 y PP1-840 se realizó con el programa *I-TASSER Suite 4.1* (Zhang, 2008). El análisis de codones raros se realizó mediante la herramienta *Rare Codon Analysis* (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>).

4. RESULTADOS

4.1.- Análisis de la estructura primaria de la proteína PP1-240 y del cluster PP1-34.

Se ha llevado a cabo el estudio de la secuencia de aminoácidos de la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 y de las PP1 derivadas del *cluster* de genes dispuestos en tándem en el cromosoma 34 de *L. infantum*: LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840; LinJ.34.0850 (Figura 16). De acuerdo con la anotación en el genoma de *L. infantum* (Peacock y col., 2007), el gen LinJ.15.0240 codifica para una PP1, cuyo peso molecular teórico es 42,4 kDa, denominada de ahora en adelante PP1-240. Los genes LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840 y LinJ.34.0850, codifican para cuatro PP1 con un tamaño molecular medio de 34 kDa, designado como *cluster* PP1-34 (Anexo I). Los marcos abiertos de lectura de dichos genes fueron corroborados a partir de estudios de secuenciación masiva, en los que se determinó el sitio de unión del *SL* (NCBI, *Sequence Read Archive*, Id. ERX490118).

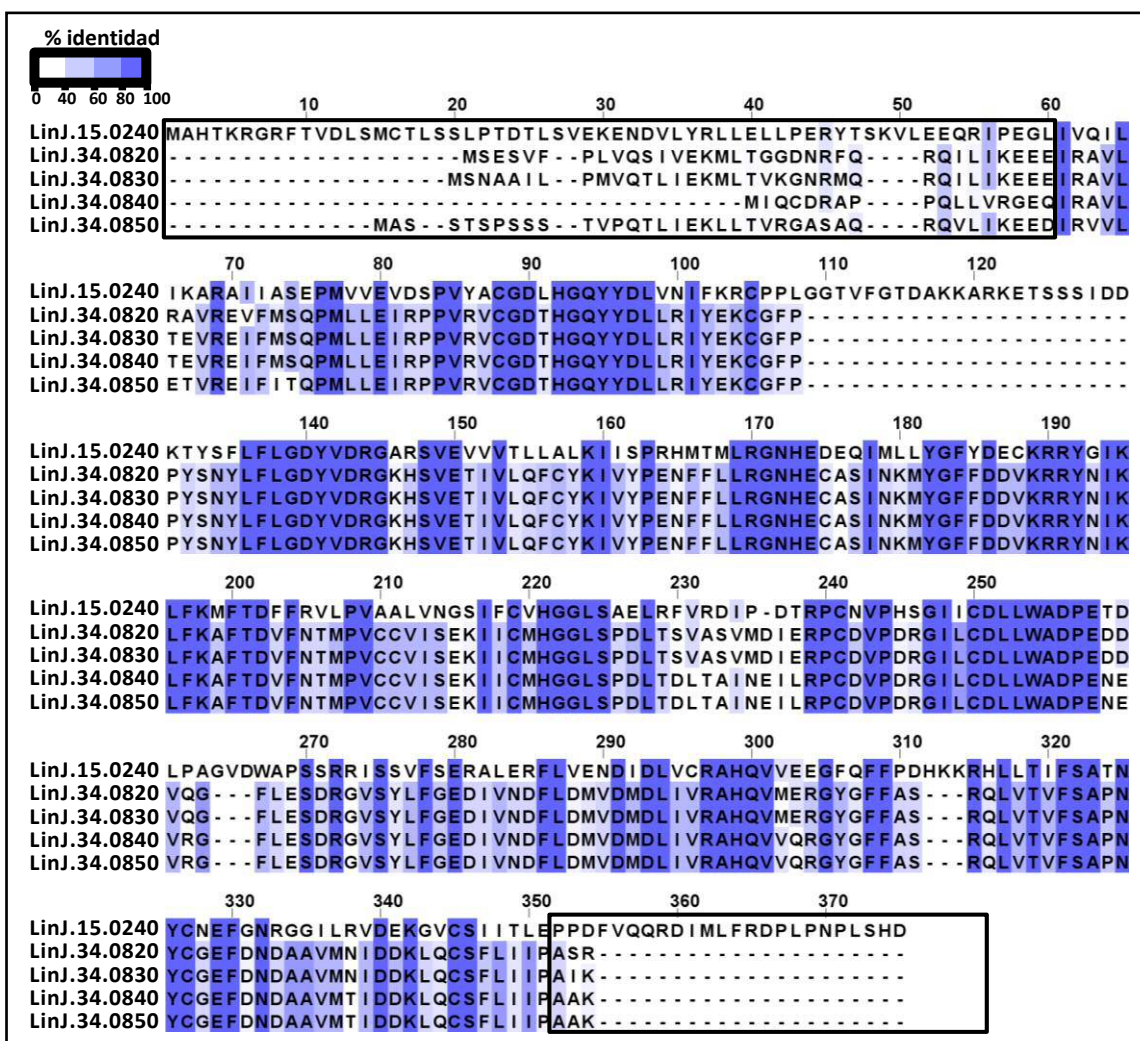


Figura 16. Alineamiento comparativo de la estructura primaria de la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 y de las PP1 representadas por el *cluster* PP1-34. Se muestra el grado de identidad de las secuencias de aminoácidos de la PP1 codificadas por el gen LinJ.15.0240 y los cuatro genes representados por el *cluster* PP1-34 – LinJ.34.0820; LinJ.34.0830; LinJ.34.0840; LinJ.34.0850 –. Se encuadran las regiones de mayor variabilidad correspondientes a los extremos N-terminal y C-terminal.

Resultados

El alineamiento comparativo de la proteína PP1-240 respecto al *cluster* PP1-34 reveló que más del 30% de la secuencia de aminoácidos de PP1-240 presenta regiones altamente conservadas, con una identidad del 100%. Sin embargo, dichas regiones se intercalan con secuencias no conservadas, representando los extremos N-terminal y C-terminal las áreas de mayor variabilidad. Así pues, la proteína PP1-240 presenta una identidad de secuencia global inferior al 45% en relación con las PP1 codificadas por el cromosoma 34 (Figura 16). Por otra parte, el estudio de las cadenas polipeptídicas del *cluster* PP1-34 (Figura 17) evidenció una identidad de secuencia media superior al 85%, mostrando las cuatro proteínas un núcleo catalítico altamente conservado (98%) y un extremo N-terminal divergente.

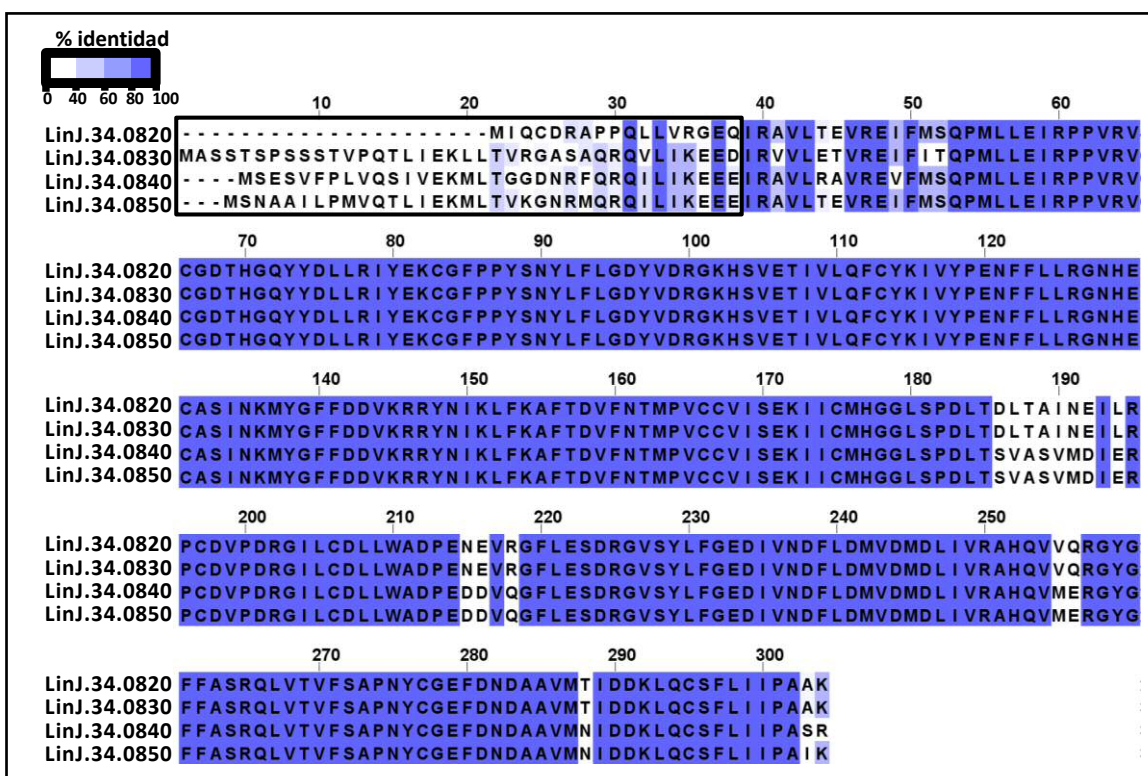


Figura 17. Alineamiento comparativo de las cadenas polipeptídicas de las PP1 codificadas por el cromosoma 34. Se muestra el grado de identidad de las secuencias de aminoácidos de la PP1s codificadas por el *cluster* PP1-34 – LinJ.34.0820; LinJ.34.0830; LinJ.34.0840; LinJ.34.0850 –. Se enmarca la región de mayor variabilidad correspondiente al extremo N terminal.

A continuación, se analizó el grado de conservación de los polipéptidos codificados por los genes ortólogos de LinJ.15.0240 y del *cluster* PP1-34 en las especies más representativas de los géneros *Leishmania* (*L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. braziliensis*) y *Trypanosoma* (*T. cruzi* y *T. brucei*). En el caso de *T. brucei*, no se detectó ningún ortólogo para las PP1 en estudio.

La proteína PP1-240 muestra una identidad de secuencia superior al 90% en todas las especies de *Leishmania* analizadas, mientras que en el caso del género *Trypanosoma* (*T. cruzi*) la identidad es inferior al 70% (Tabla 12). Aunque existe una mayor divergencia en la secuencia de aminoácidos en el género *Trypanosoma*, podemos considerar que la proteína PP1-240 se encuentra conservada en todos los tripanosomátidos estudiados.

Tabla 12. Análisis del grado de conservación de las proteínas codificadas por los genes ortólogos de LinJ.15.0240 en el género *Leishmania* y *Trypanosoma*. Se detalla el porcentaje de identidad de las proteínas codificadas por genes ortólogos de LinJ.15.0240 en el género *Leishmania* (*L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*) y *Trypanosoma* (*T. cruzi*). En el Anexo II se representan los alineamientos correspondientes a los estudios de secuencia de las proteínas codificadas por los genes ortólogos a LinJ.15.0240.

Identidad (%)	
<i>L. donovani</i>	100
<i>L. major</i>	98,1
<i>L. mexicana</i>	97,6
<i>L. braziliensis</i>	92,3
<i>T. cruzi</i>	66,8

En relación a las PP1 codificadas por el cromosoma 34, existe cierta variabilidad respecto al número de genes ortólogos anotados (Tabla 13). En cuanto al género *Leishmania*, no se han identificado ortólogos para la PP1 codificada por el gen LinJ.34.0820 en ninguna otra especie de *Leishmania*, mientras que los genes LinJ.34.0830 y LinJ.34.0850 presentan ortólogos en todas las especies analizadas. En el caso del gen LinJ.34.0840, *L. (V) braziliensis* es la única especie estudiada que carece de ortólogos. Por otro lado, los análisis de secuencia revelan un elevado grado de conservación en todas las proteínas codificadas por los correspondientes genes ortólogos del *cluster* PP1-34, con una identidad superior al 90%. Cabe destacar que las secuencias de aminoácidos ortólogas descritas para *L. donovani* representan aproximadamente el 60% del tamaño molecular de las proteínas de *L. infantum*, debido a la ausencia de la región N-terminal (Anexo III-V). LinJ.34.0850 es el único gen que presenta ortólogos en *T. cruzi*, estando anotados tres genes distintos. Dichos genes codifican tres proteínas ortólogas cuya identidad de secuencia media es inferior al 90% respecto a LinJ.34.0850.

Resultados

Tabla 13. Análisis del grado de conservación de las proteínas codificadas por los genes ortólogos del cluster PP1-34 en el género *Leishmania* y *Trypanosoma*. Se detalla el porcentaje de identidad de las proteínas codificadas por genes ortólogos del cluster PP1-34 en el género *Leishmania* (*L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*) y *Trypanosoma* (*T. cruzi*). Los alineamientos de los genes ortólogos relativos a LinJ.34.0830, LinJ.34.0840 y LinJ.34.0850 están representados en los Anexos III, IV, V, respectivamente.

	Identidad (%)			
	PP1-LinJ.34.0820	PP1-LinJ.34.0830	PP1-LinJ.34.0840	PP1-LinJ.34.0850
<i>L. donovani</i>	-	90,6	100	99,4
<i>L. major</i>	-	97,7	99,7	97,3
<i>L. mexicana</i>	-	97,7	99	97,0
<i>L. braziliensis</i>	-	92,8	-	95,8
<i>T. cruzi</i>	-	-	-	85-90

Posteriormente, se analizó el grado de conservación de la proteína PP1-240 y de la secuencia consenso del cluster PP1-34 respecto a nueve organismos diferentes (Figura 18). Los estudios comparativos de las secuencias de aminoácidos revelaron una identidad media inferior al 45% en el caso de la proteína PP1-240, mientras que el nivel de conservación fue aproximadamente del 60% para el cluster PP1-34. Además, se analizó la presencia de residuos característicos de proteínas tipo serina-treonina fosfatasa en las secuencias de PP1-240 y del cluster PP1-34 (Barton y col., 1994). Todos los residuos previamente identificados en proteínas de tipo serina-treonina fosfatasa están conservados en las secuencias de las PP1 de *L. infantum* en estudio, con excepción de las posiciones 106 (CG), 272 (RG) y 323 (SAPNY) de la proteína PP1-240 que han sido sustituidas por Pro, Arg y Thr, respectivamente. Asimismo, se mantienen invariables los residuos críticos identificados en la interacción con iones metálicos y los sustratos. Por tanto, el alineamiento confirma la conservación de las proteínas PP1-240 y el cluster PP1-34 a lo largo de la evolución.

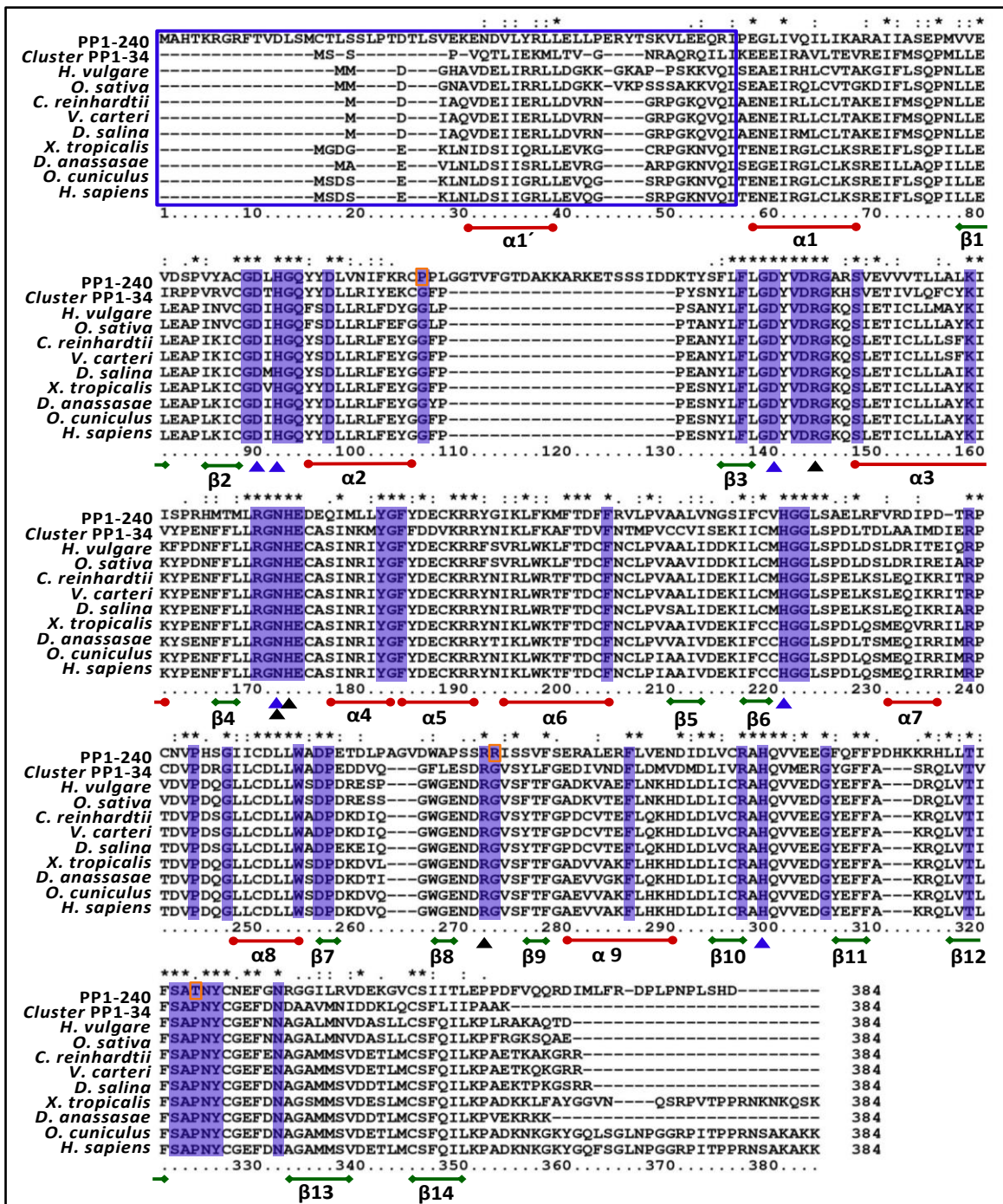


Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína PP1-240 y la secuencia consenso del cluster PP1-34 de *L. infantum* respecto a las PP1 de diferentes organismos. Se resaltan en azul los residuos característicos de proteínas tipo serina-treonina fosfatasa (Barton y col., 1994), recuadrándose en naranja las excepciones observadas en la proteína PP1-240. Las flechas negras y azules indican los residuos catalíticos identificados en la interacción con iones metálicos y los sustratos, respectivamente. Se representa la presumible localización de los elementos hélices alfa (α) y láminas beta (β) derivadas de estudios cristalográficos previos (Egloff y col., 1995). Se recuadra en azul la región N-terminal. El grado de conservación de las cadenas polipeptídicas se define como: idéntica (*); sustitución conservativa (:); sustitución neutral (.). Número de acceso NCBI: *Hordeum. vulgare* (BAK04188.1); *Oryza sativa* (XM015793636.1); *Chlamydomonas reinhardtii* (XP001701579.1); *Volvox carteri* (XP002953868.1); *Dunaliella salina* (AEF79973.1); *Xenopus tropicalis* (NP001120482.1); *Drosophila ananassae* (XP001963846.1); *Oryctolagus cuniculus* (CAA30645.1); *Homo sapiens* (BAG36355.1).

Resultados

Finalmente, se obtuvo un modelado predictivo de la estructura tridimensional de las PP1 de *L. infantum* en estudio. En el caso del *cluster* PP1-34 se estableció como estándar la proteína codificada por el gen LinJ.34.0840 ó PP1-840. Esta proteína se seleccionó en base a estudios previos de expresión génica diferencial (Alcolea, 2010; Alcolea y col., 2016a), donde se observó la sobre-expresión de PP1-840 en promastigotes extraídos del vector *P. perniciosus* respecto a promastigotes de cultivo axénico en fase estacionaria (PNA). En el Anexo VI se representan los modelados de la estructura tridimensional de las proteínas PP1-240 (Anexo VI-A) y PP1-840 (Anexo VI-B), destacándose el núcleo catalítico y el extremo N-terminal de secuencia divergente entre las PP1 en estudio. La secuencia integrada en la región N-terminal forma una alfa hélice que se dispone externamente al núcleo catalítico, por lo que podría representar una región de interacción proteica. En cuanto al extremo C-terminal divergente de PP1-240, aparece como un elemento sin estructura definida.

4.2.- Comprobación de la actividad serina-treonina fosfatasa de la proteína PP1-840.

4.2.1.- Obtención de la PP1-840 en condiciones nativas.

En base a los estudios de la secuencia de aminoácidos del *cluster* PP1-34, donde se evidenció la presencia de un núcleo catalítico conservado común (sección 4.1), se decidió analizar inicialmente la actividad serina-treonina fosfatasa de una de las cuatro PP1 del *cluster* PP1-34. Teniendo en cuenta los análisis de expresión génica diferencial descritos con anterioridad (Alcolea, 2010; Alcolea y col., 2016a) (sección 4.1), se seleccionó la proteína PP1-840.

En primer lugar, se llevó a cabo el clonaje del gen LinJ.34.0840 en el vector pQE-30. Dicha construcción se introdujo en la cepa M15 de *E. coli* para la expresión de la proteína recombinante PP1-840 fusionada a una secuencia de seis histidinas en el extremo N-terminal (PP1-840-R). Aunque el sistema generado dio lugar a niveles elevados de expresión, la proteína PP1-840-R producida resultó ser insoluble (Figura 19 A-1). Por ello, fue necesario desarrollar diferentes estrategias para mejorar la solubilidad de la proteína PP1-840-R en el sistema de expresión procarionta seleccionado (Tabla 14).

Tabla 14. Descripción de los sistemas de expresión probados para la obtención de la proteína PP1-840 en condiciones nativas. Se detallan las características de los sistemas de expresión empleados en *E. coli* implementados a partir del clonaje de PP1-840 en los vectores pQE-30 (A) y pETM-41 (B). Se especifica: cepa de expresión de *E. coli*; factor de solubilización; temperatura (T) de expresión; tiempo de expresión y concentración de IPTG. Abreviaturas: MBP: *Maltose Binding Protein*. Cpn10/Cpn60: chaperonas derivadas de la bacteria psicrófila *Oleispira antarctica*. SH: correcta formación de puentes disulfuro favorecida por la enzima disulfuro isomerasa DsbC presente en la cepa *SHuffle* de *E. coli*.

Sistema de expresión	A.- pQE-30			B.- pETM-41		
	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3
Cepa de <i>E. coli</i>	M15	M15	<i>SHuffle</i> GroEL/GroES (pGro7)	BL21 (DE3)	<i>Arctic express</i> (DE3)	<i>SHuffle</i>
Factor de solubilización	-	GroEL/GroES (pGro7)	+ SH	MBP	MBP +	MBP +
T de expresión (°C)	30	10	10	10	10	10
Tiempo de expresión	3 h	20 h	20 h	20 h	20 h	20 h
IPTG (mM)	1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

De acuerdo al procedimiento descrito por Kelker y col. (2009), se coexpresó la proteína PP1-840-R junto con las chaperonas GroEL/GroES previa transformación del vector pGro7 en la cepa M15 de *E. coli*. Asimismo, para favorecer el correcto plegamiento de PP1-840-R se redujo la cantidad del inductor IPTG (0,05mM) y se ralentizó su producción limitando la temperatura de expresión a 10°C. Sin embargo, los cambios introducidos en el sistema de expresión no mejoraron la solubilidad de la proteína PP1-840-R (Figura 19 A-2). Por ello, se desarrolló una nueva estrategia basada en la expresión de la PP1-840 en las cepa *SHuffle*, las cuales permiten la correcta formación de puentes disulfuro de las proteínas citoplasmáticas sobre-expresadas en *E. coli*. Para ello se cotransformó el vector pQE-30-PP1-840 y el vector pGro7 en la cepa *SHuffle* de *E. coli* y se expresó la proteína PP1-840 siguiendo el protocolo adaptado de Kelker y col. (2009). A pesar de los cambios introducidos, la proteína PP1-840-R se observó en el *pellet* celular junto a los cuerpos de inclusión de *E. coli* (Figura 19 A-3).

Debido a las dificultades descritas para la expresión de la proteína PP1-840 en condiciones nativas, se procedió al clonaje del gen LinJ.34.0840 en el vector pETM-41. Este vector permite la expresión de PP1-840 como una proteína de fusión con el *tag* MBP (*Maltose Binding Protein*) en el extremo C-terminal, facilitando su plegamiento y solubilización. Para ello, se llevó a cabo la expresión de la proteína PP1-840-MBP siguiendo el protocolo previamente descrito en tres cepas distintas de *E. coli*: BL21 (DE3), *Arctic express* (DE3) y *SHuffle*. A diferencia de la cepa BL21 (DE3), las células *Arctic express* (DE3) expresan constitutivamente las chaperonas Cpn10/Cpn60 derivadas de la bacteria psicrófila *Oleispira antarctica*. Sin embargo, tanto la expresión de PP1-840-MBP en las células BL21 (DE3) como en la estirpe *Arctic express* (DE3) dio lugar a una proteína insoluble (Figura 19 B-1 y B-2). Finalmente, la expresión de la proteína PP1-840-MBP en las células *SHuffle* de *E. coli* condujo a la obtención de la proteína en condiciones nativas (Figura 19 B-3).

Resultados

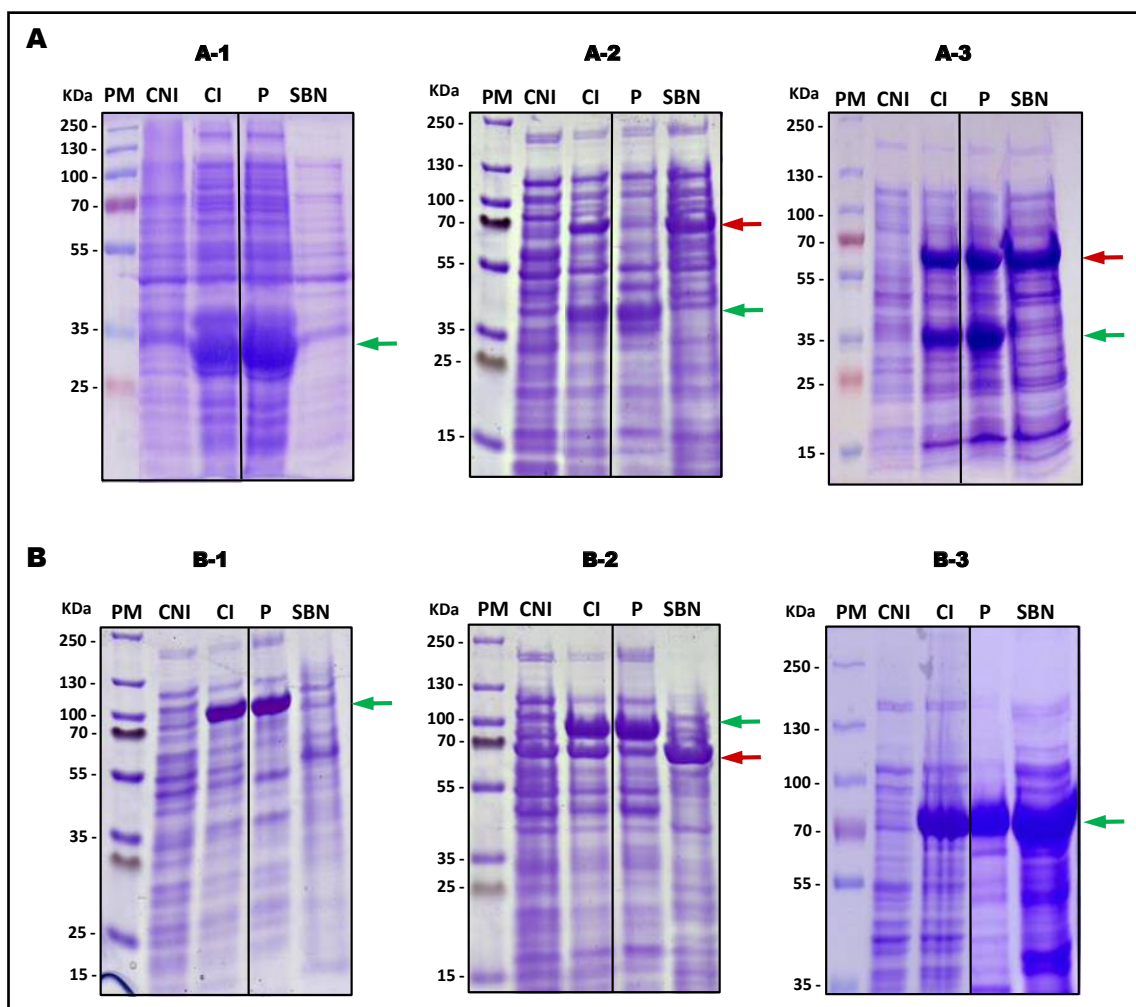


Figura 19. Análisis de solubilidad de la proteína PP1-840 en los sistemas de expresión de *E. coli* empleados. Electroforesis en SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos a partir de las cepas de *E. coli* transformadas con los vectores pQE-30-PP1-840 (A) y pETM-41-PP1-840 (B) para evaluar la solubilidad de la proteína PP1-840. PM: peso molecular; CNI: cultivo no inducido; CI: cultivo inducido; P: fracción de proteínas insolubles tras la lisis del cultivo inducido; SBN: fracción de proteínas solubles tras la lisis del cultivo inducido. Flecha verde: peso molecular de la proteína PP1-840 expresada a partir de los vectores pQE-30 (35,7 kDa) y pETM-41 (78,3 kDa). Flecha roja: peso molecular de las chaperonas utilizadas en los sistemas A-2; A-3 y B-2. Las características de los sistemas de expresión así como las cepas de *E. coli* empleadas se describen en la Tabla 14.

Tras la obtención de la proteína PP1-840 en condiciones nativas, se intentó producir la proteína PP1-240 de acuerdo al protocolo de solubilización definido. Para ello, se clonó la secuencia sintética optimizada del gen LinJ.15.0240 en el vector pETM-41. Esta optimización de secuencia permitió eliminar los codones de LinJ.15.0240 presentes con baja frecuencia en *E. coli*. Sin embargo, la expresión de PP1-240-MBP en la cepa *SHuffle express* dio lugar a una proteína insoluble (Anexo VII), por lo que no fue posible comprobar su actividad serina-treonina fosfatasa.

4.2.2.- Purificación y evaluación de la actividad serina-treonina fosfatasa de la proteína PP1-840-MBP.

Una vez establecido el sistema de expresión de la proteína PP1-840 a partir del vector pETM-41 en las células de *E. coli* SHuffle (sección 4.2.1), se llevó a cabo la purificación de la proteína PP1-840-MBP mediante cromatografía de afinidad con níquel (Figura 20). La selección de este sistema se basó en la presencia de dos *tag* de seis histidinas localizados en los extremos N- terminal y C-terminal de la proteína PP1-840-MBP, respectivamente. La purificación de PP1-840-MBP permitió obtener fracciones proteicas con elevado rendimiento (~5mg/L). Sin embargo, se observó la presencia de bandas minoritarias con tamaños moleculares inferiores y superiores al esperado. Los estudios por *Western blot* mediante un anticuerpo anti-poli-histidinas permitieron correlacionar dichas bandas con agregados y formas truncadas o productos de degradación de la proteína PP1-840-MBP (Anexo VIII). Además, el análisis de secuencia del gen LinJ.34.0840 reflejó la presencia de 32 codones raros (Anexo IX).

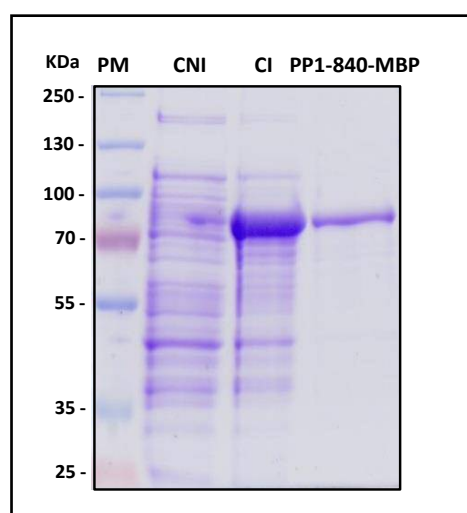


Figura 20. Purificación de la proteína recombinante PP1-840-MBP en condiciones nativas. Electroforesis en SDS-PAGE de la proteína recombinante PP1-840-MBP purificada por cromatografía de afinidad. PM: peso molecular; CNI: cultivo no inducido; CI: cultivo inducido con IPTG. Tinción: azul de *Coomassie*.

Tras confirmar la correspondencia de las bandas de menor tamaño con la proteína PP1-840-MBP, se llevó a cabo la cuantificación de la proteína purificada por el método de *Bradford* y se analizó su actividad serina-treonina fosfatasa (Figura 21). En el ensayo enzimático se utilizó el sustrato comercial 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP) (*Molecular Probes*®). La desfosforilación de DiFMUP da lugar a la formación del producto fluorescente 6,8-difluoro-4-metilumbeliferilo (DiMU), el cual se excita a una longitud de onda de 358nm. La actividad enzimática se determinó a partir de una curva patrón de DiFMU teniendo en cuenta que 1 nmol de DiFMU producido equivale a 1 nmol de fosfato liberado.

Resultados

La incubación de la proteína PP1-840 con el sustrato DiFMUP confirmó la presencia de actividad serina-treonina fosfatasa (Figura 21-A). Sin embargo, el estudio enzimático comparativo de PP1-840-MBP con la proteína control recombinante PP1 β del hombre, reveló un nivel de actividad 40 veces inferior de la proteína recombinante de *L. infantum* PP1-840-MBP (Figura 21-B) (sección 3.8.).

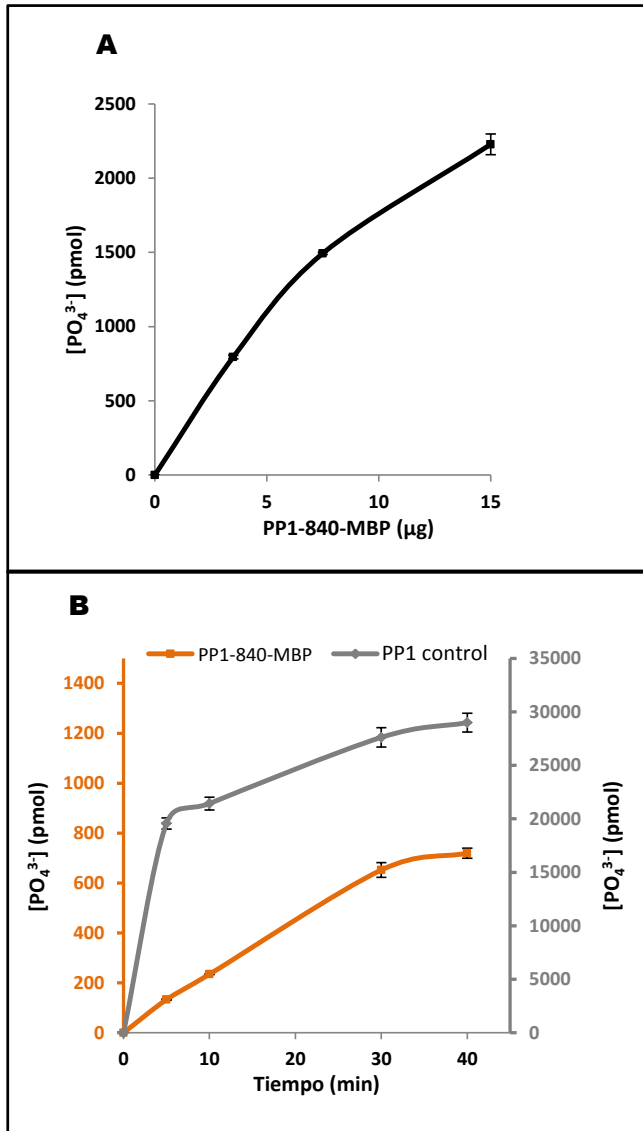


Figura 21. Análisis de la actividad enzimática de la proteína PP1-840-MBP. A. Estudio de la actividad serina-treonina fosfatasa de concentraciones variables de la proteína PP1-840-MBP frente a concentraciones equivalentes de sustrato DiFUMP. B. Estudio comparativo de la actividad serina-treonina fosfatasa de la proteína PP1-840-MBP (eje Y primario) respecto a la proteína control PP1 β humana (eje Y secundario). Se representa la concentración media de fosfato liberado calculado a partir de un experimento realizado por duplicado. Las barras de error corresponden con la desviación estándar de cada punto de la curva.

4.3.- Análisis de la expresión de PP1-240 y del cluster PP1-34.

4.3.1.- Niveles de ARNm determinados por qRT-PCR.

Se estudiaron los niveles de expresión a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum* del gen LinJ.15.0240 y del cluster PP1-34 —LinJ.34.0820, LinJ.34.0830, LinJ.34.0840 y LinJ.34.0850—mediante qRT-PCR.

La expresión en el estadio promastigote se evaluó tanto en promastigotes en cultivo axénico como en promastigotes obtenidos del vector *P. perniciosus*. Para la obtención de promastigotes de cultivo *in vitro* se inició una curva de crecimiento a partir de 2×10^6 promastigotes/ml y se tomaron muestras cada 24 horas durante 7 días (Figura 22-A). Además, tras alcanzar el cultivo la fase estacionaria, se aislaron los promastigotes más infectivos mediante el procedimiento de selección negativa con lectina de cacahuete (PNA) descrito con anterioridad (sección 3.2.2.2.). La correcta selección de la población infectiva no aglutinante (PNA^-) fue comprobada por microscopía óptica (Figura 22-B). Los promastigotes diferenciados en el tubo digestivo de hembras de *P. perniciosus* (Pro-Pper) fueron extraídos por el Dr. Ricardo Molina y la Dra. Maribel Jiménez (Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, ISCIII, Majadahonda) (sección 3.2.2.3.).

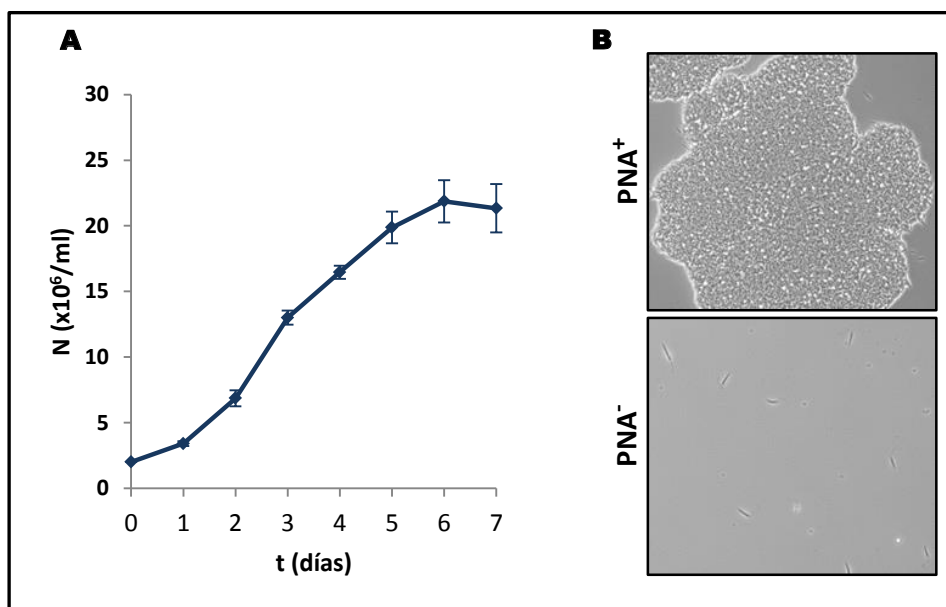


Figura 22. Selección negativa de promastigotes de cultivo axénico en fase estacionaria con aglutinina de cacahuete (PNA). A. Curva de crecimiento de promastigotes de cultivo *in vitro*. N es la densidad celular media obtenida a partir de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar en cada punto de la curva. B. Aislamiento de los promastigotes de cultivo *in vitro* en fase estacionaria (día 7) en las subpoblaciones aglutinantes (PNA^+) y no aglutinantes (PNA^-) mediante centrifugación diferencial.

Para el análisis de los niveles de expresión de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en el estadio amastigote, se infectaron células diferenciadas de la línea U937 con promastigotes de cultivo *in vitro* en fase estacionaria (día 7) (sección 3.2.2.4.). La infección se comprobó por observación directa de los amastigotes intracelulares teñidos con *Giemsa* modificado mediante microscopía óptica (Figura 23).

Resultados

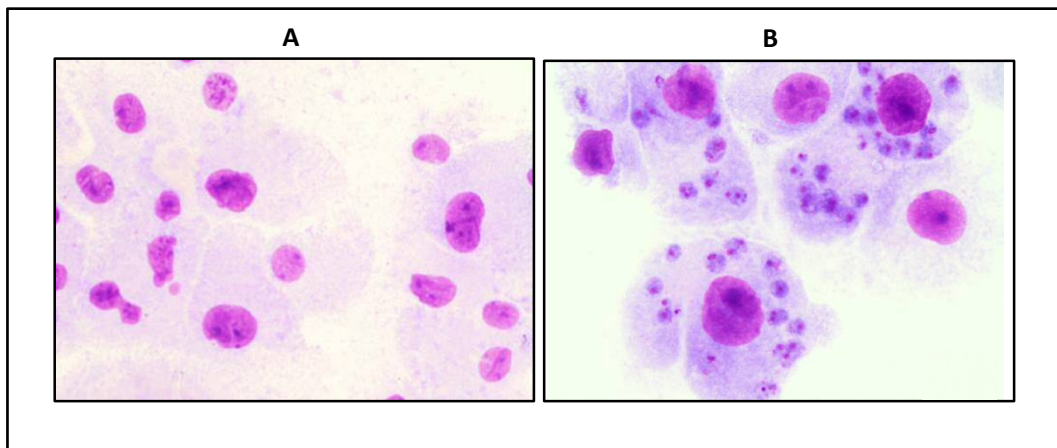


Figura 23. Detección de amastigotes intracelulares mediante microscopía óptica en cultivos de la línea celular U937 infectada *in vitro*. A. Línea celular U937 estimulada con PMA (20 ng/ml). B. Línea celular U937 estimulada con PMA tras 48 h post-infección con promastigotes axénicos en fase estacionaria. Tinción con *Giemsa* modificado. Objetivo: 40X.

Una vez obtenidas las muestras, se extrajo el ARN total de las poblaciones en estudio con *TRIzol Reagent*[®] (sección 3.4.3.). Además, debido a la limitación en la cantidad de muestra de ARN en el caso de Pro-Pper, PNA⁻ y amastigotes, fue necesario amplificar el ARNm (ARNa) (Figura 24). Este procedimiento de amplificación se realizó en todas las muestras para que pudieran ser comparables. A partir del ARNa obtenido, se sintetizó el ADNc y se llevaron a cabo los análisis de expresión diferencial por qRT-PCR.

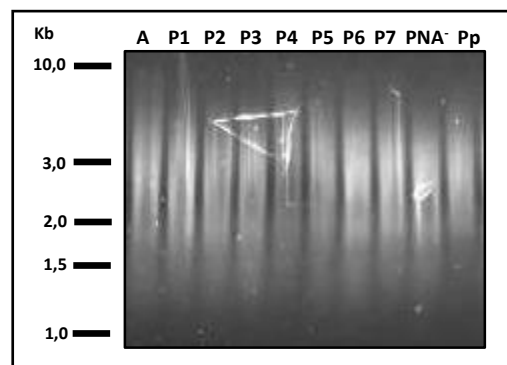


Figura 24. Análisis de la calidad del ARNm amplificado (ARNa). Electroforesis en gel de agarosa de la réplica 1 de las muestras de ARNa. Abreviaturas: (A) amastigotes intracelulares; (P) promastigotes obtenidos de los días 1 al 7 de la curva de crecimiento; (PNA⁻) promastigotes en fase estacionaria aislados mediante selección negativa con lectina de cacahuete; Pp: promastigotes extraídos del vector *P. perniciosus*.

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 a lo largo de la curva de crecimiento de los promastigotes en cultivo axénico. En la Figura 25 se representa la ratio de expresión relativa observada en promastigotes axénicos en cada día de la curva (día 1-7) respecto al día 1. Aunque en todos los casos se hallaron pequeñas variaciones en el perfil de expresión génica, los cálculos realizados revelaron ratios de expresión próximos a 1. Por tanto, estos datos sugieren que las PP1 presentan

niveles de expresión constantes a lo largo de la curva de crecimiento en promastigotes de cultivo *in vitro*.

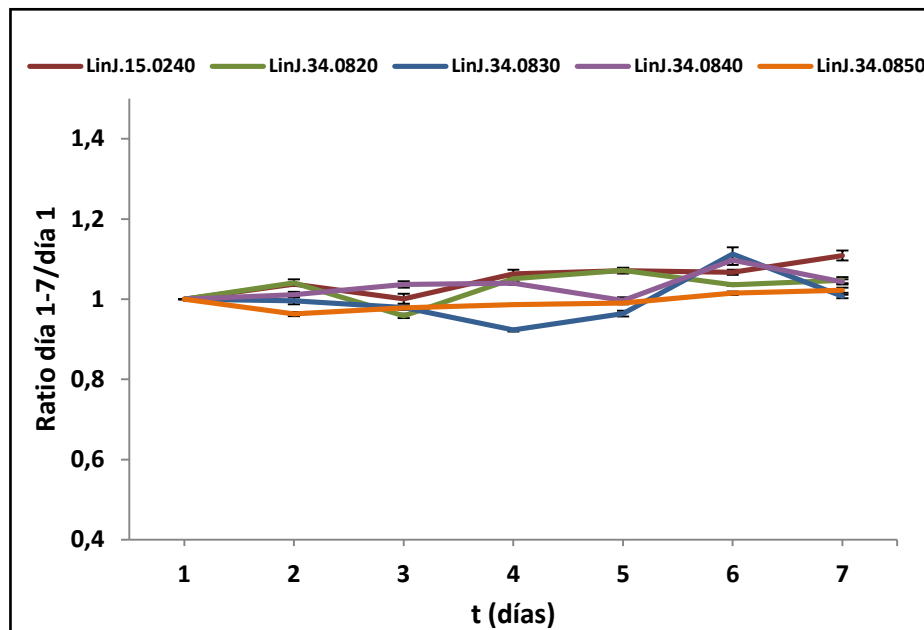


Figura 25. Niveles de expresión relativos de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en la curva de crecimiento de promastigotes de *L. infantum*. El gráfico muestra las ratio de expresión media de las PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en cada día de la curva de crecimiento (1-7) con respecto al día 1, según se ha determinado por qRT-PCR. Los resultados representan el nivel de expresión medio calculado por el método ΔCt a partir de diluciones seriadas de un experimento realizado por triplicado. El gen GAPDHg fue empleado como *housekeeping*. El análisis estadístico fue realizado con el *software SigmaPlot 11* mediante el test de la *t* de *Student* pareado. Todos los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$) excepto la ratio día 2/día 1 en LinJ34.0820; ratio día 3/día 1 en LinJ15.0240 y LinJ34.0820, así como la ratio día 5/día 1 en LinJ34.0820 y LinJ34.0840. Para discriminar entre las diferentes proteínas codificadas por el cromosoma 34 se diseñaron sondas *TaqMan-MGB* específicas de la región N-terminal, mientras que para PP1-240 se utilizó el agente intercalante *SYBR-Green*.

Posteriormente, se compararon los niveles de expresión de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 detectados en promastigotes en fase logarítmica (día 1) y estacionaria (día 7) respecto a los niveles hallados en PNA⁻, Pro-Pper y amastigotes intracelulares (Figura 26). Aunque se observan niveles de expresión variables de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en las tres poblaciones mencionadas respecto a promastigotes en cultivo axénico, estos valores representan en todos los casos tasas de variación menores a 1,7. Destacan los genes LinJ.15.0240 y LinJ.34.0850, con mayores niveles de expresión en Pro-Pper respecto a promastigotes en fase estacionaria. Además, los 5 genes en estudio presentan un perfil de expresión inferior en PNA⁻ respecto a promastigotes de cultivo axénico, entre los que cabe mencionar LinJ.34.0820 y LinJ.34.0830 por su mayor nivel de sub-expresión. En cuanto a los estudios de expresión génica llevados a cabo en amastigotes intracelulares, se observan pequeñas variaciones respecto a los promastigotes de cultivo axénico, con ratios de expresión próximos a 1 en todos los casos.

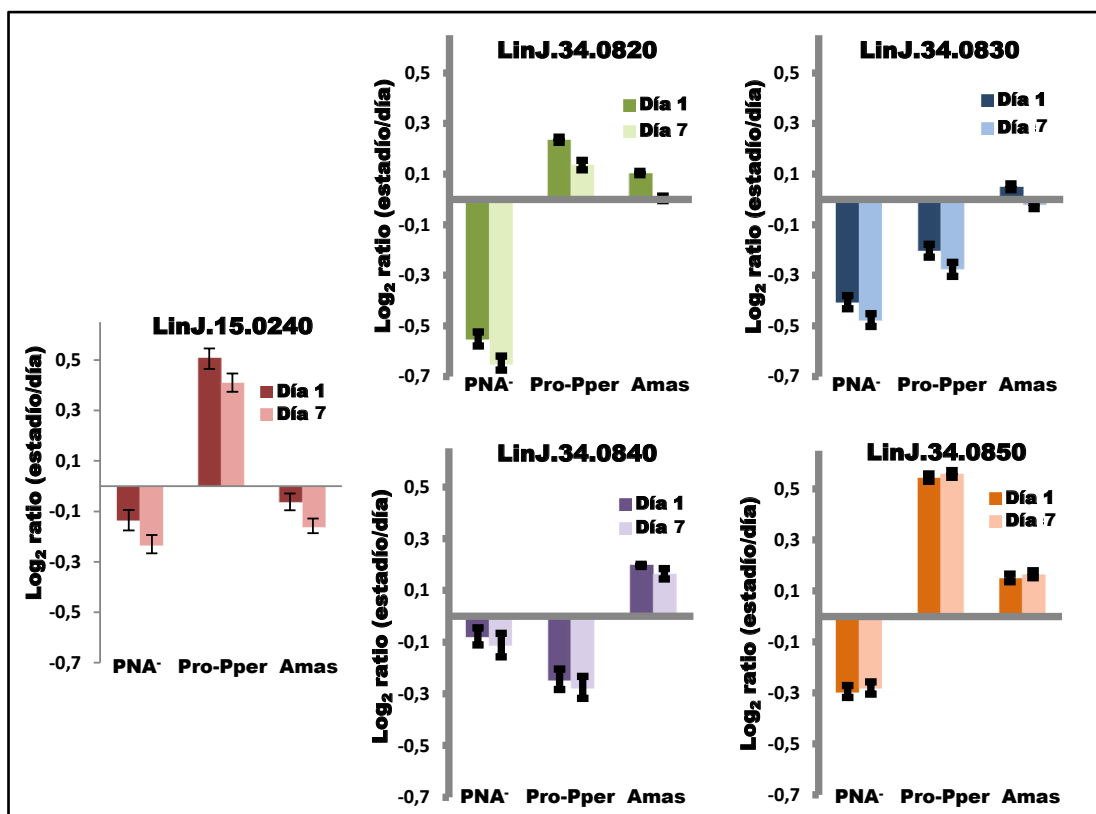


Figura 26. Niveles de expresión relativos de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en PNA⁻, Pro-Pper y amastigotes intracelulares respecto a promastigotes de cultivo axénico en fase logarítmica y estacionaria determinado por qRT-PCR. Los histogramas muestran el log₂ de las ratios de expresión media de PNA⁻, Pro-Pper y Amas respecto a promastigotes axénicos a día 1 (fase logarítmica) y día 7 (fase estacionaria). Los valores positivos y negativos indican los niveles de expresión génica como sobre-expresado y sub-expresado, respectivamente. PNA⁻, población de promastigotes axénicos en fase estacionaria aislados por selección negativa con lectina de cacahuate; Pro-Pper, promastigotes obtenidos del tubo digestivo anterior de vector *P. perniciosus*; y Amas, amastigotes intracelulares obtenidos por infección de células U937 con promastigotes estacionarios de cultivo axénico. Las ratios y desviaciones estándar fueron calculados empleando el método Δ Ct a partir de diluciones seriadas de un experimento realizado por triplicado. El gen GAPDHg fue empleado como control endógeno. La significancia estadística ($p < 0,01$) fue calculada usando el test de la *t* de Student mediante el *software SigmaPlot* 11. Todos los resultados fueron estadísticamente significativos excepto el log₂ ratio Amas/día 7 en LinJ34.0820.

El estudio comparativo de los niveles de expresión génica observados en promastigotes extraídos del vector *P. perniciosus* respecto a promastigotes PNA⁻ procedentes de cultivo axénico, reflejan variaciones en los perfiles de expresión de las cinco PP1 en estudio (Figura 27). Los genes LinJ.15.0240, LinJ.34.0820, y LinJ.34.0850 se encuentran sobre-expresados en Pro-Pper respecto a PNA⁻, presentando LinJ.34.0820 y LinJ.34.0850 una tasa de variación superior a 1,7.

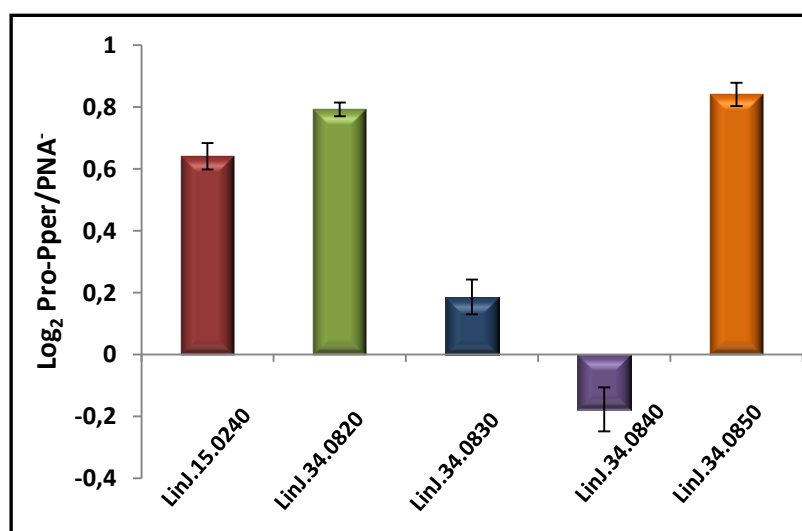


Figura 27. Niveles de expresión relativos de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en Pro-Pper respecto a PNA⁻ determinado por qRT-PCR. Los histogramas muestran el log₂ de las ratios de expresión media de Pro-Pper respecto a PNA⁻. Los valores positivos y negativos indican los niveles de expresión génica como sobre-expresado y sub-expresado, respectivamente. Pro-Pper, promastigotes obtenidos del tubo digestivo anterior de vector *P. perniciosus*; PNA⁻, población de promastigotes axénicos en fase estacionaria aislados por selección negativa con lectina de cacahuete. Las ratios y desviaciones estándar fueron calculados empleando el método Δ Ct a partir de diluciones seriadas de un experimento realizado por triplicado. El gen GAPDHg fue empleado como control endógeno. El análisis estadístico fue realizado con el *software* SigmaPlot 11 mediante el test de la *t* de Student pareado. Todas las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

4.3.2.- Estimación de los niveles de proteína por Western blot.

4.3.2.1.- Obtención de los anticuerpos policlonales anti-PP1-240 y anti-PP1C-34.

Para el estudio de los niveles de expresión de la proteína PP1-240 y de las PP1 codificadas por el cromosoma 34 se generaron anticuerpos policlonales específicos en conejos *New Zealand White*. En el caso de la proteína PP1-240 se obtuvieron dos anticuerpos. Inicialmente, se generó un anticuerpo policlonal frente al extremo N-terminal de la proteína PP1-240 (anti-PP1-240N) a partir de un péptido sintetizado químicamente conjugado con BSA como *carrier* (PP1-240N-BSA) (sección 3.9.). Sin embargo, los estudios de expresión complementarios realizados en los transfectantes de sobre-expresión requirieron el desarrollo de un nuevo anticuerpo policlonal frente a la proteína completa PP1-240 (anti-PP1-240). Como primera aproximación para el análisis del *cluster* PP1-34, se generó un anticuerpo policlonal a partir de la región catalítica común de dichas proteínas (PP1C-34). El anticuerpo anti-PP1C-34 permite abordar el estudio del *cluster* PP1-34 desde un enfoque global, ya que no discrimina entre las diferentes isoformas.

Para la producción de los anticuerpos policlonales anti-PP1-240 y anti-PP1C-34 fue necesario llevar a cabo el clonaje y la expresión de las proteínas recombinantes PP1-240-R y PP1C-34-R. En primer lugar, se clonó el gen LinJ.15.0240 y la secuencia codificante de la región catalítica común del *cluster* PP1-34 en el vector pQE-30 para su expresión en la cepa

Resultados

M15 de *E. coli*. Este sistema permite sobre-expresar las proteínas recombinantes PP1-240R y PP1C-34R fusionadas a una secuencia de seis histidinas en el extremo N-terminal para su posterior purificación por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} (sección 3.5.2.). El proceso de purificación llevado a cabo dio lugar a fracciones proteicas con un elevado rendimiento en ambos casos ($\sim 5\text{mg/L}$) (Figura 28). Sin embargo, la concentración de las fracciones purificadas puso de manifiesto la presencia de bandas minoritarias con un peso molecular superior e inferior al tamaño esperado de las proteínas PP1-240-R (43,8 KDa) y PP1C-34-R (30,9 KDa) (Anexo X). Los estudios por *Western blot* mediante un anticuerpo anti-polihistidinas permitieron correlacionar dichas bandas con agregados y formas truncadas o productos de degradación de las proteínas en estudio. Además, se analizó el número de codones raros presentes en las proteínas PP1-240 y PP1C-34 respecto a la frecuencia de uso de codones en *E. coli* (Anexo XI). Dicho examen reveló la existencia de 32 y 14 codones raros presentes en las secuencias codificantes de las proteínas PP1-240 y PP1C-34, respectivamente, lo que justificaría la aparición de bandas de menor tamaño por interrupción de la síntesis de los polipéptidos en cuestión.

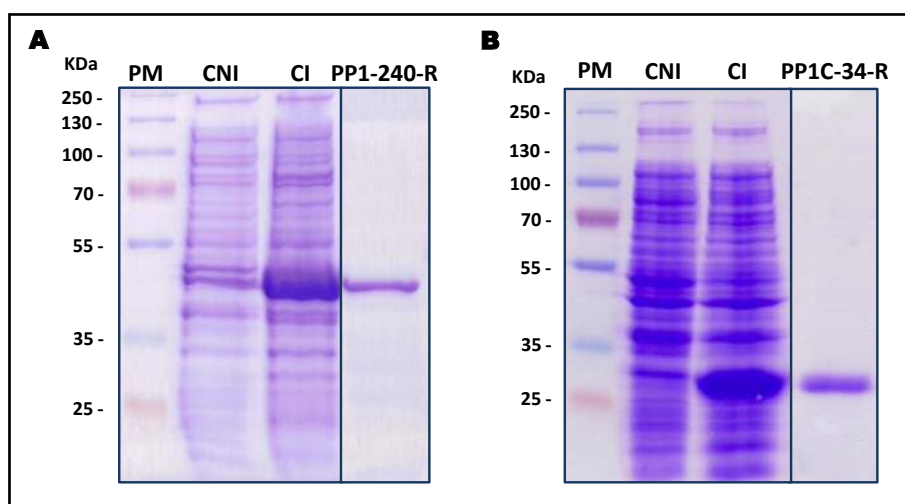


Figura 28. Purificación en condiciones desnaturalizantes de las proteínas recombinantes PP1-240-R y PP1C-34-R. Electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas recombinantes PP1-240-R (A) y PP1C-34-R (B) purificadas por cromatografía de afinidad. PM: peso molecular; CNI: cultivo no inducido; CI: cultivo inducido con IPTG durante 3 horas a 37°C para la expresión de las proteínas recombinantes clonadas en el vector pQE-30. Tinción de los geles con azul de *Coomassie*.

A continuación, se inmunizaron dos conejos con las proteínas purificadas PP1-240-R y PP1C-34-R para la obtención de los respectivos anticuerpos policlonales anti-PP1-240 y anti-PP1C-34 (sección 3.9.). La presencia de las formas truncadas no supuso una limitación en el proceso de inmunización, ya que éstas representaban una proporción despreciable frente a los altos rendimientos obtenidos en la purificación de las formas completas de las proteínas PP1-240-R y PP1C-34-R. Asimismo, de acuerdo al protocolo descrito (sección 3.9.), se inmunizó a los conejos con el péptido PP1-240N-BSA para la obtención del anticuerpo policlonal anti-PP1-240N. Una vez obtenidos los tres sueros policlonales

mencionados, se procedió a su análisis y titulación, estableciendo como control el suero pre-inmune obtenido previamente al periodo de inmunización.

4.3.2.2.- Detección de la abundancia de proteína en promastigotes en cultivo axénico.

Se estudiaron los niveles de expresión de la proteína PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en promastigotes en cultivo axénico mediante *Western blot*. Para ello, se obtuvieron extractos proteicos totales durante el proceso de diferenciación de los promastigotes en cultivo (día 1-7) y se cuantificaron por el método de *Bradford* (secciones 3.6.1. y 3.6.3.).

Los análisis de expresión por *Western blot* en promastigotes axénicos con el anticuerpo policlonal anti-PP1-240N, reflejaron una abundancia constante de PP1-240 a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 29). De acuerdo al peso molecular teórico esperado, la proteína recombinante control PP1-240-R fusionada a la secuencia de seis histidinas (43,8 kDa) presentó un tamaño ligeramente superior al de la proteína PP1-240 silvestre (42,4 kDa) detectada en promastigotes axénicos de *L. infantum*. Por tanto, los estudios de expresión génica de LinJ.15.0240 evaluados tanto a nivel de proteína como a nivel de transcrito revelan que PP1-240 se expresa constitutivamente en promastigotes axénicos de *L. infantum*.

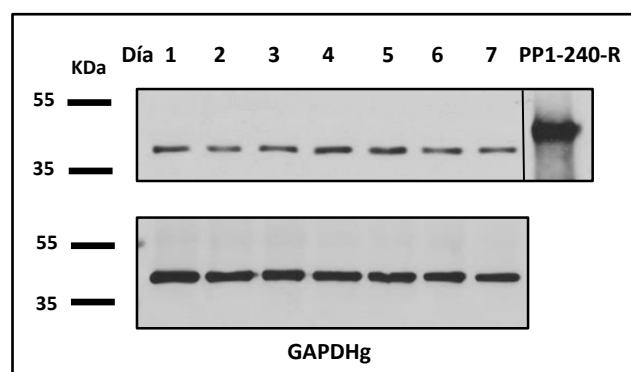


Figura 29. Estudio de los niveles de expresión de la proteína PP1-240 en la curva de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico de *L. infantum*. Perfil de expresión de PP1-240 analizado por *Western blot* mediante el anticuerpo policlonal anti-PP1-240N (1:500) a lo largo de la curva de crecimiento de promastigotes de cultivo *in vitro* (día 1-7). La GAPDHg se empleó como control de carga. Extractos totales cargados por pocillo: 25 µg. PP1-240-R es la proteína PP1-240 recombinante purificada por cromatografía de afinidad (0,1 µg).

Los análisis de expresión génica del *cluster* PP1-34 determinados por *Western blot* mediante el anticuerpo anti-PP1C-34, pusieron de manifiesto la presencia de una banda con un tamaño molecular próximo a 35 kDa en todos los días de la curva (día 1-7) (Figura 30) coincidiendo con el tamaño molecular teórico medio de las PP1 codificadas por el *cluster* 34 (~34,5 kDa), a excepción de la proteína representada por el gen LinJ.34.0820

Resultados

(32,5 kDa) (Anexo I). La proteína control PP1C-34-R (30,9 kDa) muestra un tamaño molecular inferior que la banda reconocida por el anticuerpo anti-PP1C-34 en promastigotes de *L. infantum*, puesto que la proteína recombinante constituye únicamente la región catalítica común del *cluster* PP1-34. El estudio por *Western blot* detectó niveles regulares de las proteínas codificadas por el *cluster* PP1-34 a lo largo de la curva de crecimiento, con un ligero incremento de su abundancia en promastigotes en fase estacionaria (Figura 30).

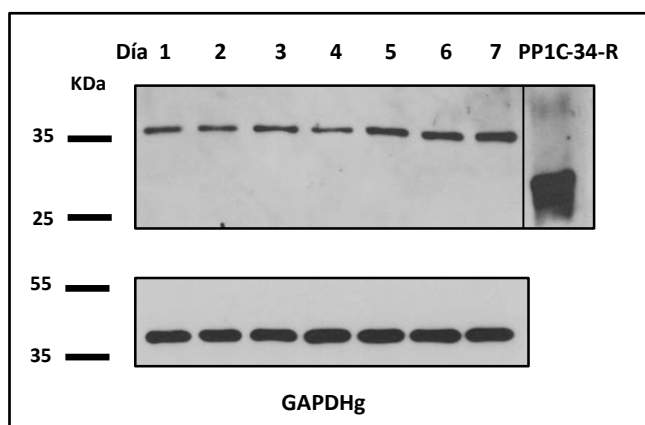


Figura 30. Estudio de los niveles de expresión del *cluster* PP1-34 en la curva de crecimiento de promastigotes de cultivo *in vitro* de *L. infantum*. Perfil de expresión del *cluster* PP1-34 analizado por *Western blot* mediante el anticuerpo policlonal anti-PP1C-34 (1:500) a lo largo de la curva de crecimiento de promastigotes de cultivo *in vitro* (día 1-7). La GAPDHg se empleó como control de carga. Extractos totales cargados por pocillo: 25 µg. PP1C-34-R es la proteína recombinante PP1C-34 purificada por cromatografía de afinidad (0,1 µg).

4.3.2.3.- Detección de la abundancia de proteína en el estadio amastigote.

Para completar el estudio de expresión de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en el ciclo biológico de *L. infantum*, se determinó por *Western blot* la abundancia de dichas proteínas en amastigotes intracelulares y en amastigotes axénicos. Los amastigotes intracelulares fueron obtenidos a partir de células U937 infectadas *in vitro* con promastigotes en cultivo axénico en fase estacionaria (sección 4.3.1). La diferenciación de los amastigotes axénicos se indujo mediante el cultivo *in vitro* de promastigotes en medio completo ácido (pH 5,5) y una temperatura de 37°C en una atmósfera controlada con un 5% de CO₂ (sección 3.2.2.1.). Los extractos proteicos totales fueron cuantificados por el método de *Bradford*.

Los análisis por *Western blot* mediante el anticuerpo anti-PP1-240N pusieron de manifiesto la expresión de PP1-240 tanto en amastigotes intracelulares como en amastigotes axénicos (Figura 31). Según los estudios realizados con el anticuerpo anti-PP1C-34, no se detectó la presencia del *cluster* PP1-34 en las poblaciones de amastigotes en estudio.

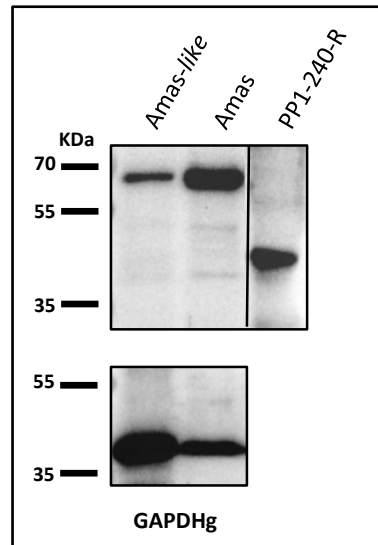


Figura 31. Estudio de los niveles de expresión de la proteína PP1-240 en amastigotes de *L. infantum*. Detección de la abundancia de PP1-240 mediante *Western blot* con el anticuerpo primario policlonal anti-PP1-240N (1:500) en amastigotes axénicos (*Amas-like*) y amastigotes intracelulares aislados de células U937 (*Amas*) a partir de 25 µg de extractos proteicos totales. La proteína GAPDHg se empleó como control de carga. PP1-240-R es la proteína recombinante PP1-240 purificada por cromatografía de afinidad (0,1 µg).

4.4.- Estudio de la localización subcelular de PP1-240 y del *cluster* PP1-34.

4.4.1.- Localización subcelular en promastigotes de cultivo axénico.

La localización subcelular de la proteína PP1-240 y del *cluster* PP1-34 fue analizada en promastigotes de cultivo axénico de *L. infantum* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se emplearon los anticuerpos policlonales específicos anti-PP1-240N y anti-PP1C-34 en asociación con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (sección 3.7.).

El estudio de localización subcelular mediante el anticuerpo anti-PP1-240N determinó la presencia de PP1-240 principalmente en el bolsillo flagelar y a lo largo de toda la extensión del apéndice flagelar de *L. infantum* (Figura 32). Los promastigotes marcados con el anticuerpo anti-PP1C-34 evidenciaron la localización subcelular del *cluster* PP1-34 en el bolsillo flagelar (Figura 33) y el extremo más distal del flagelo (detalle de Figura 13, Anexo XII). Asimismo, se observó un punteado citoplasmático fluorescente de baja intensidad en los promastigotes marcados con anti-PP1-240N y anti-PP1C-34 que no colocaliza con el ADN nuclear ni con el kinetoplasto. Por tanto, las proteína-fosfatasas en estudio se localizan principalmente en la región flagelar de los promastigotes axénicos de *L. infantum*.

Resultados

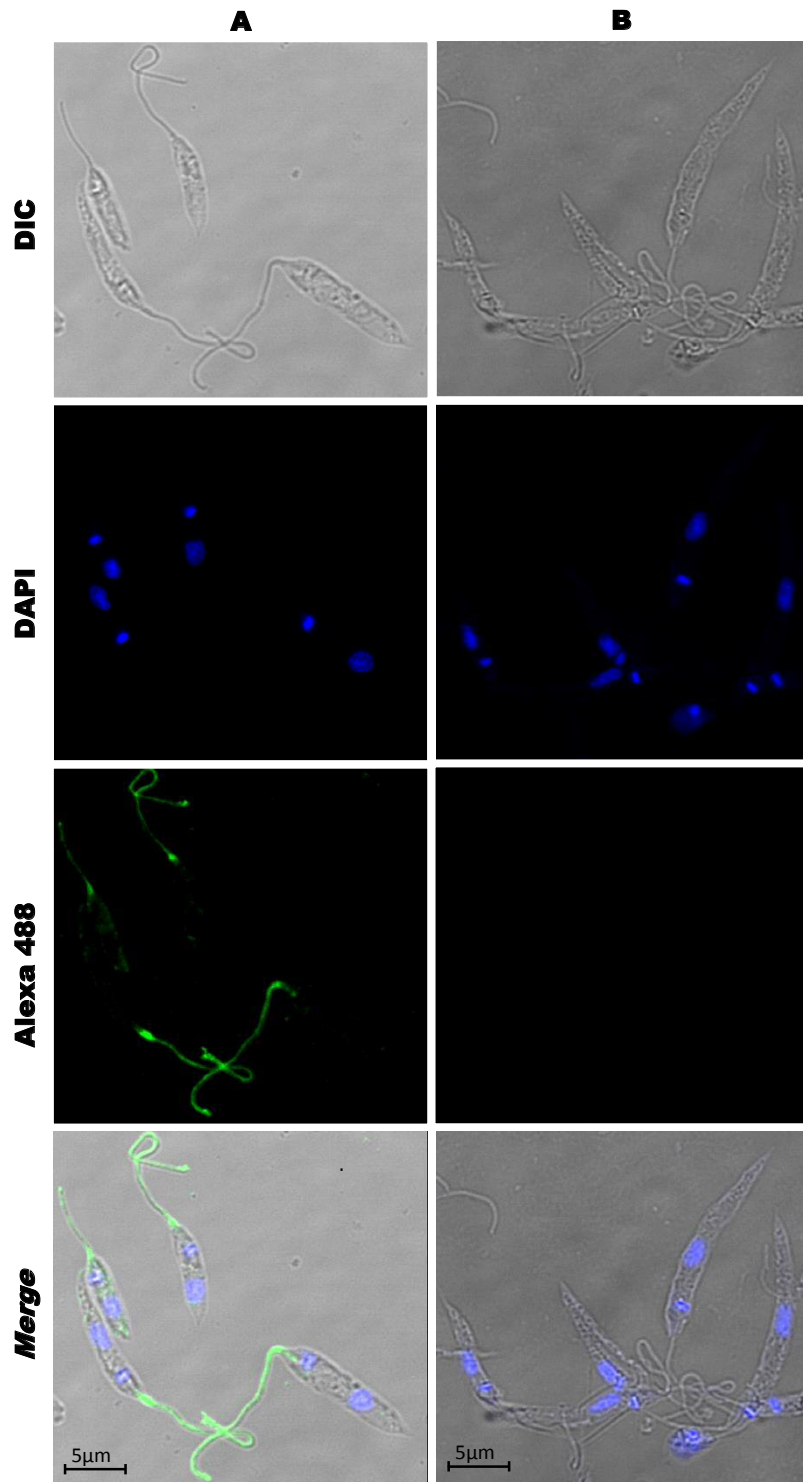


Figura 32. Localización subcelular de PP1-240 en promastigotes de *L. infantum*. A. Análisis mediante inmunofluorescencia indirecta de la proteína PP1-240 en promastigotes de cultivo axénico. B. Promastigotes incubados con el anticuerpo control (suero pre-inmune). DIC, imagen de contraste interferencial; DAPI, fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto; anti-PP1 240N conjugado con Alexa 488 (verde); *Merge*, composición de las imágenes DIC, DAPI y Alexa 488.

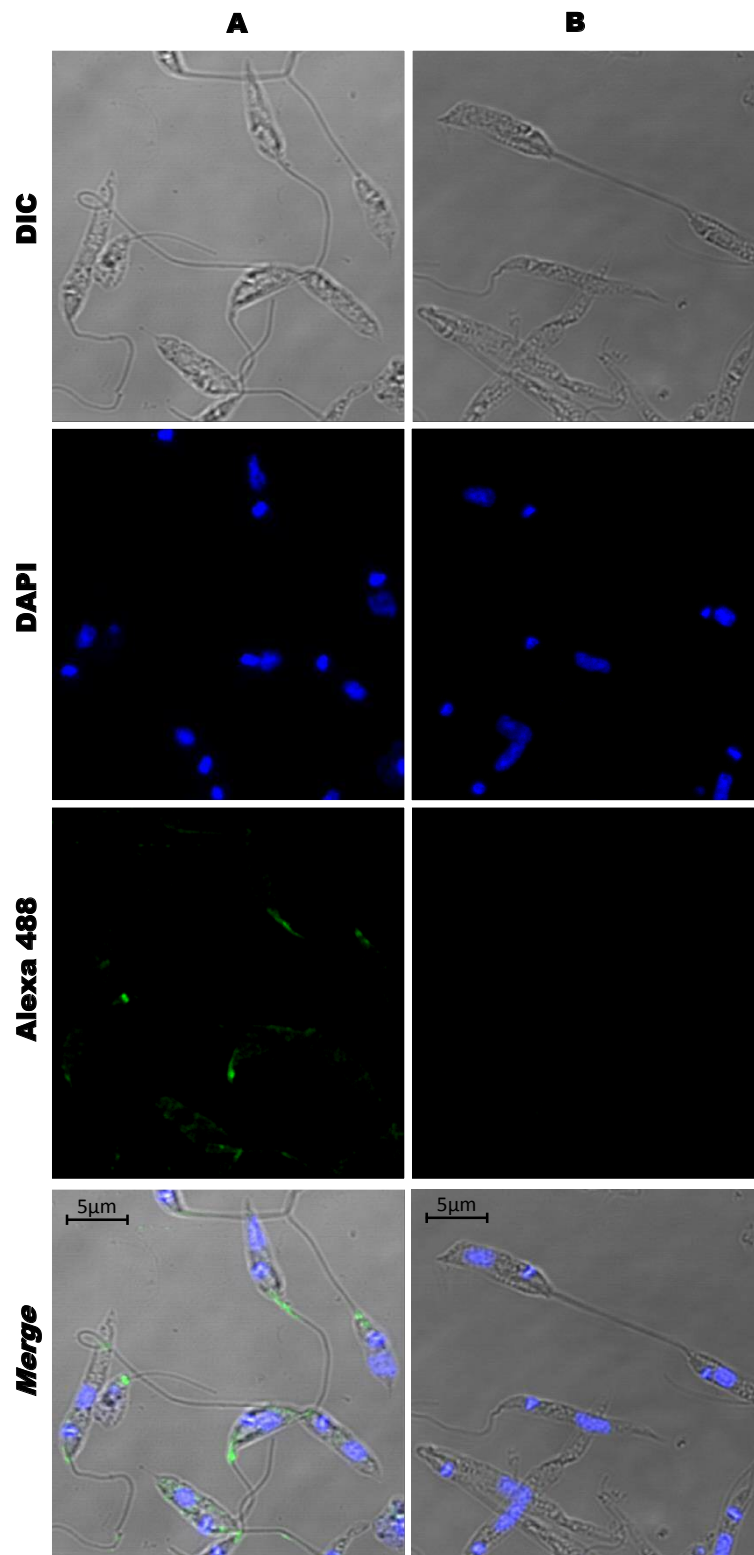


Figura 33. Localización subcelular del *cluster* PP1-34 en promastigotes de *L. infantum*. A. Análisis mediante inmunofluorescencia indirecta del *cluster* PP1-34 en promastigotes de cultivo axénico. B. Promastigotes incubados con el anticuerpo control (suero pre-inmune). DIC; imagen de contraste interferencial; DAPI: fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto; anti-PP1C-34 conjugado con Alexa 488 (verde); *Merge*, composición de las imágenes DIC, DAPI y Alexa 488.

Resultados

4.4.2.- Localización subcelular en amastigotes intracelulares.

Se estudió la localización subcelular mediante IFI de la proteína PP1-240 y del *cluster* PP1-34 en amastigotes intracelulares de *L. infantum* obtenidos por infección *in vitro* de células U937 diferenciadas. Las muestras fueron marcadas de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.7.

Los amastigotes intracelulares marcados con el anticuerpo anti-PP1-240N pusieron de manifiesto la presencia de un foco intenso fluorescente que no colocaliza con el núcleo ni con el kinetoplasto (Figura 34). Por tanto, acorde con los ensayos de *Western blot* previamente realizados, los estudios por IFI permiten confirmar la expresión de PP1-240 en el estadio amastigote (sección 4.3.2.3). Asimismo, en los análisis llevados a cabo mediante IFI con el anticuerpo anti-PP1C-34 no se detectó fluorescencia específica asociada al *cluster* de PP1-34 en consonancia con los resultados obtenidos por *Western blot* (sección 4.3.2.3).

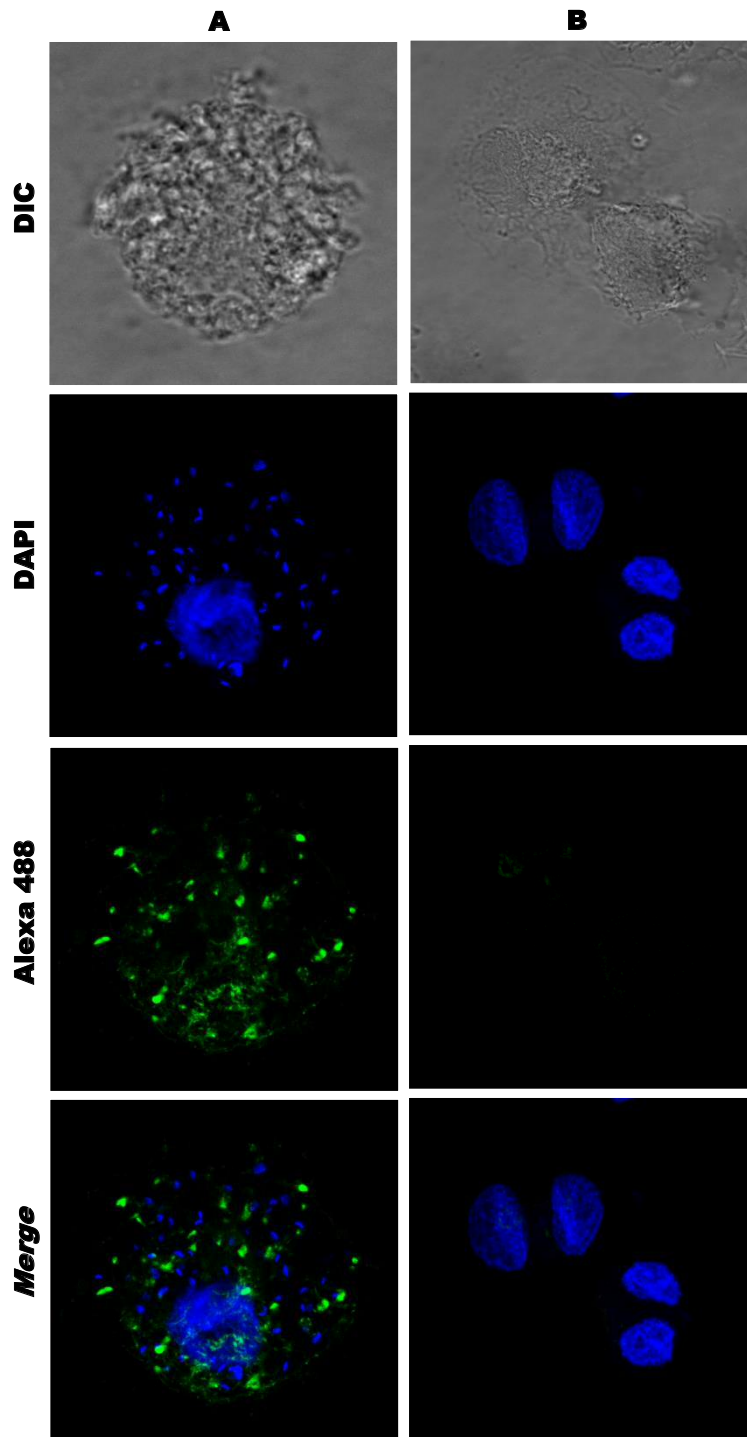


Figura 34. Localización subcelular de PP1-240 en amastigotes intracelulares de *L. infantum*. A. Análisis mediante inmunofluorescencia indirecta de la proteína PP1-240 en amastigotes intracelulares obtenidos por infección *in vitro* de la línea celular U937 diferenciada con promastigotes estacionarios (día 7) de cultivo axénico. B. Células U937 diferenciadas no infectadas. DIC, imagen de contraste interdifereencial; DAPI, fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto; anti-PP1 240N conjugado con Alexa 488 (verde); *Merge*, composición de las imágenes DAPI y Alexa 488.

Resultados

4.5.- Caracterización de PP1-240 y del cluster PP1C-34 en promastigotes axénicos de *L. infantum* mediante líneas *knock-in*.

Para la caracterización de la proteína PP1-240 y de las PP1 codificadas por el cromosoma 34, se generaron diferentes líneas *knock-in* mediante el vector integrativo pIR en promastigotes axénicos de *L. infantum*. En el caso concreto de PP1-240 se obtuvieron dos líneas *knock-in*, pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Dichos transfectantes sobre-expresan PP1-240 en su versión completa y sin su extremo N-terminal (PP1-240T), respectivamente. Estas líneas fueron diseñadas para el estudio de la funcionalidad de la proteína PP1-240 y para evaluar la importancia del extremo N-terminal en la actividad proteica. Como aproximación preliminar para el análisis del *cluster* de las PP1 codificadas por el cromosoma 34, se generó la línea celular *knock-in* pIR-PP1C-34, la cual sobre-expresa la región catalítica común de dichas proteínas (PP1C-34) (Figura 17). Asimismo, para profundizar en el estudio de la proteína PP1-240 y del *cluster* PP1C-34, se obtuvieron tres líneas *knock-in* con el vector integrativo pIR-GFP con el objetivo de sobre-expresar PP1-240 (pIR-PP1-240-GFP), PP1-240T (pIR-PP1-240T-GFP) y PP1C-34 (pIR-PP1C-34-GFP) como proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo C-terminal. La integración de las construcciones en las diferentes líneas *knock-in* de los promastigotes transfectados se comprobó mediante PCR a partir de ADNg y secuenciación de los productos de PCR (Figura 35).

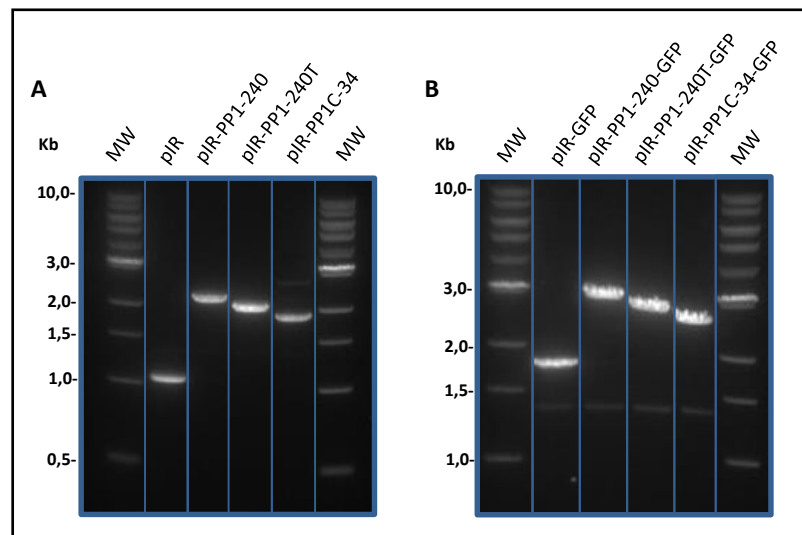


Figura 35. Confirmación mediante PCR de las líneas *knock-in* generadas a partir de los vectores integrativos pIR y pIR-GFP en promastigotes en cultivo axénico. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a partir de ADNg de los promastigotes transfectados con las construcciones derivadas de los vectores pIR (A) y pIR-GFP (B) para la sobre-expresión de las proteínas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34. Los promastigotes transfectados con los vectores pIR y pIR-GFP se emplearon como líneas control en todos los experimentos realizados.

4.5.1.- Análisis de la cinética de crecimiento.

Inicialmente, durante el proceso de selección de los transfectantes, se observó un retraso en el crecimiento de todas las líneas transfectadas con las proteína-fosfatasas en estudio respecto a los promastigotes control transfectados con pIR y pIR-GFP (Figura 36). Las líneas celulares que presentaron una menor tasa de crecimiento en el periodo de selección fueron las transfectadas con pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240-GFP.

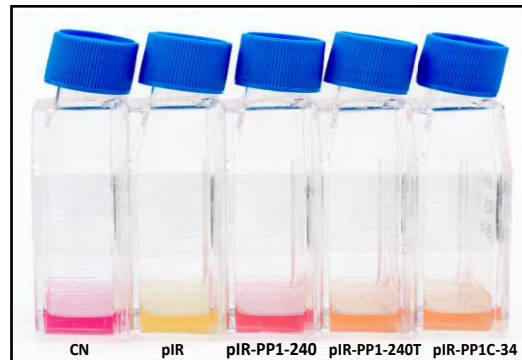


Figura 36. Análisis de los cultivos de las líneas *knock-in* generadas a partir del vector integrativo pIR. Imagen comparativa de la coloración de los medios de cultivo de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T, pIR-PP1C-34 respecto a pIR y el control negativo (CN) durante el proceso de selección con nourseotricina (15 días después de la transfección). El color de los cultivos refleja la acidificación del medio asociada al incremento de la densidad celular por la presencia del indicador de pH rojo fenol, que vira de rosa (pH básico) a amarillo (pH ácido).

Tras la estabilización de las líneas transfectadas, se evaluó su cinética de crecimiento mediante recuentos celulares regulares (cada 24h) a lo largo de la curva de crecimiento *in vitro* de *L. infantum*. De entre las líneas *knock-in* obtenidas a partir del vector pIR (Figura 37-A), destaca la cinética de los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T. Esta línea presenta una mayor tasa de crecimiento, alcanzando la fase estacionaria a día 4 con una densidad celular superior a la línea control pIR. Por el contrario, los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 mostraron una cinética de crecimiento similar a la cepa control pIR. En el caso de los promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34, sólo se observó un ligero incremento de la tasa de crecimiento respecto a pIR durante la fase logarítmica de la curva. En las líneas pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 se observó un descenso de la densidad celular a partir del día 6.

Los transfectantes de sobre-expresión de las proteínas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34 obtenidos a partir del vector pIR-GFP, mostraron un perfil de crecimiento similar al descrito en las líneas derivadas del vector pIR (Figura 37-B). Sin embargo, en este caso todos ellos alcanzaron simultáneamente la fase estacionaria a día 5, al igual que ocurre en la línea control pIR-GFP.

Resultados

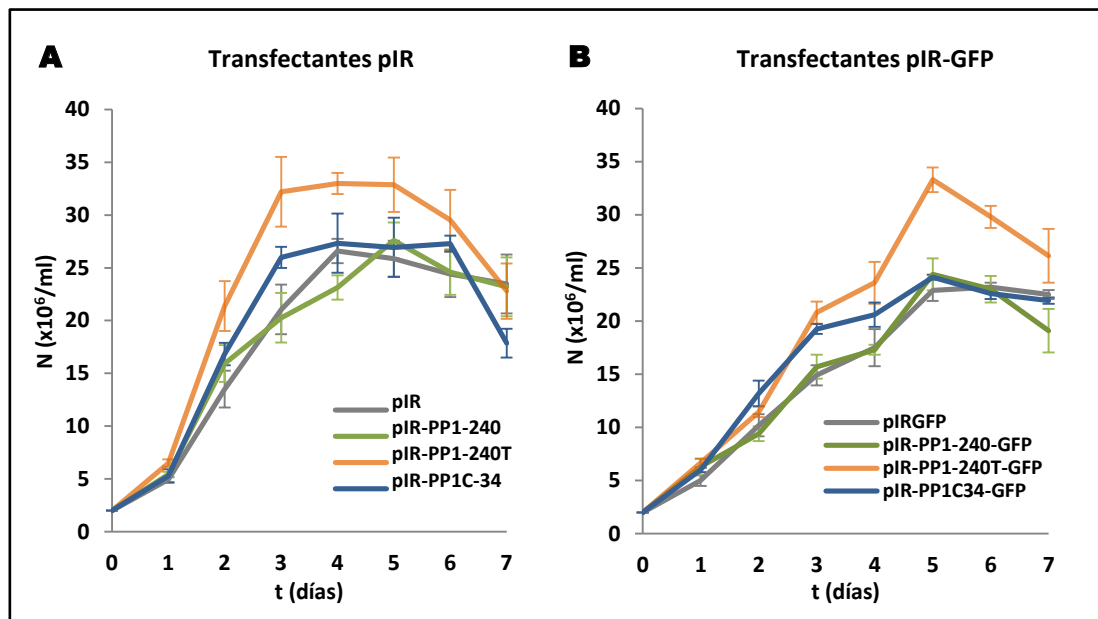


Figura 37. Análisis de la cinética de crecimiento de las líneas *knock-in* derivadas del vector integrativo pIR y pIR-GFP. Curva de crecimiento media de los promastigotes transfectados con las construcciones derivadas de los vectores pIR (A) y pIR-GFP (B) para la sobre-expresión de las proteínas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34. N es la densidad celular media obtenida a partir de tres réplicas de cultivo. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.5.2.- Estudio de los niveles de expresión mediante Western blot.

Se analizaron los niveles de expresión de las proteínas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34 en las líneas *knock-in* obtenidas a partir de los vectores pIR y pIR-GFP. Para ello, se obtuvieron extractos proteicos totales de cada una de las líneas *knock-in* de los días 1 al 7 de la curva de crecimiento. Los extractos proteicos fueron cuantificados mediante el método de *Bradford* y analizados por *Western blot*.

El análisis de los resultados evidenció la sobre-expresión de PP1-240 en el transfectante pIR-PP1-240 en los días 1 y 2 de la curva de crecimiento respecto al control pIR (Figura 38-A). En el caso del transfectante pIR-PP1-240T, sólo se detectó sobre-expresión de PP1-240T a día 1, decayendo sus niveles drásticamente tras 48 horas de incubación (Figura 38-B). Además, cabe destacar que la sobre-expresión de PP1-240 y PP1-240T no alteró los niveles basales de expresión de PP1-240 observados tanto en la cepa control pIR (Figura 38) como en la cepa silvestre (Figura 29).

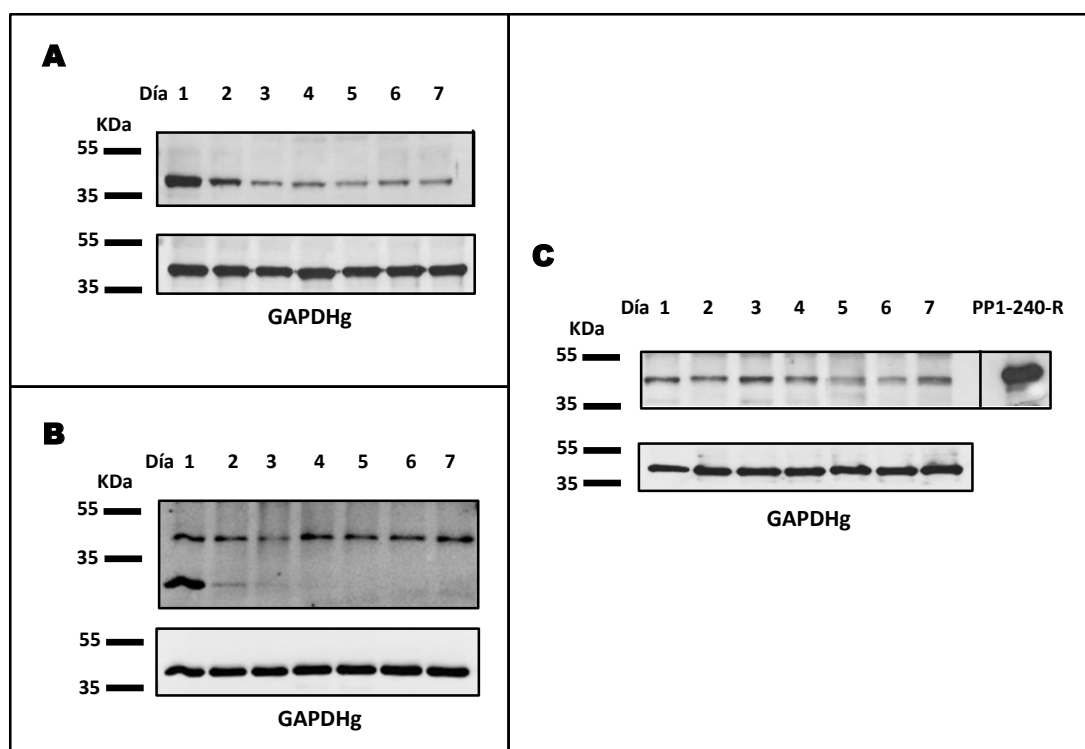


Figura 38. Niveles de expresión de PP1-240 y PP1-240T. Análisis mediante *Western blot* de los niveles de expresión PP1-240 y PP1-240T a lo largo de la curva de crecimiento (días 1-7) de los transfectantes pIR-PP1-240 (A) y pIR-PP1-240T (B) respecto al control pIR (C). Extractos totales cargados por pocillo: 20 μ g. GAPDHg: proteína control de carga. Se utilizaron los anticuerpos policlonales primarios anti-PP1-240N (A y C) y anti-PP1-240 (B). PP1-240-R representa la proteína PP1-240 recombinante purificada por cromatografía de afinidad (0,1 μ g).

En cuanto al transfectante pIR-PP1C-34, no se detectó sobre-expresión de PP1C-34 en ninguno de los días de la curva de crecimiento analizados respecto a la expresión basal observada en la línea control pIR. Por su parte, los niveles de expresión de las fosfatasa fusionadas a GFP fueron analizados respecto a la línea control pIR-GFP utilizando un anticuerpo policlonal anti-GFP (Figura 39). Los estudios por *Western blot* mostraron una sobre-expresión de GFP (28,8 kDa) en todos los días de la curva de crecimiento de pIR-GFP. Sin embargo, se observó un patrón decreciente en los niveles de abundancia de GFP a lo largo del tiempo (Figura 39-D). En el caso de los transfectantes pIR-PP1-240-GFP (Figura 39-A) y pIR-PP1-240T-GFP (Figura 39-B), se detectó a día 1 una banda con un peso molecular próximo a 70kDa, coincidiendo con el tamaño esperado de las proteínas de fusión PP1-240-GFP (71,3 kDa) y PP1-240T-GFP (64,8 kDa), respectivamente. No obstante, la expresión de dichas proteínas decae tras 48 horas de incubación, siendo imperceptible la expresión de la proteína PP1-240-GFP en los días posteriores analizados, mientras que PP1-240T-GFP se detecta como una banda de intensidad débil en los días 2 y 3. Además, en ambos casos se observó una banda de menor tamaño correspondiente al peso molecular de GFP y cuya abundancia decae paulatinamente hasta niveles no detectables a día 6 y 7. En cuanto al transfectante pIR-PP1C-34-GFP, se detectó una banda con el tamaño esperado de la proteína de fusión PP1C-34-GFP (60,3 kDa) en el día 1 de la curva de crecimiento (Figura 39-C).

Resultados

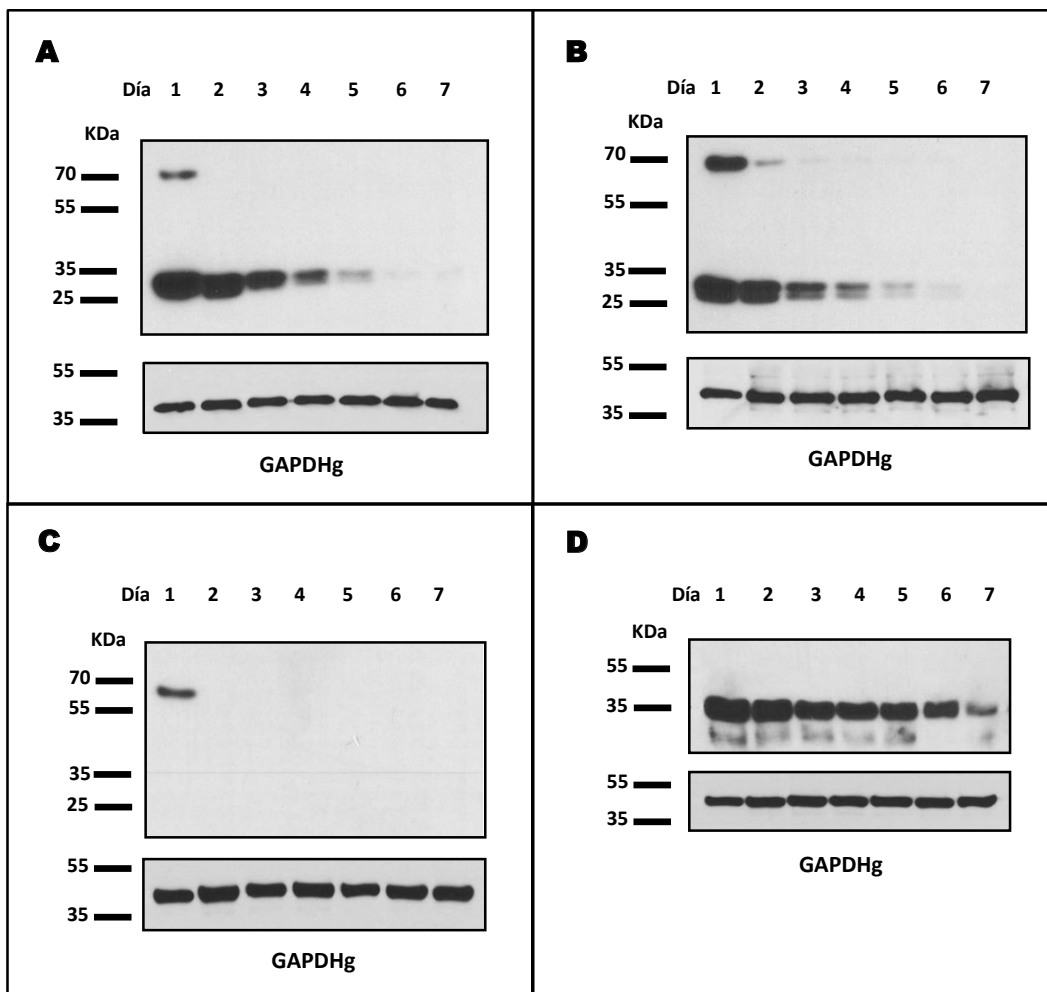


Figura 39. Niveles de expresión de PP1-240-GFP, PP1-240T-GFP y PP1C-34-GFP. Estudio de los niveles de expresión mediante *Western blot* de PP1-240-GFP (A), PP1-240T-GFP (B) y PP1C-34-GFP (C) a lo largo de la curva de crecimiento (día 1-7) de los transfectantes pIR-PP1-240-GFP, pIR-PP1-240T-GFP y pIR-PP1C-34, respectivamente. (D) transfectante pIR-GFP: línea control del experimento. Extractos totales cargados por pocillo: 20 µg. GAPDHg: proteína control de carga. Anticuerpo monoclonal primario: anti-GFP (1:2000).

Por tanto, los estudios de expresión llevados a cabo por *Western blot* confirman la sobre-expresión a día 1 de las diferentes PP1 en estudio en todas las líneas transfectadas excepto en la línea pIR-PP1C-34.

Cabe destacar que los análisis por microscopía de fluorescencia de los transfectantes derivados del vector pIR-GFP no proporcionaron información adicional sobre los estudios de localización subcelular previamente realizados en la cepa silvestre debido a la pérdida de fluorescencia de GFP (Anexo XIII).

4.5.3.- Estudio *in vitro* de la capacidad infectiva.

Se analizó la infectividad de las líneas *knock-in* obtenidas a partir de los vectores pIR y pIR GFP. Para ello se infectaron células U937 con promastigotes transfectados en fase estacionaria (día 5) (sección 3.2.2.4.). El nivel de infección se determinó en base al porcentaje de células infectadas y al número de amastigotes por célula, calculado a partir de tres réplicas biológicas del experimento. Los recuentos se realizaron tras 24, 48 y 72 horas post-infección (Figura 40).

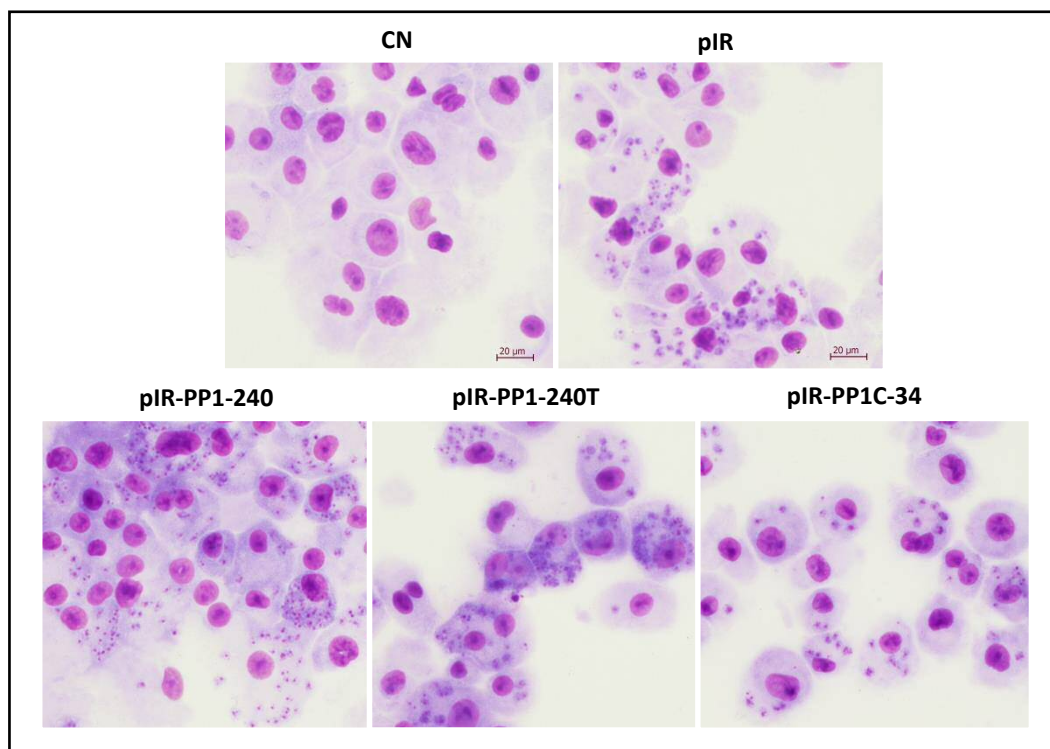


Figura 40. Infección *in vitro* de la línea celular U937 con las líneas *knock-in* pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. CN: células U937 no infectadas. Tinción con *Giemsa* modificado. Objetivo 40X.

Los estudios de infectividad no revelaron diferencias significativas en la capacidad de infección de los transfectantes en estudio respecto a las líneas control pIR (Figura 41) y pIR-GFP (Anexo XIV). Sin embargo, los recuentos de amastigotes por célula pusieron de manifiesto un descenso en el número medio de amastigotes en las líneas celulares pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a la línea control pIR tras 72 horas post-infección.

Resultados

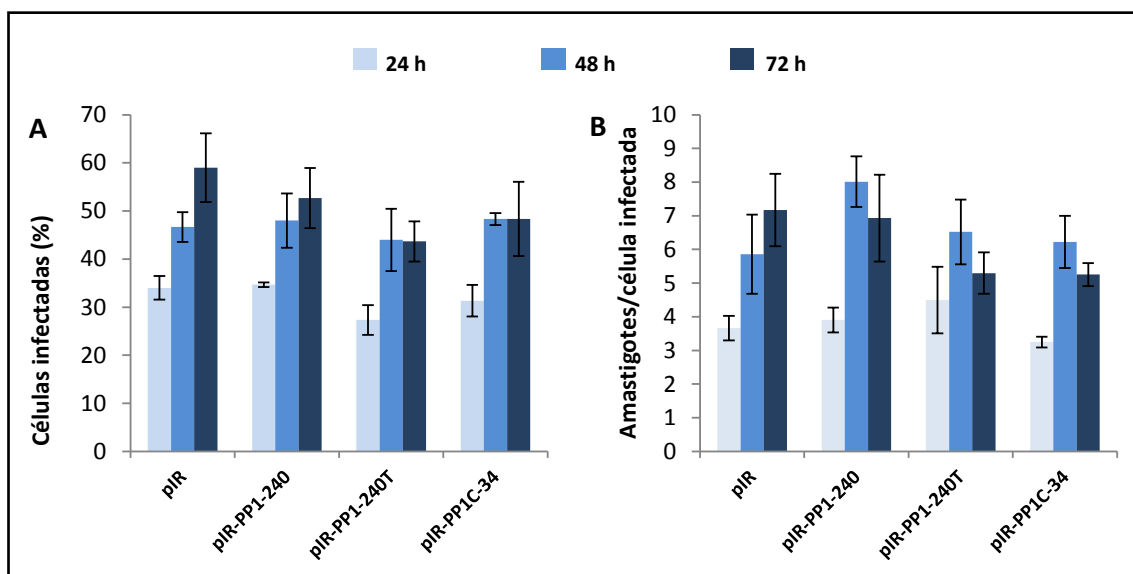


Figura 41. Estudio de la capacidad infectiva de promastigotes estacionarios procedentes de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a la línea control pIR. Se analizó la proporción media de células infectadas (A) y el número medio de amastigotes por célula (B) detectados por microscopía óptica a partir de tres réplicas biológicas. Los recuentos se llevaron a cabo tras 24, 48 y 72 horas post-infección. No se observaron diferencias significativas según el test de la *t* de Student.

4.5.4.- Análisis funcional mediante RNA-Seq.

Se llevó a cabo un análisis funcional de PP1-240 y del *cluster* PP1C-34 mediante RNA-Seq a partir de los transfectantes de sobre-expresión relativos pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34, estableciendo como control la línea de promastigotes transfectados con pIR. Para ello, se procedió a la extracción de ARN total de dos réplicas biológicas correspondientes a los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de los promastigotes axénicos transfectados. Dichos tiempos fueron seleccionados de acuerdo a las cinéticas de crecimiento y los niveles de expresión de PP1 observados por *Western blot* en los transfectantes en estudio (sección 4.1 y 4.2). A continuación, se evaluó la calidad de las muestras de ARN total (Figura 42) y se generaron las librerías siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.10.2., respectivamente. Finalmente, las muestras fueron secuenciadas mediante el sistema *Illumina HiSeq2500*.

Tras la secuenciación masiva de las librerías se llevó a cabo un análisis de la calidad de las lecturas crudas (*raw*) mediante el programa *FastQC*. Los estudios revelaron que las librerías presentaban entre 8 y 12 millones de lecturas con una longitud media de 51 pb. A continuación se realizó un alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia de *L. infantum* mediante el programa *Bowtie* (Figura 43). Más del 98% de las lecturas secuenciadas alinearon con el genoma de *Leishmania*.

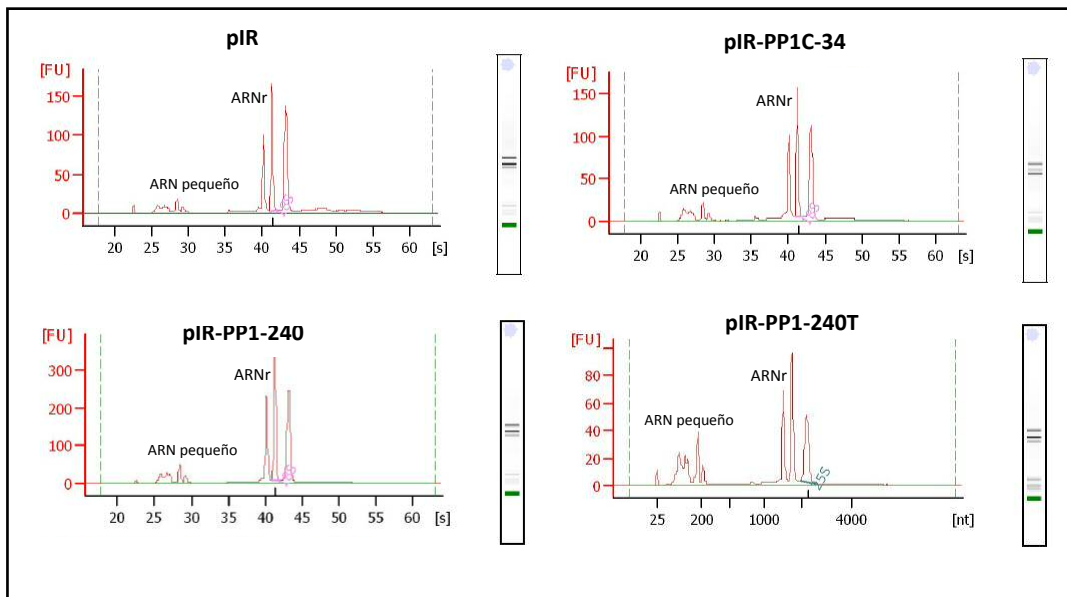


Figura 42. Análisis de la calidad del ARN total de los promastigotes transfectados con pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. Electroferogramas del ARN total obtenido a partir de promastigotes transfectados con pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 a día 1. Se observa la integridad del ARNr así como la ausencia de degradación en el intervalo comprendido entre los picos de ARN pequeño y ARNr.

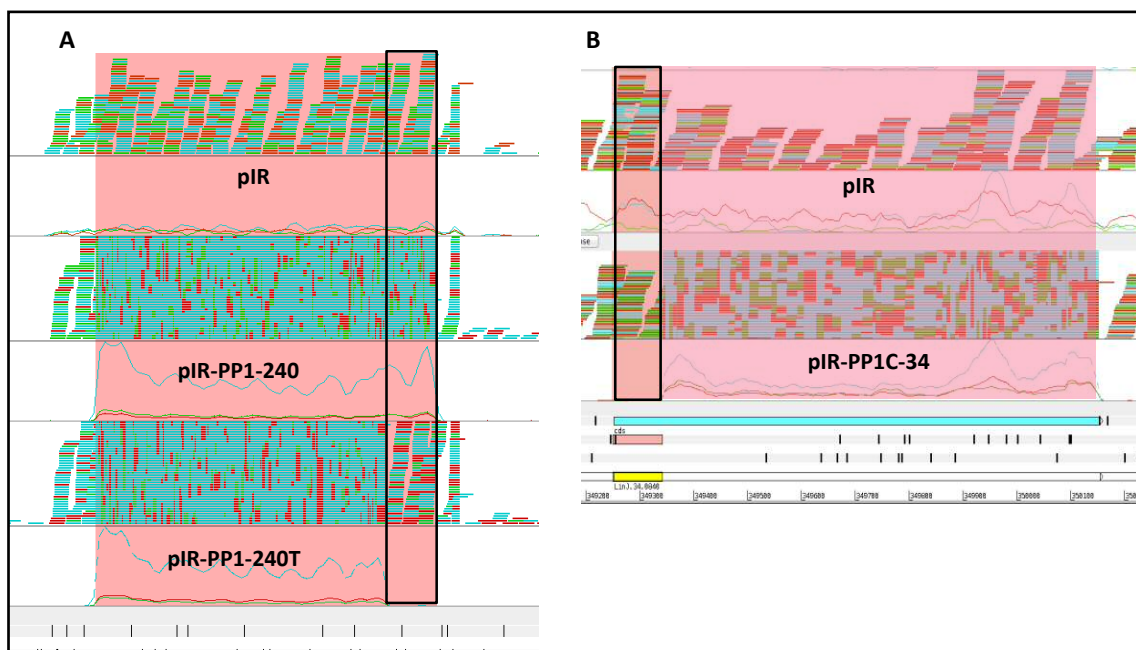


Figura 43. Alineamiento comparativo de las lecturas obtenidas a partir de las librerías de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a la línea control pIR. A. Comparación del número de lecturas que mapean en la región codificante del gen LinJ.15.0240 en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T respecto a pIR. B. Comparación del número de lecturas que mapean en la región codificante del gen LinJ.34.0840 en pIR-PP1C-34 respecto a pIR. Se recuadra en negro la región correspondiente al extremo N-terminal. Las líneas verdes y rojas apiladas representan las lecturas secuenciadas y alineadas con el genoma de referencia de *L. infantum*.

Resultados

Posteriormente, se empleó *edgeR Bioconductor* de la plataforma R para la visualización de la distribución de los datos crudos, normalización y la cuantificación de la expresión diferencial (sección 3.10.2.1). La normalización de los datos se realizó mediante RPKM (Figura 44).

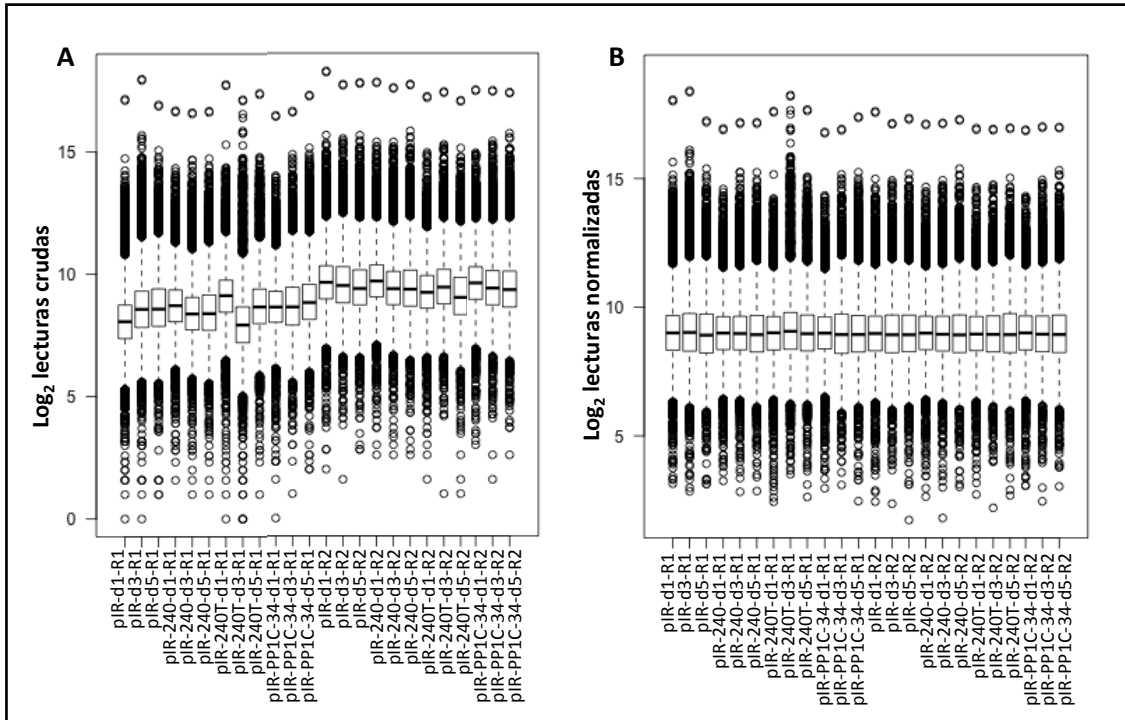


Figura 44. Diagramas de cajas de las lecturas crudas (*raw*) y las lecturas normalizadas (RPKM) de los transfectantes pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. Se representa la distribución de las lecturas crudas (A) y lecturas normalizadas (B) obtenidas a partir de las réplicas (R) 1 y 2 de las librerías correspondientes a los transfectantes pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 en los días 1, 3 y 5 (d1, d3, d5) de la curva de crecimiento.

Previamente al cálculo de la expresión diferencial, se evaluó la distribución de las muestras mediante un análisis de escalado multidimensional o MDS (*multidimensional scaling plot of distances*) a partir de las lecturas normalizadas (Figura 45). El gráfico revela una buena correlación de los datos obtenidos tanto a día 1 como a día 5 entre los distintos transfectantes, lo que contrasta con la mayor dispersión observada entre los datos a día 3.

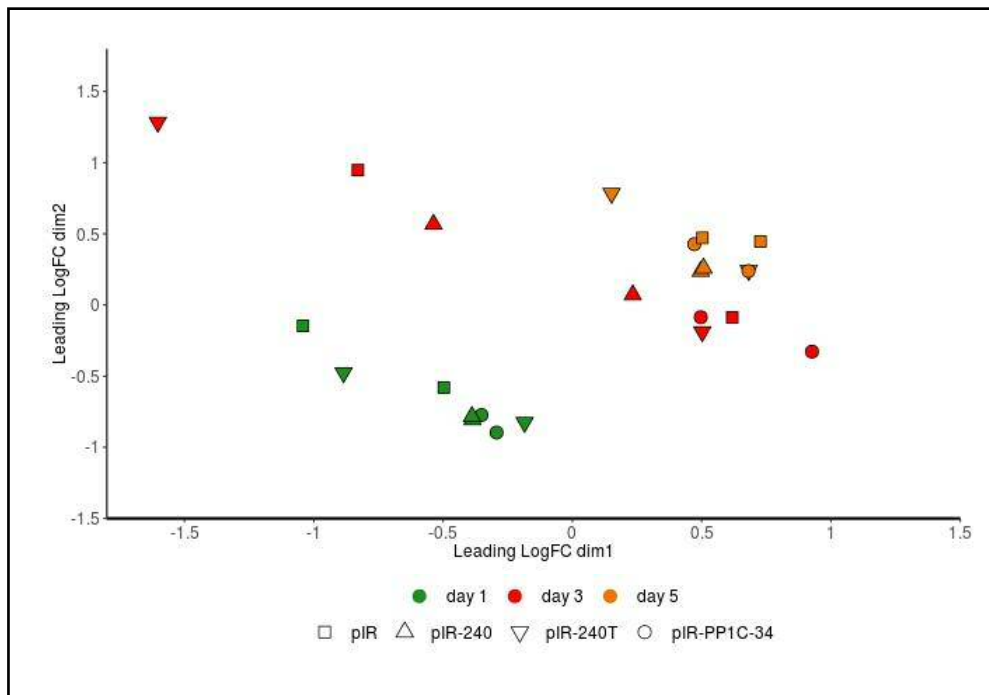


Figura 45. Estudio de la dispersión de las lecturas normalizadas de los transfectantes pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. MDS de las muestras analizadas por RNA-Seq en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de los transfectantes pIR, pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. Se representan las réplicas 1 y 2 de las muestras relativas a los transfectantes en estudio a modo de figuras geométricas que están agrupadas por un código de colores asociado a los distintos días según se indica en la leyenda del gráfico.

El mapa de intensidad (*heatmap*) generado a partir de los valores promedio de RPKM representa una primera aproximación a los transcriptomas secuenciados (Figura 46). Estos gráficos permiten comparar los perfiles de expresión génica observados en los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 en los días 1, 3 y 5, respecto a la línea control pIR. A partir de dichos gráficos se deducen variaciones en un número reducido de genes de los distintos transfectantes en estudio, siendo éstas principalmente observadas en los días 1 y 3, como reflejan los diferentes patrones de bandas detectados.

Resultados

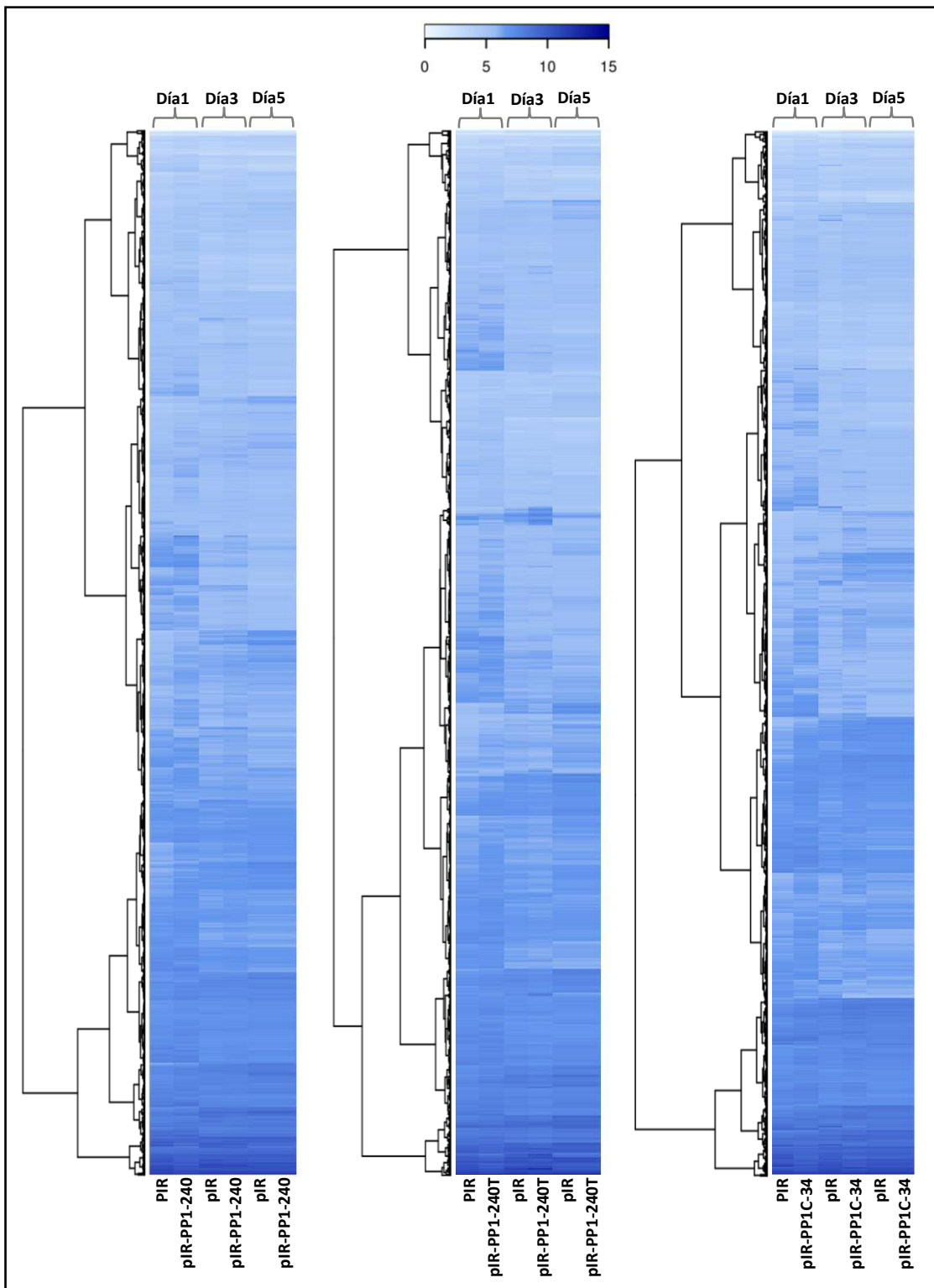


Figura 46. *Clustering* de los perfiles de expresión génica (RPKM) de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a pIR. Los gráficos representan los mapas de intensidad obtenidos a partir de los niveles de expresión génica normalizados (RPKM) en los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto al control pIR, en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.

Finalmente, se llevó a cabo el estudio comparativo detallado de los perfiles de expresión génica de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto a la línea control pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Para ello, se empleó el promedio de los valores de expresión génica normalizados (RPKM) de las réplicas 1 y 2. Se consideró que un gen está diferencialmente expresado si presentaba una tasa de variación o *fold change* mayor a 1,7 (sobre-expresado) ó menor a -1,7 (sub-expresado) con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) según el test de la t de *Student* (sección 3.10.2.).

4.5.4.1.- Análisis de expresión génica diferencial en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR.

4.5.4.1.1.- Perfil de expresión génica global.

En el análisis de expresión génica llevado a cabo mediante RNA-Seq en promastigotes obtenidos a partir de cultivo axénico y transfectados con pIR-PP1-240, se detectó la expresión diferencial de 103 genes con respecto a los promastigotes control transfectados con pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento (Tabla 15).

De acuerdo con las anotaciones recogidas en la base de datos *TriTrypDB*, el 39% de los genes diferencialmente expresados (40 genes) codifica para proteínas de función conocida, mientras que el 61% restante (63 genes) representa genes que codifican para proteínas hipotéticas o de función desconocida. De los 103 genes diferencialmente expresados, el 92% se encuentra sub-expresado. En cuanto a la distribución a lo largo del tiempo, el 92,2% de los genes diferencialmente expresados (95 genes) se observan a día 1, y el 8% restante se distribuye uniformemente entre los días 3 y 5. De los 95 genes diferencialmente expresados a día 1, sólo un 31% (32 genes) codifica para genes de función conocida, mientras que el 61% (63 genes) representa proteínas hipotéticas conservadas y de función desconocida. Además, el 86,4% de los genes diferencialmente expresados a día 1 (89 genes) se encuentran sub-expresados, estando clasificados como genes de función conocida únicamente el 31% (28 genes).

Resultados

Tabla 15. Frecuencias absolutas de genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Se muestra el número de genes diferencialmente expresados (GDE) en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 respecto a pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Los genes se clasifican según la base de datos *TriTrypDB* en: genes de función conocida, y genes codificantes para proteínas hipotéticas conservadas y de función desconocida. La selección de los genes diferencialmente expresados se basa en los criterios: *Fold change* ($F \geq 1,7$ (sobre-expresados) o $\leq -1,7$ (sub-expresados), y valor de significación estadística $\alpha = 0,05$ según el test de la *t* de *Student*. *N* hace referencia al número de genes.

	Día 1		Día 3		Día 5		Total GDE
	sobre- expresados	sub- expresados	sobre- expresados	sub- expresados	sobre- expresados	sub- expresados	
Función conocida (N)	4	28	1	3	1	3	40
Proteínas hipotéticas y de función desconocida (N)	2	61	0	0	0	0	63
% GDE	5,8	86,4	1	2,9	1	2,9	N=103 100

La Figura 47 ilustra la proporción de genes sub-expresados y sobre-expresados en el transfectante pIR-PP1-240 en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico. La imagen refleja un predominio de la sub-expresión en el perfil de expresión génica del transfectante pIR-PP1-240 (92,2%). Además, cabe destacar que la mayoría de los genes sub-expresados se detectan a día 1 (93,7%).

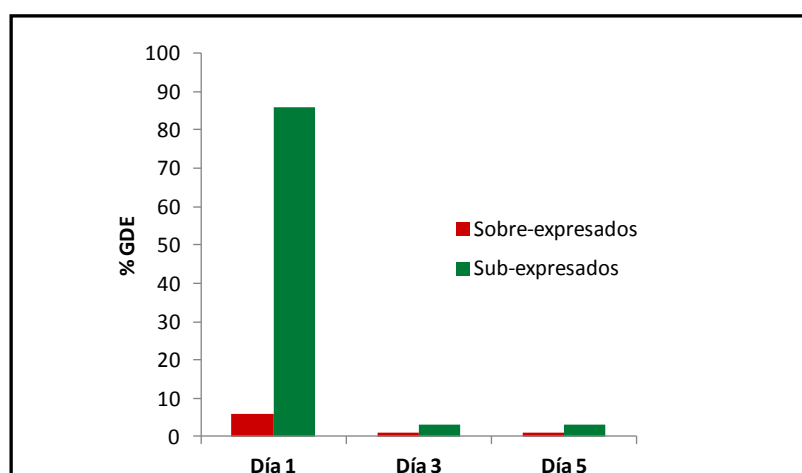


Figura 47. Proporción de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR. El histograma muestra el porcentaje de genes sobre-expresados (rojo) y sub-expresados diferencialmente (verde) en promastigotes axénicos transfectados con pIR-PP1-240 frente a los transfectados con pIR respecto al total de genes diferencialmente expresados ($n=103$) en el periodo de tiempo analizado (días 1, 3 y 5). Los genes diferencialmente expresados se seleccionaron en función del *Fold change* ($F \geq 1,7$ ó $\leq -1,7$) con una significación estadística $\alpha=0,05$ ($p < 0,05$), según el test de la *t* de *Student*.

4.5.4.1.2.- Asignación de términos de Gene Ontology.

Una aproximación preliminar sobre las posibles funciones celulares que se ven alteradas en el transfectante pIR-PP1-240 la proporciona el análisis de términos de ontología génica (GO) de la base de datos *Gene Ontology* (sección 3.10.2.2.). Estos términos constituyen una nomenclatura genérica controlada, sistemática e independiente de la especie, que define categorías para describir las funciones de los genes y las relaciones entre éstos. La base de datos establece tres ontologías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. La asignación de términos de GO al conjunto de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR (103 genes) se ha llevado a cabo mediante el programa informático *BLAST2GO*.

En la Tabla 16 se describe el número de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240 que han sido asociados a términos de GO en los diferentes tiempos de la curva de crecimiento analizados. Sin embargo, del conjunto total de genes estudiados (103 genes), sólo un 40,7% (42 genes) presenta anotaciones de GO. Además, la mayoría de los términos de GO (81%) se han anotado a día 1 en el grupo de genes sub-expresados (34 genes), el cual representa el conjunto de genes con mayor proporción de genes diferencialmente expresados (86,4%).

Tabla 16. Frecuencias de genes diferencialmente expresados con términos de GO anotados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Se describe el número de genes diferencialmente expresados (*N* GDE) y el número de términos de GO asociados (*N* GO) en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 respecto a pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Los genes diferencialmente expresados están clasificados como sobre-expresados si $F \geq 1,7$ o sub-expresados si $F \leq -1,7$, con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) según el test de la *t* de Student.

Día	Nivel de expresión	<i>N</i> GDE	<i>N</i> GO
Día 1	Sobre-expresados	6	5
	Sub-expresados	89	34
Día 3	Sobre-expresados	1	1
	Sub-expresados	3	1
Día 5	Sobre-expresados	1	1
	Sub-expresados	3	0

Una vez asignados los términos de GO, se generaron gráficos acíclicos dirigidos (DAG) para cada ontología. Estos gráficos describen las relaciones entre los términos de GO presentes en el conjunto de genes analizados así como la representatividad de los mismos en función del número de secuencias génicas presentes en cada nodo (Conesa y col., 2005). A partir de dichos DAG, se obtuvieron diagramas circulares multinivel para cada ontología génica en función del número de secuencias presentes por cada anotación de GO. El término multinivel hace referencia a la representación de nodos de diferentes niveles de concreción de los DAG. Estos datos se representan en la Figura 48, donde se

Resultados

detallan las frecuencias absolutas de términos de GO anotados para cada ontología en el conjunto de genes analizado. No han sido incluidos los términos de GO asociados al gen de estudio LinJ.15.0240, puesto que su presencia está inducida por el propio transfectante de sobre-expresión pIR-PP1-240 en todos los días de la curva analizados. Esto limita la representación de términos de GO asociados a genes diferencialmente expresados en el día 1 (sobre-expresados y sub-expresados) y 3 (sub-expresados).

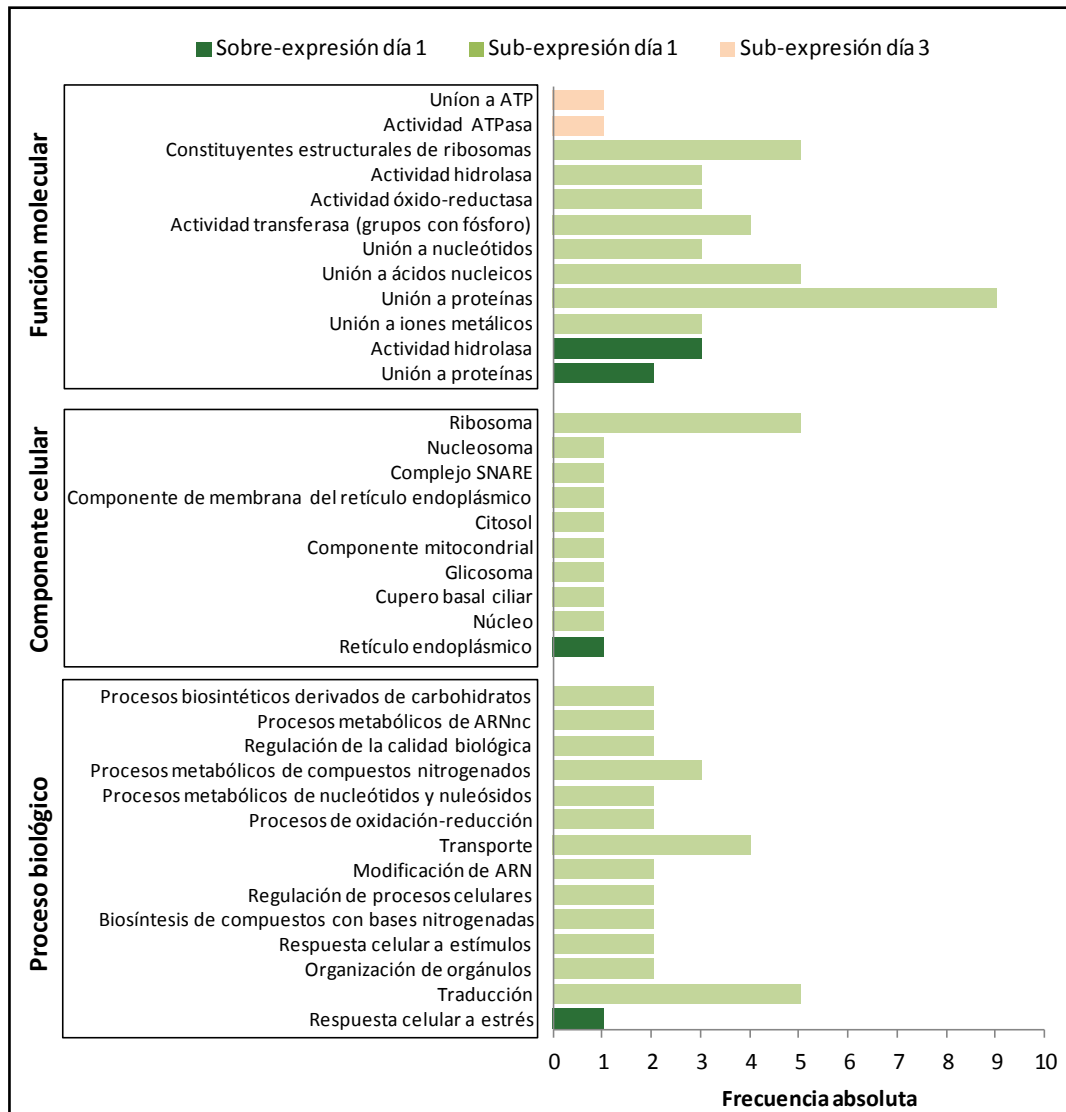


Figura 48. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR según la terminología GO. El histograma muestra las frecuencias absolutas de términos de la nomenclatura controlada GO que han sido anotados en los genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 respecto a pIR. Los términos GO han sido clasificados de acuerdo a las ontologías: proceso biológico, componente celular y función molecular. Se detalla el nivel de expresión génica diferencial como sobre-expresión o sub-expresión en los días 1 y 3 de la curva de crecimiento de promastigotes axénicos. No han sido representados los términos GO asociados directamente al gen en estudio LinJ.15.0240.

Entre los principales procesos biológicos sub-expresados a día 1 destacan actividades relacionadas con la expresión génica, la traducción, la modificación de ARN así como el transporte de moléculas en la célula. También se detallan diversos procesos relacionados con actividades metabólicas de compuestos nitrogenados y componentes de los ácidos nucleicos. Estos procesos biológicos se asocian principalmente con las funciones moleculares de constitución estructural de los ribosomas, unión a proteínas, unión a iones metálicos y unión a ácidos nucleicos. Según la ontología componente celular, las funciones sub-expresadas están relacionadas con diversas estructuras celulares, siendo el ribosoma el principal componente que está representado. La respuesta celular a estrés es el único proceso biológico sobre-expresado que se han anotado a día 1. A día 3, sólo figura la sub-expresión de dos funciones moleculares relativas al ATP como son unión a ATP y actividad ATP-asa.

4.5.4.1.3.- Análisis de enriquecimiento en términos de Gene Ontology sub-expresados a día 1.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento en términos de GO estableciendo como conjunto de referencia el genoma de *L. infantum* (cepa JPCM5) (sección 3.10.2.2.). Este estudio se realizó únicamente a partir de los términos de GO sub-expresados a día 1, puesto que representan la mayoría de los términos de GO anotados (81%). Dicho análisis fue desarrollado mediante el programa informático *BLAST2GO* utilizando el test exacto de *Fisher* ($p < 0,05$) (Figura 49).

Entre los principales procesos biológicos sub-expresados a día 1 figuran la modificación del ARNt, procesos metabólicos de pteridina y regulación de la expresión génica. Además, existe una gran variedad de funciones moleculares representadas en el conjunto de genes analizados. Entre ellas, cabe destacar de acuerdo a su significación estadística, la actividad selenofosfato sintetasa, receptor SNAP, pteridina reductasa y la actividad dolicol fosfato fosfatasa. También están representadas actividades relacionadas con la constitución estructural de ribosomas, actividad fosfotransferasa y actividades relacionadas con el equilibrio redox celular, entre otras. Los principales componentes celulares más significativos son el complejo *SNARE* y otros componentes citoplasmáticos como el ribosoma.

Resultados

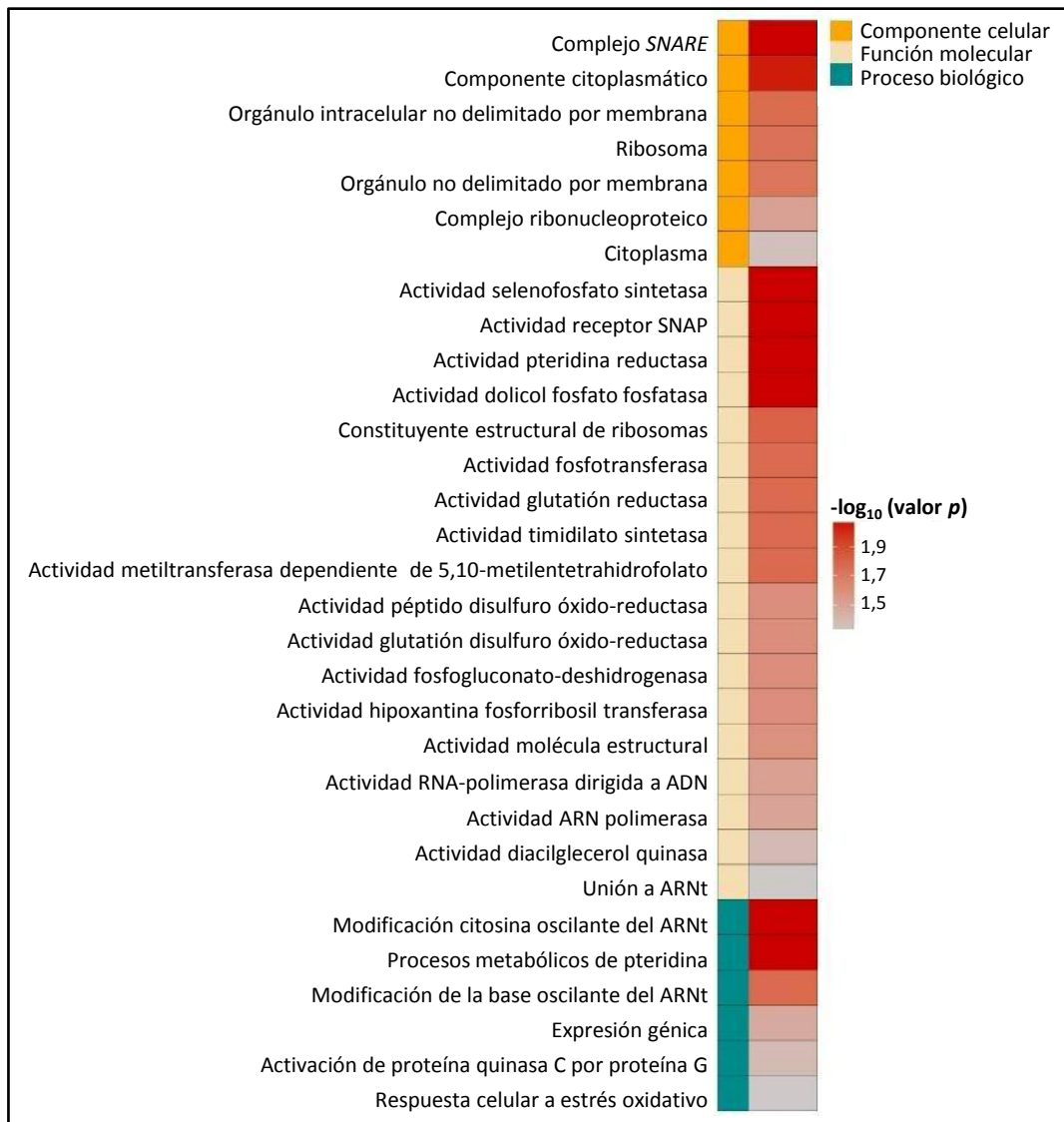


Figura 49. Análisis de enriquecimiento en términos de GO de los genes diferencialmente sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240 vs. pIR. La gráfica representa la distribución de términos de GO según su significación estadística (valor p) en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 respecto a pIR. Se considera que el conjunto de datos está enriquecido en un término GO si $p < 0,05$ según el test exacto de Fisher (BLAST2GO). Los términos de GO se agrupan en las ontologías correspondientes a componente celular, función molecular y proceso biológico. El genoma de *L. infantum* cepa JPCM5 fue empleado como conjunto de referencia. Los identificadores de los términos GO representados se describen en el Anexo XV.

4.5.4.1.4.- Estudio de los genes diferencialmente expresados.

Los genes diferencialmente expresados en los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 respecto a promastigotes control (pIR) durante los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento, se recogen en las Tablas 17, 19 y 21 si $F \geq 1,7$ (sobre-expresados) o en las Tablas 18, 20 y 22 si $F \leq -1,7$ (sub-expresados), respectivamente.

Tabla 17. Genes sobre-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); \log_2 F y *p*, valor *p* del test de la *t* de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. El gen PP1-LinJ.15.0240 integrado en el transfectante de sobre-expresión pIR-PP1-240 se destaca en negrita y cursiva.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	<i>p</i>
<i>LinJ.15.0240</i>	<i>Subunidad catalítica de la PP1, putativa</i>	<i>82,71</i>	<i>6,37</i>	<i>0,000</i>
LinJ.19.0240	Proteína hipotética conservada	1,75	0,81	0,000
LinJ.21.0850	Proteína hipotética conservada	1,71	0,77	0,005
LinJ.22.0670	Proteína A2	1,80	0,85	0,003
LinJ.34.0840	Serina treonina fosfatasa, PP1, putativa	2,33	1,22	0,000
LinJ.34.0850	Serina treonina fosfatasa, PP1, putativa	1,99	0,99	0,001

Tabla 18. Genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); \log_2 F y *p*, valor *p* del test de la *t* de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	<i>p</i>
LinJ.01.0040	Proteína hipotética de función desconocida	-2,07	-1,05	0,001
LinJ.01.0060	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,024
LinJ.01.0110	Glutarredoxina monotiol, putativa	-2,31	-1,21	0,000
LinJ.01.0190	Proteína hipotética conservada	-2,13	-1,09	0,029
LinJ.01.0590	Proteína transportadora de tricarboxilatos, putativa	-1,91	-0,93	0,005
LinJ.02.0240	Proteína hipotética conservada	-2,19	-1,13	0,001
LinJ.02.0290	Proteína de procesamiento de ARNr, putativa	-2,13	-1,09	0,005
LinJ.03.0240	Proteína ribosómica L38, putativa	-1,93	-0,95	0,037
LinJ.03.0690	Proteína hipotética conservada	-1,95	-0,96	0,000
LinJ.04.0250	Proteína hipotética conservada	-1,96	-0,97	0,008
LinJ.04.0860	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,013
LinJ.05.0080	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,049
LinJ.05.0300	Precursor mitocondrial de proteína transportadora de fosfato	-1,74	-0,80	0,019
LinJ.05.0860	Proteína hipotética conservada	-2,57	-1,36	0,019
LinJ.07.0370	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,042
LinJ.08.0260	Proteína hipotética conservada	-2,20	-1,14	0,006
LinJ.08.0750	Tuzina, putativa	-2,04	-1,03	0,000
LinJ.08.0930	Proteína hipotética conservada	-1,77	-0,82	0,048
LinJ.09.0910	Proteína hipotética conservada	-2,14	-1,10	0,014
LinJ.09.1210	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,042
LinJ.09.1371	Proteína hipotética	-1,84	-0,88	0,039
LinJ.10.0090	Proteína hipotética conservada con repeticiones tipo WD	-1,80	-0,85	0,039
LinJ.10.0190	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,008
LinJ.10.0660	Endonucleasa G, putativa	-1,82	-0,86	0,025
LinJ.10.0840	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,031
LinJ.10.0940	FKBP peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa, putativa	-1,72	-0,78	0,006
LinJ.11.0300	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,027
LinJ.13.0140	Proteína hipotética conservada	-1,99	-0,99	0,000

Resultados

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.14.1290	Proteína hipotética conservada	-1,73	-0,79	0,030
LinJ.14.1480	Proteína hipotética conservada	-2,35	-1,23	0,027
LinJ.15.0200	Proteína hipotética conservada	-1,79	-0,84	0,027
LinJ.15.1200	Proteína ribosómica ácida de tipo P2	-2,50	-1,32	0,023
LinJ.16.0170	Proteína ribosómica 50S L17, putativa	-1,95	-0,96	0,015
LinJ.16.0600	Histona H3, putativa	-2,27	-1,18	0,016
LinJ.16.0860	Proteína hipotética conservada	-1,80	-0,85	0,015
LinJ.16.1170	Proteína tipo tirosil/metionil ARNt sintetasa	-1,82	-0,86	0,018
LinJ.17.0430	Proteína SNARE (Qa), putativa	-1,84	-0,88	0,001
LinJ.17.1440	Proteína hipotética conservada	-2,13	-1,09	0,009
LinJ.18.1370	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,039
LinJ.19.0490	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,002
LinJ.19.0780	Proteína hipotética conservada	-1,77	-0,82	0,002
LinJ.19.1070	Proteína hipotética de función desconocida	-1,78	-0,83	0,007
LinJ.19.1210	Proteína hipotética conservada	-1,95	-0,96	0,002
LinJ.20.0210	Proteína hipotética de función desconocida	-1,88	-0,91	0,026
LinJ.20.1490	Proteína hipotética conservada	-1,99	-0,99	0,002
LinJ.21.0140	Proteína hipotética conservada	-2,01	-1,01	0,032
LinJ.21.0980	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT)	-1,74	-0,80	0,007
LinJ.22.0230	Proteína hipotética de función desconocida	-2,00	-1,00	0,001
LinJ.23.0190	Proteína hipotética conservada	-1,74	-0,80	0,029
LinJ.23.0310	pteridina reductasa-1 (PTR1)	-1,71	-0,77	0,002
LinJ.24.1170	Proteína hipotética conservada	-2,00	-1,00	0,003
LinJ.24.1680	Proteína RING-box, putativa	-2,19	-1,13	0,005
LinJ.25.0240	Proteína hipotética conservada	-2,04	-1,03	0,046
LinJ.25.1220	Proteína ribosómica S25	-3,36	-1,75	0,033
LinJ.25.1740	Componente regulador del huso mitótico rev7, putativa	-2,03	-1,02	0,006
LinJ.26.0110	Proteína hipotética conservada	-1,95	-0,96	0,018
LinJ.26.0420	Proteína de tipo unión a nucleótidos	-1,73	-0,79	0,019
LinJ.26.1310	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,012
LinJ.26.1780	Proteína hipotética	-2,01	-1,01	0,037
LinJ.26.2150	Proteína hipotética conservada	-2,35	-1,23	0,002
LinJ.26.2530	Proteína hipotética conservada	-2,06	-1,04	0,045
LinJ.27.1450	Proteína de tipo ARN polimerasa II dirigida por ADN	-2,43	-1,28	0,004
LinJ.27.1490	Proteína hipotética conservada	-2,06	-1,04	0,010
LinJ.28.0120	Subunidad 9 de la RNA polimerasa II dirigida por ADN, putativa	-2,04	-1,03	0,034
LinJ.28.0510	Proteína hipotética de función desconocida	-1,91	-0,93	0,008
LinJ.28.1930	Subunidad 1 del complejo de unión a ARN mitocondrial, putativa	-1,74	-0,80	0,009
LinJ.28.2360	Proteína ribosómica S29, putativa	-1,88	-0,91	0,021
LinJ.29.0410	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,019
LinJ.29.2960	Proteína hipotética conservada	-2,19	-1,13	0,041
LinJ.30.0170	2 hidroxil 3-oxopropionato reductasa, putativa	-1,73	-0,79	0,001
LinJ.30.0410	Doliquil pirofosfato fosfatasa, putativa	-2,27	-1,18	0,044
LinJ.30.0430	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,87	0,007
LinJ.30.1590	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,013
LinJ.30.1690	Proteína hipotética conservada	-1,78	-0,83	0,012

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.30.2080	Proteína hipotética conservada	-2,14	-1,10	0,049
LinJ.30.2640	Proteína hipotética conservada	-1,99	-0,99	0,013
LinJ.30.3520	Proteína de unión a Zinc (Yippee), putativa	-2,13	-1,09	0,010
LinJ.30.3730	Proteína hipotética conservada	-1,88	-0,91	0,021
LinJ.31.0110	O-sialoglicoproteína endopeptidasa, putativa, metalopeptidasa, Clan MK, Familia M67	-1,82	-0,86	0,016
LinJ.31.2940	Proteína hipotética conservada	-1,80	-0,85	0,006
LinJ.32.3530	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,024
LinJ.32.3760	Proteína hipotética conservada	-2,51	-1,33	0,003
LinJ.33.0930	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,007
LinJ.34.0410	Proteína hipotética de función desconocida	-1,85	-0,89	0,018
LinJ.34.3850	Proteína hipotética conservada	-1,89	-0,92	0,024
LinJ.35.2160	Proteína hipotética de función desconocida	-1,97	-0,98	0,023
LinJ.36.1660	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,008
LinJ.36.2650	Proteína hipotética conservada	-1,89	-0,92	0,037
LinJ.36.5650	Selenofosfato sintetasa, putativa	-1,79	-0,84	0,031

Tabla 19. Genes sobre-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. El gen PP1-LinJ.15.0240 integrado en el transfectante de sobre-expresión pIR-PP1-240 se destaca en negrita y cursiva.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
<i>LinJ.15.0240</i>	<i>Subunidad catalítica de la PP1, putativa</i>	<i>22,16</i>	<i>4,47</i>	<i>0,000</i>

Tabla 20. Genes sub-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.02.0270	Transportador ABC1, putativa	-1,87	-0,90	0,007
LinJ.17.0990	META1	-1,85	-0,89	0,018
LinJ.23.1230	SHERP	-1,82	-0,86	0,002

Tabla 21. Genes sobre-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. El gen PP1-LinJ.15.0240 integrado en el transfectante de sobre-expresión pIR-PP1-240 se destaca en negrita y cursiva.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
<i>LinJ.15.0240</i>	<i>Subunidad catalítica de la PP1, putativa</i>	<i>19,84</i>	<i>4,31</i>	<i>0,000</i>

Resultados

Tabla 22. Genes sub-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); $\log_2 F$ y *p*, valor *p* del test de la *t* de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	$\log_2 F$	<i>p</i>
LinJ.19.0840	ATG8, AUT7, APG8, PAZ2, putativa (ATG8A.1)	-1,73	-0,79	0,003
LinJ.23.1210	SHERP	-2,41	-1,27	0,017
LinJ.23.1230	SHERP	-2,30	-1,20	0,000

Entre el conjunto de genes sobre-expresados en la línea *knock-in* pIR-PP1-240 (Tablas 17, 19 y 21) destaca la tasa de variación del gen LinJ.15.0240. Estos datos confirman la sobre-expresión del gen LinJ.15.0240, inducido constitutivamente en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Sin embargo, el nivel de expresión del gen LinJ.15.0240 es aproximadamente 4 veces mayor en el día 1 respecto a los días 3 y 5 (Tabla 23). Además, cabe destacar que los niveles de sobre-expresión de PP1-240 observados a día 3 y 5 (FC ~20) apenas alteran el perfil de expresión del transfectante pIR-PP1-240, siendo detectados únicamente cinco genes sub-expresados en dicho periodo (Tablas 20 y 22).

Tabla 23. Tasa de variación (*Fold change*) del gen LinJ.15.0240 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.

	<i>Fold change</i>		
	Día 1	Día 3	Día 5
LinJ.15.0240	82,71	22,16	19,84

De acuerdo a los análisis basados en los términos de GO y a la información disponible en las bases de datos *TriTrypDB*, *KEGG* y análisis de dominios conservados, los genes descritos en las Tablas 4-9 se han agrupado como se expone a continuación.

Expresión génica.

Se ha detectado la sub-expresión a día 1 de diversos genes relacionados con la regulación de la expresión génica en el transfectante pIR-PP1-240. Entre ellos, cabe destacar el gen de la histona H3 (H3), una unidad estructural esencial de los nucleosomas que participa en el empaquetamiento del ADN. Además, se ha observado la sub-expresión del gen LinJ.26.1780, el cual codifica para una proteína hipotética tipo NuA4 con actividad histona acetil-transferasa (PF09340). En levaduras, el complejo multiproteico NuA4 está asociado a la regulación del ciclo celular, regulación de la transcripción y reparación de ADN. Asimismo, se han hallado genes relacionados con el inicio de la transcripción como la ARN pol II y la subunidad 9 de la ARN pol II (ARNpol II su.9). También se ha detectado la

sub-expresión de la subunidad RRP41B del exosoma. Otras proteínas hipotéticas relacionadas con la regulación de la transcripción sub-expresadas a día 1 son las codificadas por el gen LinJ.29.0410, con un dominio PF03874 propio de la subunidad ARN polimerasa Rpb4; y el gen LinJ.14.1290, precursor de un factor de interacción nuclear con dominio LIM. Dichos dominios presentan motivos de unión a zinc que median la interacción proteína-proteína y actúan como factores reguladores de la transcripción.

Otros genes sub-expresados a día 1 relacionados con la expresión génica son un gen codificante de una proteína de unión a nucleótidos (NTbp) y un gen precursor de la subunidad 1 del complejo multiproteico mitocondrial de unión a ARNg (mit ARNbc1). Dicho complejo presenta una función esencial en la edición del ARNm mitocondrial en tripanosomátidos (Ammerman y col., 2012).

En relación con la traducción, se han detectado sub-expresados a día 1 genes constituyentes de la subunidades 40S (S25, S29) y 60S (L17, L38, P2) de los ribosomas, y un gen codificante de una proteína hipotética (LinJ.05.0080) con un dominio PF07890 característico de partículas pre-ribosomales requeridas para la maduración de los ribosomas. También se ha hallado a día 1 la sub-expresión de genes relacionados con la edición del ARNt, entre los que podemos citar: la ARNt sintetasa LinJ.16.1170 y una proteína hipotética (LinJ.03.0690) con un dominio de edición de aminoacil ARNt (PF04073).

Modificaciones post-traduccionales y degradación de proteínas.

A día 1, se ha detectado en el transfectante pIR-PP1-240 la sub-expresión de varios genes relacionados con la modificación post-traduccionales de proteínas. Entre ellos se encuentra el gen precursor de una proteína selenofosfato sintetasa (SePS), cuya actividad está relacionada con la incorporación de selenocisteína durante el proceso de traducción. Esta enzima cataliza la síntesis de seleno-monofosfato a partir de selenio y ATP. Asimismo, se ha observado la sub-expresión del gen dolicol fosfato-fosfatasa, que participa indirectamente en la N-glicosilación de las proteínas mediante la regeneración de dolicol-pirofosfato (Dol-PP) a dolicol-fosfato (Dol-P) para que sea reutilizado nuevamente como intermediario lipídico del proceso.

El gen LinJ.08.0930, sub-expresado a día 1, codifica para una proteína de tipo FKBP. Dichas proteínas pertenecen a la familia de las inmunofilinas y están relacionadas con el plegamiento de proteínas debido a su actividad prolil isomerasa (Chakraborty y col., 2004). También se ha observado la sub-expresión del gen correspondiente a una proteína hipotética que contiene el término GO:0031072 y un dominio DnaJ (PF00226) propio de proteínas de la familia de choque térmico HSP40. Estas proteínas además de regular la actividad ATPasa de proteínas HSP70, actúan como chaperonas que se asocian a proteínas no plegadas y previenen su agregación. Asimismo, se ha detectado la sub-expresión del gen de la glutarredoxina monotiol (1-C-Grx) a día 1. La función de dichas proteínas se

Resultados

relaciona principalmente con los procesos de biogénesis o ensamblaje de centros ferro-sulfurados (Comini y col., 2013).

En cuanto a la degradación de proteínas, se ha observado la sub-expresión a día 1 de un gen codificante de una endopeptidasa (LinJ.31.0110) con actividad hidrolítica de O-sialoproteínas, y otro de una proteína RING (LinJ.24.1680). Ambas presentan un GO:008270 de interacción con iones de zinc. Dichos dominios están implicados en la interacción con ácidos nucleicos y regulación de la expresión génica.

Ciclo celular.

En la línea *knock-in* pIR-PP1-240, se ha hallado la sub-expresión a día 1 de dos genes codificantes de proteínas relacionadas con el ciclo celular: Mad2 y una proteína tipo *Yippee* (YPEL). Mad2 es un elemento regulador fundamental del huso mitótico que controla la separación de cromosomas al final de la mitosis, garantizando la correcta segregación de las cromátidas hermanas (Wassmann y col., 2003). Las proteínas de la familia *Yippee* se localizan próximas a estructuras subcelulares relacionadas con la mitosis y se caracterizan por la presencia de dominios tipo dedos de zinc (Hosono y col., 2004).

Proteínas transportadoras y de superficie.

Se ha detectado la sub-expresión de diferentes proteínas transportadoras en el transfectante pIR-PP1-240. A día 1, se ha observado que está sub-expresado un gen precursor de una proteína mitocondrial transportadora de fosfato (mPCP). Este tipo de proteínas catalizan el transporte de fosfato al interior mitocondrial por cotransporte de protones o intercambio de iones hidroxilo. Un transportador mitocondrial de ácido tricarbónico (DTC) presenta el mismo perfil de expresión. Los DTC catalizan el cotransporte de diferentes tipos de tricarbónicos protonados con dicarbónicos no protonados. Además, se encuentran también sub-expresados a día 1 varios genes relacionados con el transporte de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi. Entre ellas, una proteína *SNARE*, la proteína Sec20, y dos proteínas GOLD (Golgi *dynamics*). Sec 20 es una proteína que forma parte del complejo *SNARE* implicada en el flujo retrógrado de vesículas en levaduras (Burri y col., 2003). Las proteínas GOLD pertenecen a la familia p24 y son componentes fundamentales de las vesículas que están implicadas en el transporte de moléculas con carga desde el RE al aparato de Golgi.

Por otro lado, destaca la sub-expresión a día 1 del gen codificante de la proteína de membrana tuzina. Aunque esta proteína presenta una función desconocida, se encuentra situada en el cromosoma 8 contiguo al gen δ -amastina, cuya familia está relacionada con procesos severos de la enfermedad (Jackson, 2010). Además, a día 3, está sub-expresado un transportador de la superfamilia de proteínas con *cassette* de unión a ATP (ABC).

Diferenciación celular, estrés y apoptosis.

Entre los escasos genes que se encuentran sobre-expresados en el transfectante pIR-PP1-240, destaca a día 1 el gen precursor de la proteína A2. Esta proteína, propia del estadio amastigote, se localiza en el RE (GO:0005783) y está asociada a procesos de estrés celular (GO:0033554). Por el contrario, el gen de la endonucleasa G mitocondrial se ha hallado sub-expresado a día 1. Una de las principales funciones descritas para esta proteína es su implicación en procesos de apoptosis celular (Gannavaram y col., 2008; Rico y col., 2014). Por otro lado, dos genes codificantes de proteínas específicas de promastigotes metacíclicos, META1 y SHERP, están sub-expresados a día 3. Además, en relación a los procesos de diferenciación celular, se ha hallado sub-expresado a día 5 el gen codificante de la proteína ATG8.

Metabolismo.

Dos genes relacionados con procesos metabólicos del glicosoma están sub-expresados a día 1. Entre ellos, se encuentra una enzima implicada en los mecanismos de adquisición de purinas procedentes del hospedador, la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). La otra enzima glicosomal es la 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa (HORP), involucrada en el metabolismo de glioxilato de *Leishmania* spp. Asimismo, se encuentra sub-expresado a día 1 el gen de la pteridina reductasa 1 (PTR1), una enzima relacionada con el metabolismo de pteridinas y folatos (Nare y col., 1997).

Señalización celular.

Se ha detectado la sobre-expresión a día 1 de dos serina-treonina fosfatasa de la familia PP1 codificadas por el cromosoma 34 (LinJ.34.0840 y LinJ.34.0850). Además, está sub-expresado a día 1 un gen codificante de una proteína hipotética con un dominio catalítico PF0078 y GO:0004143 propio de diacil glicerol quinasas (DGK). En organismos eucariotas, estas enzimas catalizan la conversión del segundo mensajero diacilglicerol (DAG) en ácido fosfatídico (AP), reiniciando la síntesis de fosfatidilinositoles y atenuando la actividad de la proteína quinasa C (PKC).

En la Figura 50 se representa el perfil de expresión génica del transfectante pIR-PP1-240 relativo a los genes de función conocida diferencialmente expresados en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.

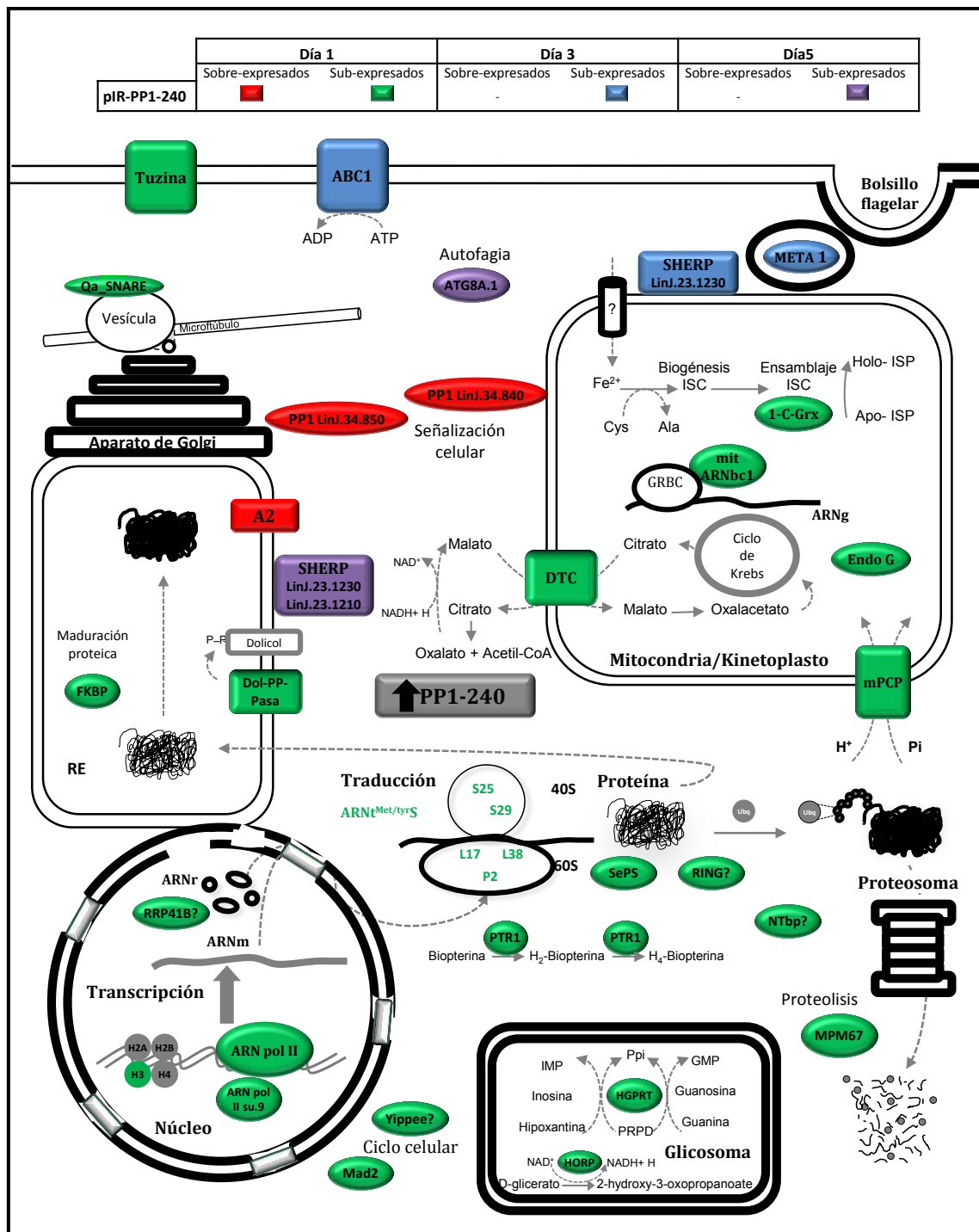


Figura 50. Esquema del perfil de expresión génica diferencial del transfectante pIR-PP1-240. Se detallan los genes diferencialmente expresados codificantes para proteínas de función conocida en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento, indicando la localización subcelular y relaciones funcionales de las proteínas que codifican.

4.5.4.2.- Análisis de la expresión génica diferencial en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR.

4.5.4.2.1.- Perfil de expresión génica.

Según los análisis de secuenciación masiva llevados a cabo mediante RNA-Seq, los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T presentan un total de 92 genes diferencialmente expresados respecto a los promastigotes control transfectados con pIR en el periodo de tiempo analizado (días 1, 3 y 5) (Tabla 24). Según las anotaciones de la base de datos *TriTrypDB*, el 39% corresponden a genes codificantes de proteínas de función conocida (46 genes) y el 61% representa genes precursores de proteínas hipotéticas o de función desconocida (56 genes). De acuerdo a los días de la curva de crecimiento, el 84% de los genes diferencialmente expresados se detectan a día 1 y el 15,2% restante en los días 3 y 5. Del total de genes diferencialmente expresados a día 1, el 88,2% se encuentra sub-expresado (75 genes) y el 11,8% está sobre-expresado (3 genes). El conjunto de genes diferencialmente expresados a día 3 está sobre-expresado. Por el contrario, todos los genes excepto uno se encuentran sub-expresados a día 5.

Tabla 24. Frecuencias absolutas de genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Se muestra el número de genes diferencialmente expresados (GDE) en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T respecto a pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Los genes se clasifican según la base de datos *TriTrypDB* en: genes de función conocida, y genes codificantes de proteínas hipotéticas conservadas y de función desconocida. La selección de los genes diferencialmente expresados se basa en los criterios: *Fold change* (F) $\geq 1,7$ (sobre-expresados) o $\leq -1,7$ (sub-expresados), y valor de significación estadística $\alpha = 0,05$ según el test de la t de *Student*. N hace referencia al número de genes.

	Día 1		Día 3		Día 5		Total GDE
	sobre-expresados	sub-expresados	sobre-expresados	sub-expresados	sobre-expresados	sub-expresados	
Función conocida (N)	1	28	2	0	1	4	36
Proteínas hipotéticas y de función desconocida (N)	2	47	5	0	0	2	56
% GDE	3,3	81,5	7,6	0	1,1	6,5	N=92 100

El análisis global del perfil de expresión génica en el transfectante pIR-PP1-240T refleja un predominio de la sub-expresión (Figura 51), ya que representa un 88% del total de genes diferencialmente expresados. Además, cabe destacar que la mayoría de los genes sub-expresados (92,6%) se observan a día 1.

Resultados

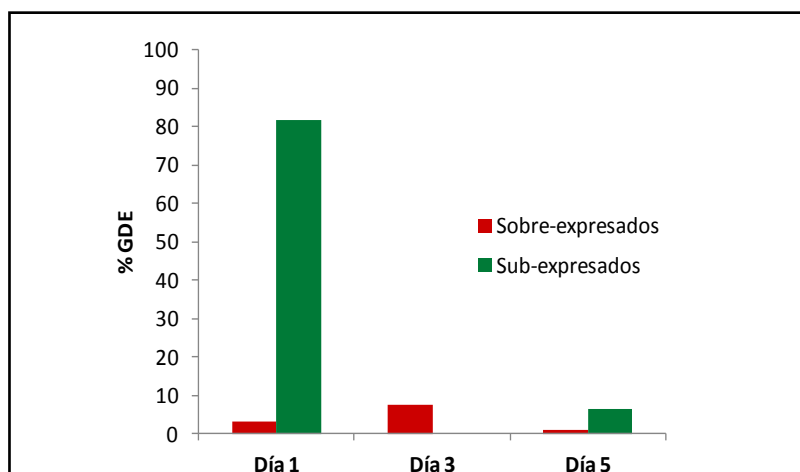


Figura 51. Proporción de genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. El histograma muestra la distribución del número total de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240T respecto a pIR (n=92) como porcentaje de genes sobre-expresados (rojo) y sub-expresados (verde), en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de promastigotes axénicos. Se considera que un gen está diferencialmente expresado si $F \geq 1,7$ (sobre-expresado) o $\leq -1,7$ (sub-expresado), siendo el valor de significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,005$), según el test de la t de Student.

4.5.4.2.2.- Asignación de términos de Gene Ontology.

Los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240T fueron analizados con *BLAST2GO* para estudiar el efecto de la sobre-expresión de la proteína PP1-240T en el transcriptoma de *L. infantum*. Del total de genes considerados diferencialmente expresados (92 genes), sólo el 46,7% presenta anotaciones de GO (43 genes) (Tabla 25). Dichas anotaciones se asocian fundamentalmente con el conjunto de genes sub-expresados a día 1.

Tabla 25. Frecuencias de genes diferencialmente expresados con términos de GO anotados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Se describe el número de genes diferencialmente expresados (*N* GDE) y el número de términos de GO asociados (*N* GO) en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T respecto a pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Los genes diferencialmente expresados se clasifican como sobre-expresados si $F \geq 1,7$ o sub-expresados si $F \leq -1,7$, con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) según el test de la t de Student.

Día	Nivel de expresión	<i>N</i> GDE	<i>N</i> GO
Día 1	Sobre-expresados	3	2
	Sub-expresados	75	31
Día 3	Sobre-expresados	7	3
	Sub-expresados	0	0
Día 5	Sobre-expresados	1	1
	Sub-expresados	6	5

Según los análisis de GO (Figura 52), los principales procesos biológicos sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240T son la traducción y organización de orgánulos, seguidos por el plegamiento de proteínas, transporte y metabolismo. Los procesos mencionados se relacionan fundamentalmente con las funciones moleculares de constitución de ribosomas, unión a ARN y unión a proteínas. También destaca a día 1 la sub-expresión de genes relacionados con las actividades quinasa y fosfotransferasa.

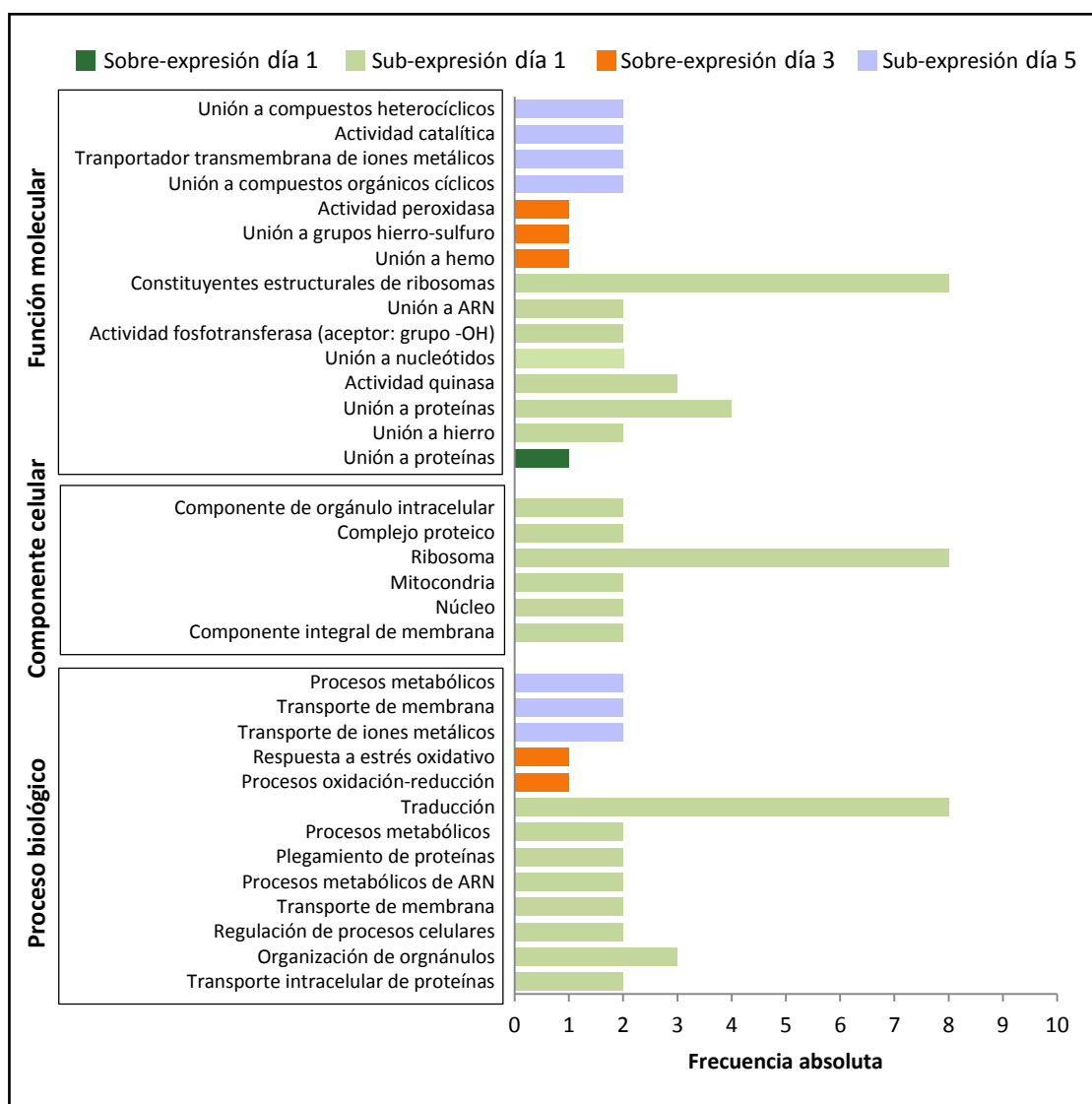


Figura 52. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240T vs. pIR según la terminología GO. El histograma muestra las frecuencias absolutas de términos de la nomenclatura controlada GO que han sido anotados en los genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T respecto a pIR. Los términos GO han sido clasificados de acuerdo a las ontologías génicas: proceso biológico, componente celular y función molecular. Se detalla el nivel de expresión génica diferencial como sobre-expresión o sub-expresión en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de promastigotes axénicos. No han sido representados los términos GO asociados al gen en estudio LinJ.15.0240 ya que su presencia está inducida directamente por el transfectante pIR-PP1-240T en todos los días de la curva analizados.

Resultados

En cuanto a los términos de GO relativos a los componentes celulares (Figura 52), se han anotado ocho genes sub-expresados a día 1 relacionados con el ribosoma. Asimismo, a día 1 se sub-expresan diferentes genes vinculados a otros orgánulos como la mitocondria, el núcleo, complejos proteicos y componentes de membrana. De acuerdo a la terminología de GO, a día 1 sólo se ha detectado la sobre-expresión de la función molecular de unión a proteínas. No hay ningún GO asociado a las funciones moleculares de los genes sobre-expresados a día 1. En relación al día 3, se sobre-expresan diversos genes relativos a los procesos biológicos de la oxidación-reducción y la respuesta al estrés oxidativo. Éstos están vinculados con la sobre-expresión de las funciones moleculares peroxidasa y unión a grupos hierro-sulfuro. A día 5, están sub-expresados seis genes asociados con el metabolismo y transporte de moléculas. Estos procesos se relacionan fundamentalmente con las funciones de unión a compuestos heterocíclicos, transporte de membrana y actividad catalítica.

4.5.4.2.3.- Análisis de enriquecimiento de términos de GO sub-expresados a día 1.

A partir de los términos de GO anotados a día 1, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento estableciendo como referencia el genoma de *L. infantum* (JPCM5). En la Figura 53 se representa la importancia de términos de GO sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240T en función del valor de p ($< 0,05$) obtenido mediante el test exacto de Fisher. Dicho estudio evidencia la representatividad de diversos procesos celulares como la traducción, expresión génica, metilación de proteínas y procesos metabólicos de la riboflavina en pIR-PP1-240T. Otros procesos destacados en el conjunto de genes en estudio son el transporte mitocondrial de proteínas y la activación de la proteína quinasa C por proteína G.

En lo relativo a las funciones moleculares, la muestra está enriquecida con genes relacionados con la constitución estructural de ribosomas, seguido de las actividades selenofosfato sintetasa, receptor SNAP y glutatión reductasa. El enriquecimiento en estos términos también se ha detectado en la línea *knock-in* pIR-PP1-240. Otras funciones notorias en las que está enriquecido el transfectante pIR-PP1-240T son la actividad riboflavina quinasa y la actividad carboxi O-metil transferasa. El componente celular más destacado en función de su significación estadística a día 1 es el ribosoma. Asimismo, se encuentra representado entre el conjunto de genes sub-expresados a día 1 el complejo *SNARE*, al igual que ocurre en el transfectante pIR-PP1-240.

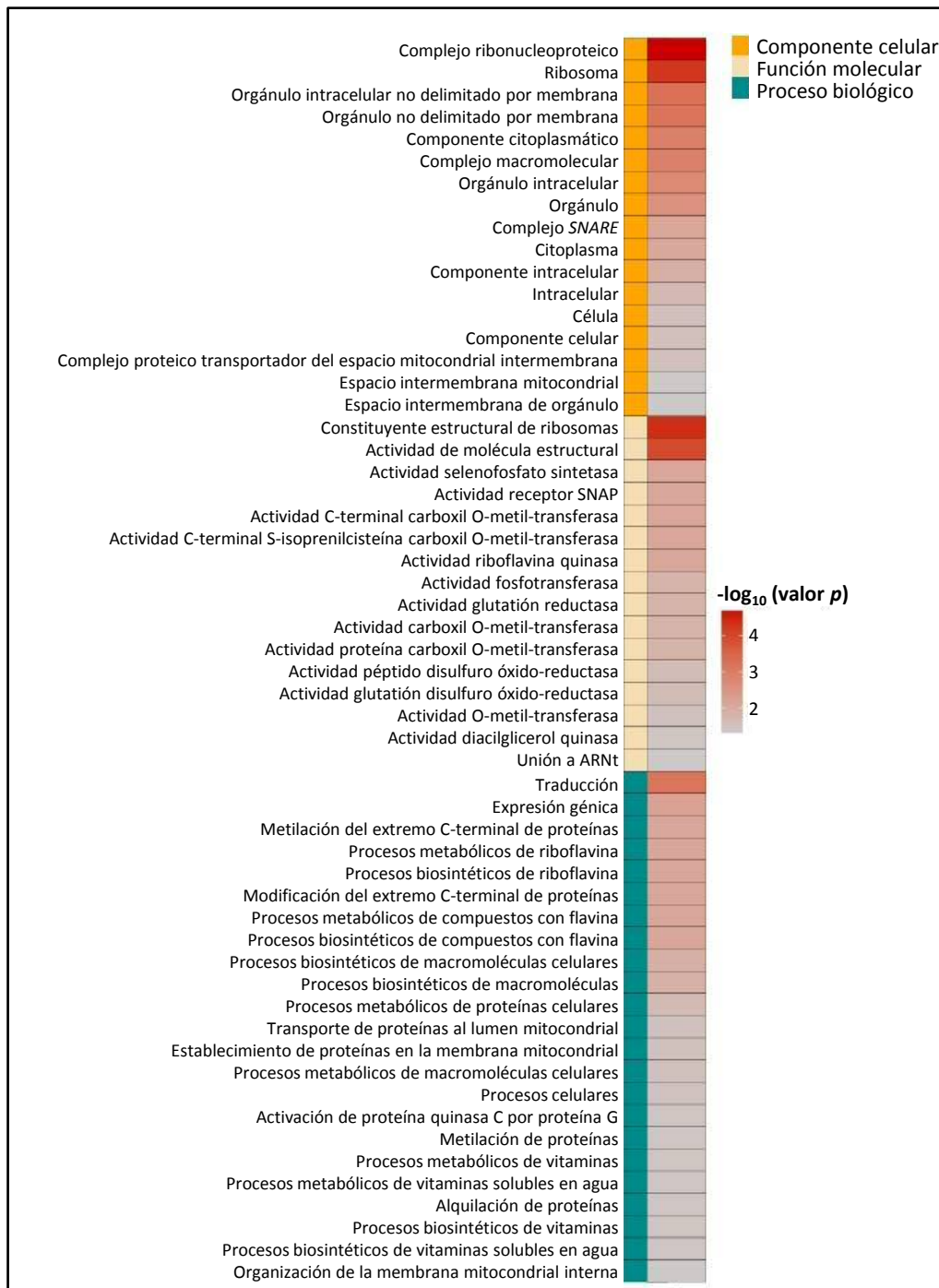


Figura 53. Análisis de enriquecimiento en términos de GO de los genes sub-expresados a día 1 en el transfectante PIR-PP1-240T vs. PIR. La gráfica representa la distribución de términos de GO según su significación estadística (valor p) en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con PIR-PP1-240T respecto a PIR. Se considera que el conjunto de datos está enriquecido en un término GO si $p < 0,05$ según el test exacto de Fisher (*BLAST2GO*). Los términos de GO se agrupan en las ontologías correspondientes a componente celular, función molecular y proceso biológico. El genoma de *L. infantum* cepa JPCM5 fue empleado como conjunto de referencia. Los identificadores de los términos GO representados se describen en el Anexo XVI.

Resultados

4.5.4.2.4.- Estudio de los genes diferencialmente expresados.

Los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240T respecto a los promastigotes transfectados con pIR, se describen en las Tablas 26, 28 y 30 si $F > 1,7$ (sobre-expresados) o en las Tablas 27 y 29 si $F < -1,7$ (sub-expresados). En cada tabla se detalla el valor F , $\log_2 F$ y el valor de p .

Tabla 26. Genes sobre-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); $\log_2 F$ y p , valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. El gen PP1 LinJ.15.0240 integrado en su versión truncada en el transfectante pIR-PP1-240T se destaca en negrita y en cursiva.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.15.0240	Subunidad catalítica PP1, putativa	67,18	6,07	0,000
LinJ.19.0240	Proteína hipotética conservada	1,74	0,80	0,000
LinJ.30.0040	Proteína hipotética conservada	1,88	0,91	0,002

Tabla 27. Genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); $\log_2 F$ y p , valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.01.0040	Proteína hipotética de función desconocida	-1,80	-0,85	0,009
LinJ.01.0060	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,87	0,039
LinJ.01.0110	Glutarredoxina monotiol, putativa	-2,33	-1,22	0,000
LinJ.01.0190	Proteína hipotética conservada	-2,00	-1,00	0,045
LinJ.01.0590	Proteína transportadora de tricarboxilatos, putativa	-1,72	-0,78	0,016
LinJ.02.0240	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,017
LinJ.02.0290	Proteína de procesamiento de ARNr, putativa	-2,00	-1,00	0,009
LinJ.03.0240	Proteína ribosomal L38, putativa	-1,88	-0,91	0,043
LinJ.03.0560	Proteína hipotética conservada	-1,78	-0,83	0,006
LinJ.03.0690	Proteína hipotética conservada	-1,80	-0,85	0,001
LinJ.04.0250	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,034
LinJ.06.0230	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,018
LinJ.06.1060	Proteína hipotética conservada	-1,78	-0,83	0,011
LinJ.07.1130	Proteína de unión a ARN, putativa	-1,85	-0,89	0,003
LinJ.08.0170	Proteína hipotética conservada	-1,73	-0,79	0,013
LinJ.08.0260	Proteína hipotética conservada	-1,92	-0,94	0,023
LinJ.08.0750	Tuzina, putativa	-1,75	-0,81	0,003
LinJ.08.0860	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,014
LinJ.08.1190	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,033
LinJ.09.0910	Proteína hipotética conservada	-1,91	-0,93	0,036
LinJ.09.1490	Proteína hipotética conservada	-1,79	-0,84	0,027
LinJ.10.0190	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,008
LinJ.10.0940	FKBP peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa, putativa	-2,03	-1,02	0,000
LinJ.13.0140	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,87	0,001

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.13.0260	N-acetiltransferasa ARD1, putativa	-1,74	-0,80	0,007
LinJ.15.1200	Proteína ribosomal ácida de tipo P2	-2,62	-1,39	0,017
LinJ.15.1530	Proteína ribosómica S6, putativa, proteína de tipo RS6/NPH2	-1,79	-0,84	0,010
LinJ.16.0170	Proteína ribosómica 50S L17, putativa	-1,96	-0,97	0,014
LinJ.16.1170	Proteína de tipo tirosil/metionil ARNt sintetasa	-1,74	-0,80	0,027
LinJ.17.0430	Proteína SNARE (Qa), putativa	-1,79	-0,84	0,002
LinJ.17.1440	Proteína hipotética conservada	-2,10	-1,07	0,010
LinJ.19.0440	Proteína de ensamblaje de nucleosomas, putativa	-1,87	-0,90	0,000
LinJ.19.0490	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,004
LinJ.19.0780	Proteína hipotética conservada	-1,97	-0,98	0,000
LinJ.19.1210	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,87	0,005
LinJ.20.0210	Proteína hipotética de función desconocida	-2,46	-1,30	0,002
LinJ.20.1490	Proteína hipotética conservada	-2,22	-1,15	0,000
LinJ.21.0140	Proteína hipotética conservada	-2,06	-1,04	0,027
LinJ.21.0600	Proteína de unión a ARN Ia, putativa	-1,77	-0,82	0,001
LinJ.21.1570	Proteína hipotética conservada	-2,11	-1,08	0,000
LinJ.21.1790	Proteína ribosómica 40S S11, putativa	-1,83	-0,87	0,031
LinJ.21.2150	Proteína ribosómica 40S S6, putativa (RPS6)	-2,30	-1,20	0,039
LinJ.22.0140	Proteína hipotética conservada	-1,79	-0,84	0,026
LinJ.22.0230	Proteína hipotética de función desconocida	-1,92	-0,94	0,002
LinJ.22.0900	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,015
LinJ.24.1170	Proteína hipotética conservada	-1,84	-0,88	0,009
LinJ.24.1680	Proteína RING-box, putativa	-1,85	-0,89	0,025
LinJ.25.0240	Proteína hipotética conservada	-2,13	-1,09	0,034
LinJ.25.1220	Proteína ribosómica S25	-3,18	-1,67	0,041
LinJ.25.1740	Componente regulador del huso mitótico rev7, putativa	-1,78	-0,83	0,023
LinJ.25.1970	Proteína hipotética conservada	-2,06	-1,04	0,039
LinJ.26.1310	Proteína hipotética conservada	-1,73	-0,79	0,011
LinJ.26.2150	Proteína hipotética conservada	-1,97	-0,98	0,016
LinJ.27.1490	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,033
LinJ.28.0120	Subunidad 9 de la RNA polimerasa II dirigida por ADN, putativa	-2,11	-1,08	0,026
LinJ.28.2360	Proteína ribosómica S29, putativa	-2,17	-1,12	0,005
LinJ.29.0410	Proteína hipotética conservada	-2,03	-1,02	0,011
LinJ.30.0430	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,008
LinJ.30.2640	Proteína hipotética conservada	-2,06	-1,04	0,009
LinJ.30.2750	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,031
LinJ.30.3520	Proteína de unión a Zinc (<i>Yippe</i>), putativa	-1,89	-0,92	0,029
LinJ.30.3650	Proteína ribosómica 40S S14	-2,14	-1,10	0,045
LinJ.30.3730	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,022
LinJ.31.1580	Proteína hipotética conservada	-1,80	-0,85	0,041
LinJ.32.3760	Proteína hipotética conservada	-2,57	-1,36	0,003
LinJ.33.2710	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,025
LinJ.34.0240	Proteína hipotética de función desconocida	-1,71	-0,77	0,003
LinJ.34.0410	Proteína hipotética de función desconocida	-1,84	-0,88	0,020
LinJ.35.0600	Proteína ribosómica 60S L18a, putativa	-1,84	-0,88	0,041
LinJ.35.2160	Proteína hipotética de función desconocida	-1,85	-0,89	0,037
LinJ.35.3080	Carboximetiltransferasa específica de proteína prenilada,	-1,72	-0,78	0,006

Resultados

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.35.3210	Riboflavina quinasa, proteína de tipo adenililtransferasa FMN	-1,72	-0,78	0,008
LinJ.36.1660	Proteína hipotética conservada	-1,74	-0,80	0,006
LinJ.36.5650	Selenofosfato sintetasa, putativa	-1,74	-0,80	0,040
LinJ.36.6730	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,045

Tabla 28. Genes sobre-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. El gen PP1-LinJ.15.0240 integrado en su versión truncada en el transfectante de sobre-expresión pIR-PP1-240T se destaca en negrita y en cursiva.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.04.0600	Proteína hipotética conservada	1,72	0,78	0,008
<i>LinJ.15.0240</i>	<i>Subunidad catalítica PP1, putativa</i>	<i>26,54</i>	<i>4,73</i>	<i>0,000</i>
LinJ.15.1610	Proteína hipotética conservada	1,73	0,79	0,041
LinJ.23.1370	Proteína hipotética conservada	2,22	1,15	0,042
LinJ.24.2400	Proteína hipotética conservada	2,68	1,42	0,048
LinJ.32.0530	Proteína hipotética conservada	2,01	1,01	0,034
LinJ.35.3510	Peroxidasa	1,91	0,93	0,035

Tabla 29. Genes sobre-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. El gen PP1-LinJ.15.0240 integrado en su versión truncada en el transfectante de sobre-expresión pIR-PP1-240T se destaca en negrita y en cursiva.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
<i>LinJ.15.0240</i>	<i>Subunidad catalítica PP1, putativa</i>	<i>28,05</i>	<i>4,81</i>	<i>0,000</i>

Tabla 30. Genes sub-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.03.0820	Proteína hipotética conservada	-1,99	-0,99	0,000
LinJ.04.0300	β -fructofuranosidasa, putativa	-1,82	-0,86	0,012
LinJ.29.0930	Proteína hipotética conservada	-2,25	-1,17	0,000
LinJ.30.1630	Reductasa férrica, putativa	-1,74	-0,80	0,023
LinJ.31.3180	Proteína de tipo transportador de hierro/zinc	-1,92	-0,94	0,000
LinJ.31.3190	Proteína de tipo transportador de hierro/zinc	-2,04	-1,03	0,006

Como puede observarse en la Tabla 31, el gen de interés LinJ.15.0240 está sobre-expresado en todos los días de la curva de crecimiento analizados en el transfectante pIR-PP1-240T. Sin embargo, la sobre-expresión del transcrito es aproximadamente 2,5 veces

mayor a día 1 (F=67,18) respecto a día 3 (26,54) y 5 (28,05). En consonancia con los niveles de expresión del gen LinJ.15.0240, el día que presenta el mayor número de genes diferencialmente expresados es el día 1 (78 genes). Sin embargo, el número de genes diferencialmente expresado se reduce considerablemente a día 3 (7 genes) y 5 (7 genes). Además, según los criterios establecidos no se ha observado ningún gen sub-expresado a día 3.

Tabla 31. Tasa de variación (*Fold change*) del gen LinJ.15.0240 en su versión truncada (T) en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.

	<i>Fold change</i>		
	Día 1	Día 3	Día 5
LinJ.15.0240-T	67,18	26,54	28,05

De acuerdo a los estudios de GO, la presencia de dominios proteicos conservados y las anotaciones de la base de datos *TriTrypDB*, los genes diferencialmente expresados descritos en las Tablas 14-18 pueden ser agrupados en las siguientes funciones:

Expresión génica.

En la línea *knock-in* pIR-PP1-240T, se ha hallado la sub-expresión a día 1 de diversos genes relativos a la regulación de la expresión génica. Entre ellos destacan varios genes previamente citados en el transfectante pIR-PP1-240 como el gen de la subunidad 9 de la ARN pol II, relacionado con el inicio de la transcripción, y el gen codificante de la subunidad RRP41B, asociada al complejo del exosoma. Como se mencionó en la sección 4.4.2.4, este complejo interviene en el proceso de maduración del ARNr 5,8S en *Trypanosoma* (Estevez y col., 2001). Otros genes codificantes de proteínas de función conocida cuya sub-expresión se ha detectado en pIR-PP1-240T son el gen LinJ.19.0440 precursor de una proteína de ensamblaje de nucleosomas (NAP) y dos genes de unión a ácidos nucleicos. Uno de ellos, LinJ.07.1130 (ARNbp), presenta un dominio de tipo nucleoplasmina/nucleofosmina (PF03066). Se ha descrito la participación de esta clase de proteínas en diversos procesos celulares como la remodelación de la cromatina, la estabilidad genómica, la biogénesis de ribosomas, la duplicación del ADN y la regulación de la transcripción (Frehlick y col., 2007). El otro gen de unión a ácidos nucleicos sub-expresado es el gen LinJ.21.0600, precursor de una proteína de unión a ARN (La ARNbp). La proteína La ARNbp presenta un dominio tipo IPR002344 propio de la proteína La lupus, la cual actúa como autoantígeno en enfermedades como el lupus eritematoso sistémico o el síndrome de *Sjogren* en el hombre. En organismos eucariotas, la proteína La lupus presenta una localización dinámica, pudiendo ser observada tanto en el núcleo, actuando como un factor de transcripción de la ARN polimerasa III, como en el citoplasma comportándose como un factor de traducción. Además, la proteína La ARNbp actúa como un elemento regulador de diferentes tipos de ARN, protegiéndolos de la digestión por endonucleasas y facilitando su exportación del núcleo (revisado en Wolin y Cedervall, 2002).

Resultados

Otros genes codificantes de proteínas hipotéticas sub-expresados a día 1 y comunes al transfectante pIR-PP1-240 son: LinJ.03.0690 con un dominio de edición aminoacil ARNt (PF04073), LinJ.29.0410 con un dominio característico de ARN polimerasa Rbp4 (PF03874) y LinJ.25.0240 con un dominio propio de factores de empalme de ARNm del complejo RES (*Retention and Splicing*) (PF09736). También se han hallado otros genes precursores de proteínas hipotéticas diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1-240T. A día 1, está sub-expresado un gen codificante de una proteína con GO:0003676 de unión a ácidos nucleicos (LinJ.06.1060) y una proteína con PF05047 asociado a proteínas ribosomales de la mitocondria (LinJ.31.1580). A día 3, está sobre-expresado un gen codificante de una proteína hipotética con un dominio radical SAM (PF04055)/formación de base *Wyosine* (PF08608). Este tipo de moléculas catalizan diferentes reacciones como metilaciones inusuales, inserción de grupos sulfuro y formación de radicales proteicos, entre otros. La *base Wyosine* es una base modificada de ARNt cuya biosíntesis ha sido estudiada en *Trypanosoma* a nivel mitocondrial (Sample y col., 2015).

Además, se ha observado la sub-expresión de varios genes relacionados con funciones traduccionales como proteínas ribosómicas de la subunidad 40S (S6, S11, S14, S25, S29), de la subunidad 60S (L17, L18a, L38) y la proteína ribosómica ácida P2.

Modificaciones post-traduccionales.

En la línea *knock-in* pIR-PP1-240T, se ha detectado la sub-expresión a día 1 de dos genes codificantes de proteínas de función conocida asociadas a modificaciones post-traduccionales de proteínas. La subunidad NAT-ARD1 es una proteína con actividad N-acetil transferasa que forma parte del complejo NAT-ARD1 y cataliza la acetilación de proteínas a partir de acetil Co-A. La otra proteína es una carboximetil transferasa que dirige la metilación de proteínas preniladas (PPSCMT).

Otros genes que están sub-expresados tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1240T son: una selenofosfato sintetasa que interviene en la adición de selenocisteínas durante la traducción de proteínas, y una FKBP con actividad prolil *cis-trans* isomerasa implicada en el plegamiento de proteínas. Además, se ha observado la sub-expresión a día 1 del gen precursor de una proteína RING previamente detectada en pIR-PP1-240.

Transporte y proteínas transmembrana.

Cuatro genes codificantes de proteínas relacionadas con el transporte de moléculas se han hallado sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240T. Dos de ellos, un transportador de ácidos tricarbóxicos y una proteína tipo *SNARE*, se han observado también en el transfectante pIR-PP1-240 (sección 4.4.2.4). Los otros genes detectados corresponden a una proteína hipotética relativa al complejo translocasa mitocondrial TOM (GO: 0042719) (LinJ.22.0140) y una proteína de la familia *GOLD* implicada en el transporte de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi. (LinJ.34.0240). Además, al igual que ocurre en pIR-PP1-240, está sub-expresado a día 1 el gen codificante de tuzina, una proteína de membrana de función desconocida.

Ciclo celular, estrés oxidativo y señalización celular.

Los genes codificantes de las proteínas Mad2 y *Yippee*, implicadas en la regulación del ciclo celular durante la mitosis, se encuentran sub-expresados a día 1. También está sub-expresado a día 1 el gen codificante de una proteína hipotética con actividad diacilglicerol quinasa según los estudios de ontología génica. Este perfil de expresión descrito a día 1 se ha observado también en el transfectante pIR-PP1-240 (sección 4.4.2.4).

Además, en el día 3 está sobre-expresado un gen peroxidasa relacionado con la respuesta al estrés oxidativo y una proteína hipotética que ha sido anotada como proteína fosforilada (LinJ.04.0600) (Tsigankov y col., 2013).

Adquisición y procesamiento de hierro.

Dos genes implicados en la adquisición de hierro están sub-expresados a día 5. Estos genes son ortólogos de la reductasa férrica LFR1 (Fe RED) y del transportador transmembrana del ión ferroso LIT1 (Fe/Zn T) (Flannery y col., 2013). Al igual que ocurre en pIR-PP1-240, está sub-expresado a día 1 el gen codificante de una glutarredoxina monotiólica (1-C-Grxs) cuya actividad está relacionada con la biogénesis o ensamblaje de centros ferro-sulfurados (Comini y col., 2013).

Metabolismo.

La riboflavina quinasa (RFK) se encuentra sub-expresada a día 1. Esta enzima cataliza la síntesis de flavina mononucleótido (FMN) a partir de flavina y ATP. El FMN actúa como grupo prostético y cofactor de diferentes óxido-reductasas como el NADPH. Además, se ha observado la sub-expresión a día 5 de una enzima relacionada con la adquisición de azúcares, la β -fructofuranosidasa o β -invertasa (β -INV). En *Leishmania*, esta enzima es secretada al medio extracelular para la obtención de energía a partir de la hidrólisis de sacarosa en α -D-glucosa-6 fosfato y β -D-fructosa (Blum y Opperdoes, 1994; Gontijo y col., 1996). En cuanto a las proteínas hipotéticas, está sub-expresado a día 5 un gen codificante de una proteína con dominio PF00173 característico de hemo-proteínas transportadoras de electrones tipo citocromo b5. En *Leishmania*, esta enzima participa en procesos redox del RE liso implicados en la modificación de ácidos grasos.

La Figura 54 ilustra el perfil de expresión génica de los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T respecto al control PIR y la localización de las proteínas correspondientes en la membrana plasmática, las vías de expresión génica y de secreción y algunos procesos metabólicos. De esta representación se excluyen las proteínas hipotéticas y de función desconocidas.

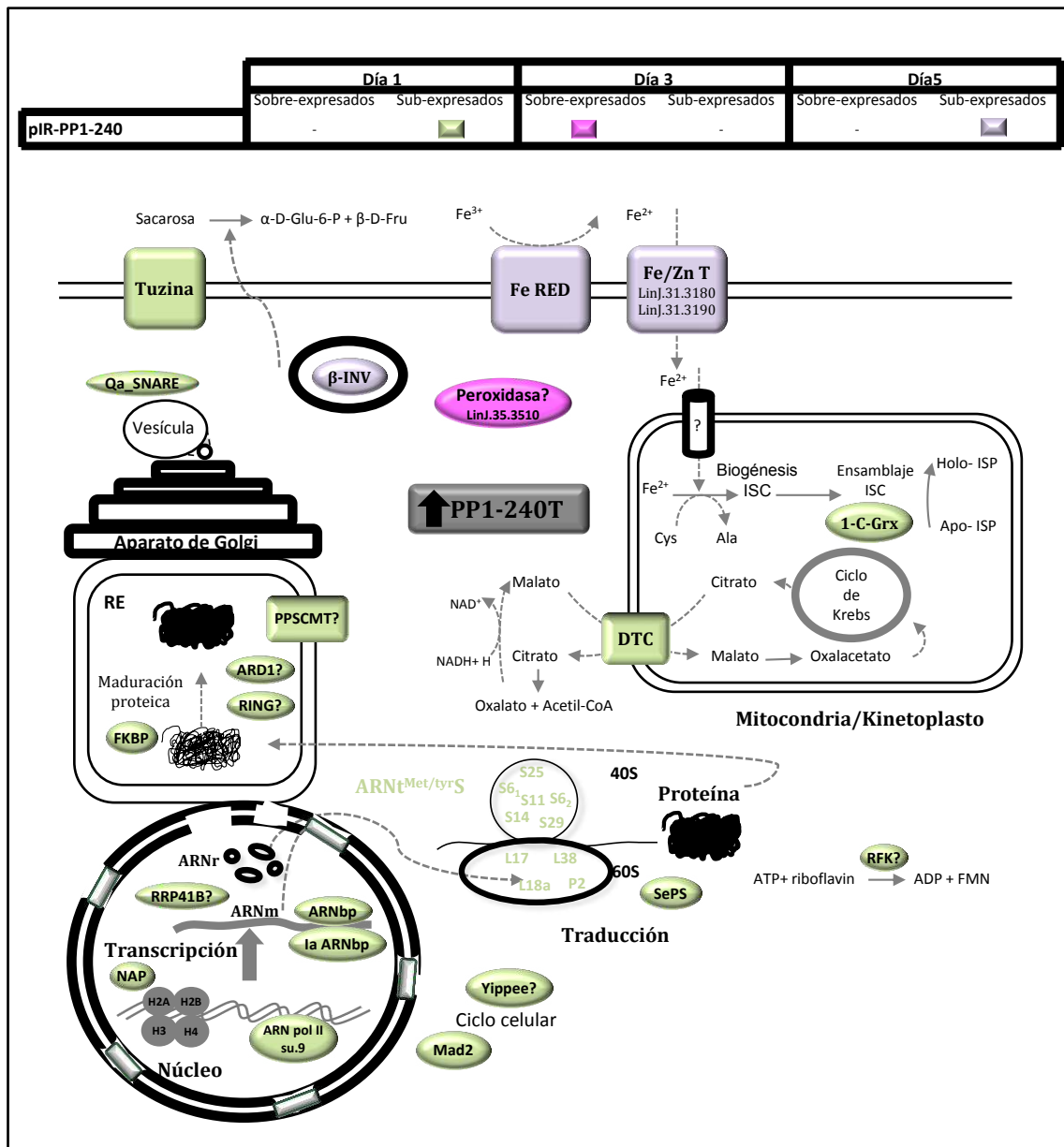


Figura 54. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial del transfectantes pIR-PP1-240T. Se detallan los genes diferencialmente expresados codificantes de proteínas de función conocida en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR, en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento, indicando la localización subcelular y relaciones funcionales de las proteínas que codifican. Abreviatura: ISC, centros ferro-sulfurados.

4.5.4.3.- Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR-PP1-240T diferencialmente expresados a día 1.

Para poder llevar a cabo un análisis comparativo global de los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, se realizó un agrupamiento de los genes en base a sus perfiles de expresión génica. Este análisis se realizó únicamente a partir de los conjuntos de genes diferencialmente expresados a día 1 puesto que representan más del 80% del total de

genes identificados en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Para ello, se aplicó un algoritmo de *clustering* jerárquico basado en la distancia euclídea mediante *edge R* del programa R. El *clustering* está compuesto por un dendrograma y un mapa de intensidad que refleja los niveles de expresión génica (F) en tonalidades verdes si los genes están sub-expresados o en tonos rojos si están sobre-expresados (Figura 55).

En consonancia con los análisis previos, el *clustering* obtenido evidencia un predominio de la sub-expresión entre los genes diferencialmente expresados en ambos transfectantes. El conjunto de genes sub-expresados constituye más del 90% de los genes diferencialmente expresados a día 1. Además, los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T presentan un perfil de expresión similar, de manera que la mayoría de los genes que aparecen sub-expresados o sobre-expresados en una condición también muestran el mismo nivel de expresión en la otra.

El análisis mediante *clustering* ha permitido la organización de los genes diferencialmente expresados en 8 *clusters*. Los 7 primeros representan genes sub-expresados. Entre los genes incluidos en el *cluster* 1 se observan 14 genes que están sub-expresados de manera exclusiva en el transfectante pIR-PP1-240. Estos genes son precursores de proteínas hipotéticas o de función desconocida, salvo un gen que codifica para una O-silalopectidasa. El *cluster* 2 incluye 3 genes de función conocida propios del transfectante pIR-PP1-240. Estos genes codifican para la histona H3, la ARN pol II y la dolicol pirofosfato fosfatasa. En el *cluster* 3 se observan 4 genes presentes en pIR-PP1-240T que no están sub-expresados en pIR-PP1-240, estando únicamente dos de ellos anotados como genes de función conocida: S6 y S14. El *cluster* 4 está integrado por genes comunes a los dos transfectantes que presentan el mayor nivel de sub-expresión observado: las proteínas ribosomales S25 y P2, y el gen 1-C-Grx. Entre los genes de función conocida presentes en el *cluster* 5 destaca el gen HORP, exclusivo del transfectante pIR-PP1-240. Además, el *cluster* 6 presenta 2 genes de función conocida característicos del perfil de expresión de pIR-PP1-240T, el gen precursor de ARD1 y de la riboflavina quinasa RfK. El *cluster* 6 está compuesto por 15 genes sub-expresados únicamente en pIR-PP1-240T. Aunque la mayoría corresponde a genes codificantes de proteínas hipotéticas, existen varios genes relacionados con funciones conocidas como la constitución de ribosomas (S11, S6, L18a), regulación de la transcripción (NAP, ANRpol II y la ARNpol II) y en la metilación de proteínas preniladas (LinJ.35.3080). El *cluster* 7 está integrado únicamente por genes sub-expresados en pIR-PP1-240. Entre estos genes se incluyen la endonucleasa G, la PTR1 y dos genes relacionados con el transporte mitocondrial (la subunidad 1 del complejo mitocondrial y un precursor mitocondrial de proteínas transportadoras de fosfato). Por otra parte, los genes sobre-expresados están agrupados en el *cluster* 8. Entre los genes sobre-expresados de manera exclusiva en pIR-PP1-240 destacan la proteína A2 y las PP1 LinJ.34.0840 y LinJ.34.0850. El gen que presenta el mayor nivel de sobre-expresión en pIR-PP1-240T es precursor de una proteína hipotética de función desconocida.

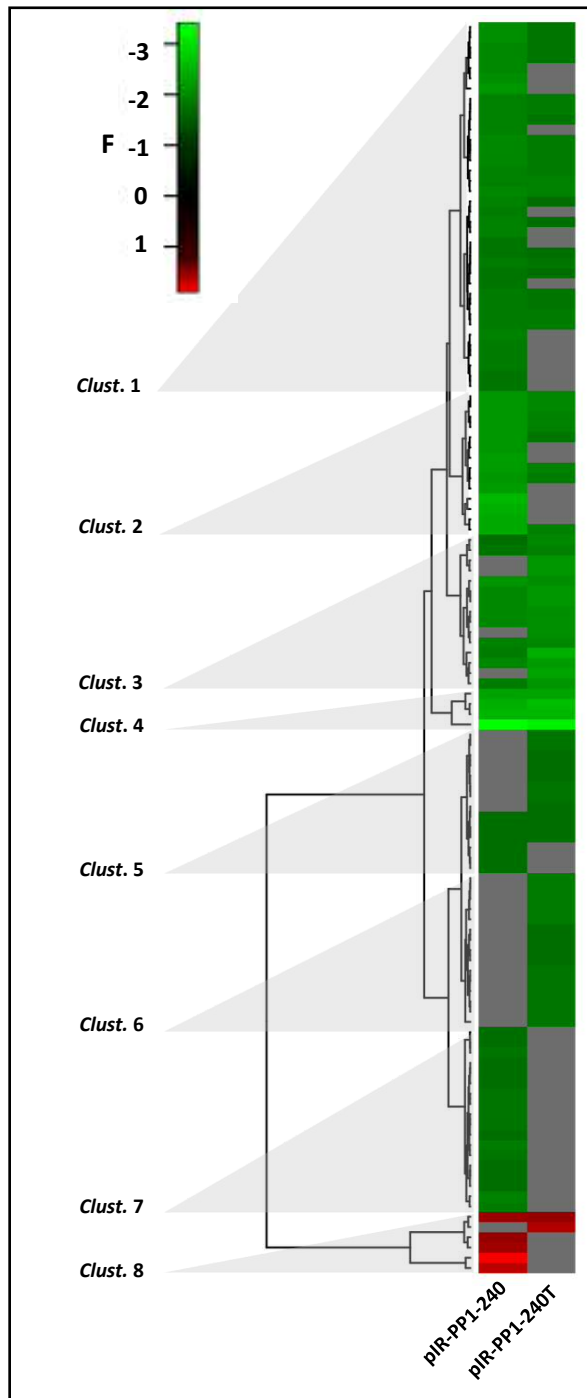


Figura 55. Clustering jerárquico de los GDE a día 1 en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T vs. pIR. El gráfico muestra el *clustering* jerárquico elaborado en base a la distancia euclídea y el mapa de intensidad obtenido en función de los niveles de expresión de los GDE a día 1 en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T respecto al control pIR. Los genes se consideran sobre-expresados si F es $\geq 1,7$ (rojo) o sub-expresados si F es $\leq -1,7$ (verde), con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) según el test de la t de *Student*. Se representan en gris los genes que no cumplen criterios definidos para F y p.

El análisis de los conjuntos de genes sub-expresados en pIR-PP1-240 y en pIR-PP1-240T refleja una intersección de 48 genes (Figura 56). Estos genes comunes representan más de la mitad de los genes sub-expresados a día 1 en ambos transfectantes, lo que indica que los perfiles de expresión son similares. De los 48 genes comunes, sólo 17 codifican proteínas de función conocida, mientras que 31 corresponden a proteínas hipotéticas o de función desconocida. Además, se han identificado 68 genes no comunes, siendo 41 genes propios del transfectante pIR-PP1-240 y 27 genes específicos de pIR-PP1-240T.

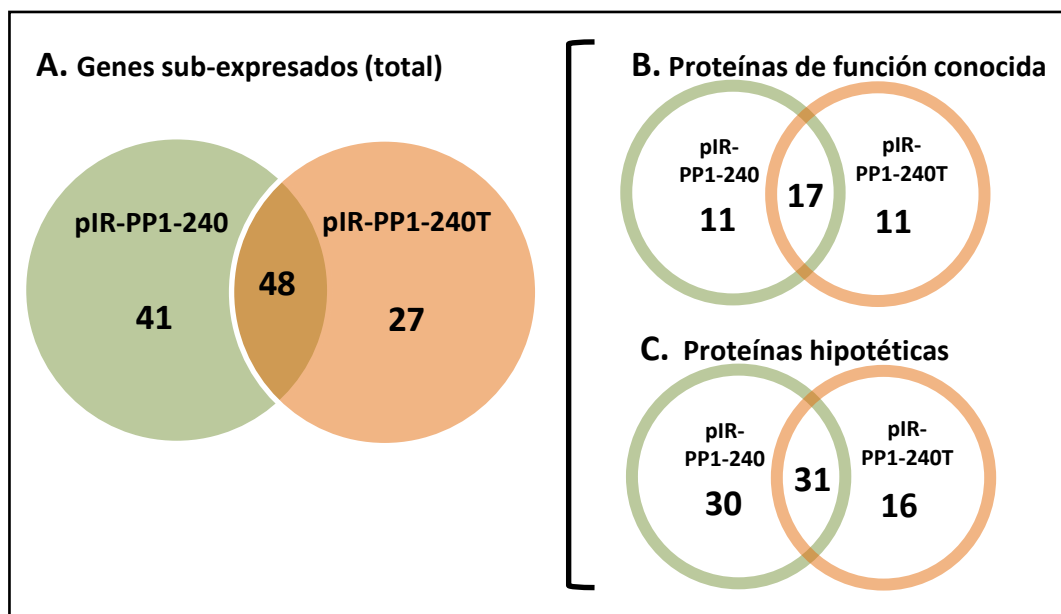


Figura 56. Diagramas de Venn de los perfiles de expresión génica diferencial a día 1 de los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Los genes sub-expresados a día 1 se clasifican como: número total de genes (A), genes codificantes de proteínas de función conocida (B) y genes codificantes de proteínas hipotéticas conservadas y de función desconocida (C).

Los genes comunes sub-expresados identificados en ambos transfectantes a día 1 se representan en la Figura 57. En el esquema se detalla la localización subcelular y los procesos celulares en los que participan.

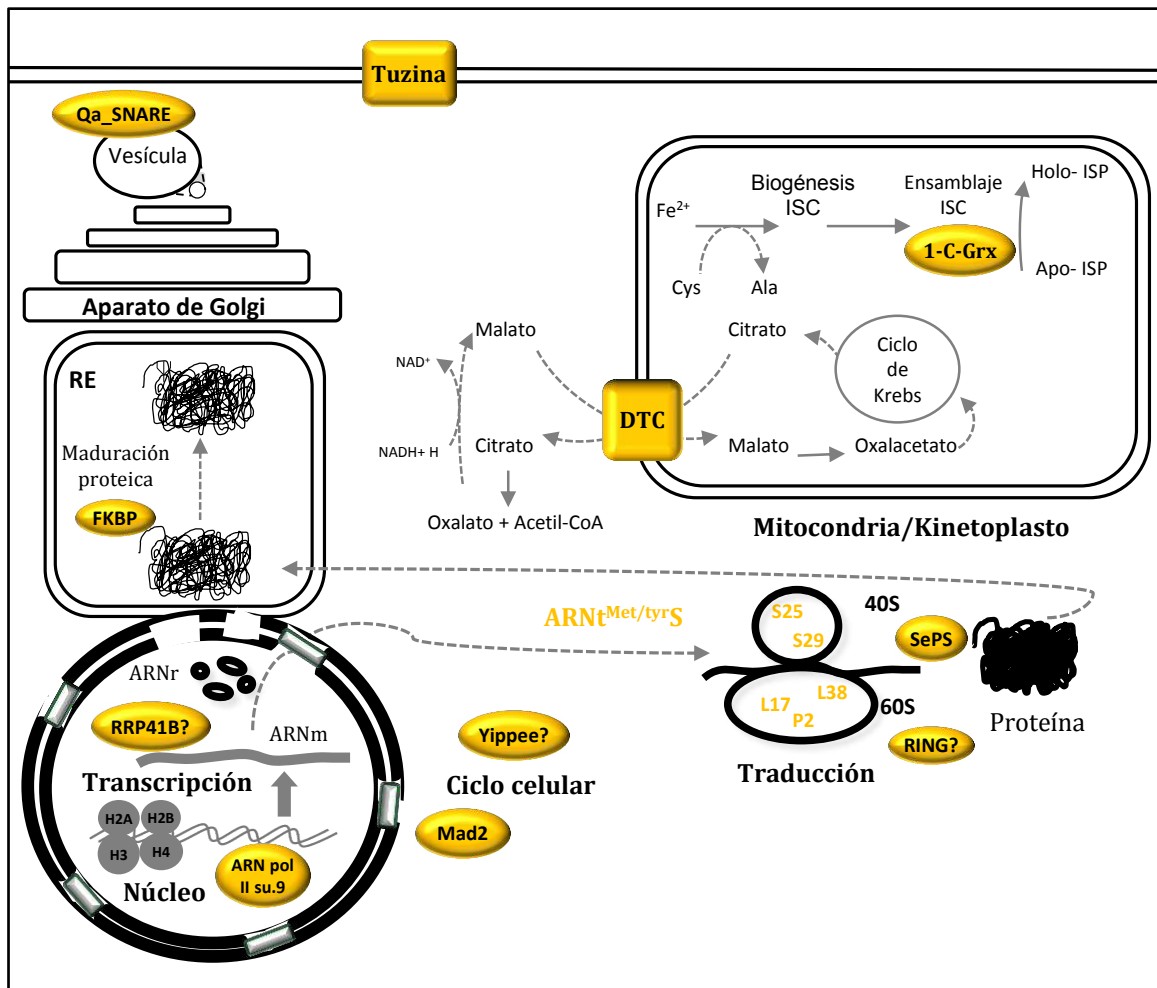


Figura 57. Esquema de los genes comunes sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Se detallan los genes comunes de función conocida observados en el perfil de sub-expresión a día 1 en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T respecto al control pIR. Abreviatura: ISC, centros ferro-sulfurados.

4.5.4.4.- Análisis de expresión génica diferencial en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR.

4.5.4.4.1.- Perfil de expresión génica.

De acuerdo a los análisis de RNA-Seq, se identificaron 279 genes diferencialmente expresados en la línea *knock-in* pIR-PP1C-34 respecto al control pIR (Tabla 32). Los estudios se llevaron a cabo en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico. Del total de genes diferencialmente expresados, el 36,6% (102 genes) codifican proteínas de función conocida mientras que el 63,4% (177 genes) corresponden a proteínas hipotéticas y de función desconocida. Los genes detectados se distribuyen principalmente en los días 1 y 3 de la curva de crecimiento, representando el 47,7% y el 49,1% del total, respectivamente. En el día 3 sólo se han hallado 9 genes diferencialmente expresados, comprendiendo el 3,2% del total. Los genes sub-expresados representan el 85,6% del total de genes diferencialmente expresados. Los genes sub-expresados se hallaron principalmente en los días 1 (41,2%) y 3 (43%) de la curva de crecimiento. De igual

modo ocurre con los genes sobre-expresados, distribuyéndose principalmente entre los días 1 (6,5%) y 3 (6,1%) de manera uniforme.

Tabla 32. Frecuencias absolutas de los genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Se muestra el número de genes diferencialmente expresados (GDE) en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 respecto a pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Los genes se clasifican según la base de datos *TriTrypDB* en: genes de función conocida, y genes codificantes de proteínas hipotéticas conservadas y de función desconocida. La selección de los genes diferencialmente expresados se basa en los criterios: *Fold change* ($F \geq 1,7$ (sobre-expresados) o $\leq -1,7$ (sub-expresados), y valor de significación estadística $\alpha = 0,05$ según el test de la *t* de *Student*. *N* hace referencia al número de genes.

	Día 1		Día 3		Día 5		Total GDE
	sobre- expresados	sub- expresados	sobre- expresados	sub- expresados	sobre- expresados	sub- expresados	
Función conocida (N)	11	36	8	41	4	2	102
Proteínas hipotéticas y función desconocida (N)	7	79	9	79	1	2	177
% GDE	6,5	41,2	6,1	43	1,8	1,4	$N=279$ 100

La Figura 58 representa la distribución de los genes diferencialmente expresados en función de su nivel de expresión a lo largo de los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de los promastigotes axénicos. Como se ha mencionado, estos genes se observan principalmente en los días 1 y 3, con un predominio de la sub-expresión entre los mismos.

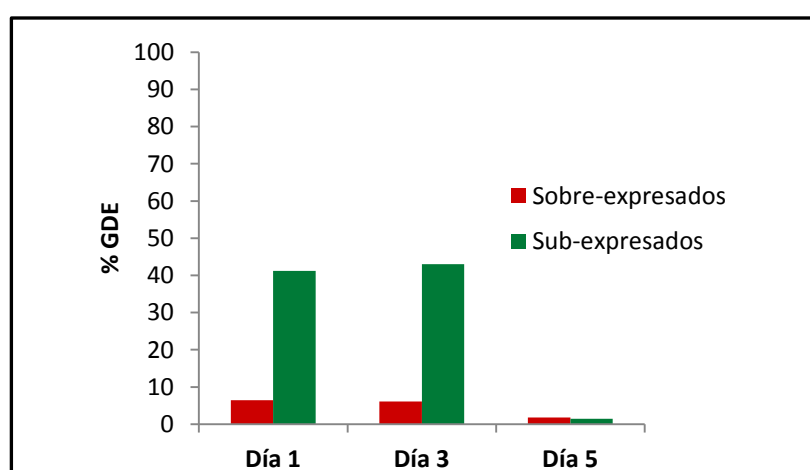


Figura 58. Proporción de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR. El histograma muestra el porcentaje de genes sobre-expresados (rojo) y sub-expresados (verde) en promastigotes axénicos transfectados con pIR-PP1C-34 frente a los transfectados con pIR respecto al total de genes diferencialmente expresados ($N=279$) en el periodo de tiempo analizado (día 1, día 3 y día 5). Los genes diferencialmente expresados se seleccionaron en función del *Fold change* ($F \geq 1,7$ ó $\leq -1,7$) con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$), según el test de la *t* de *Student*.

Resultados

4.5.4.4.2.- Asignación de términos de Gene Ontology.

Mediante el programa informático *BLAST2GO*, se llevó a cabo la anotación de términos de GO en el conjunto de genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34. Los términos de GO asignados fueron agrupados de acuerdo a las ontologías génicas funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares. Este procedimiento, al igual que fue descrito en la sección 4.4.2.2., permite realizar una aproximación preliminar sobre las funciones celulares modificadas en el transfectante pIR-PP1C-34 debido a la sobre-expresión de la proteína PP1C-34.

La Tabla 33 recoge el número de genes diferencialmente expresados con términos GO asociados en el transfectante pIR-PP1C-34. De los 279 genes en estudio, sólo el 43,3% (121 genes) presenta términos de GO. Estos términos han sido anotados principalmente entre los genes sub-expresados a día 1 y 3, dado que constituyen los grupos con mayor proporción de genes diferencialmente expresados.

Tabla 33. Frecuencias de genes diferencialmente expresados con términos de GO anotados en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Se describe el número de genes diferencialmente expresados (*N* GDE) y el número de términos GO asociados (*N* GO) en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 respecto a pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento. Los genes diferencialmente expresados se clasifican como sobre-expresados si $F \geq 1,7$ o sub-expresados si $F \leq -1,7$, con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) según el test de la *t* de *Student*.

Día	Nivel de expresión	<i>N</i> GDE	<i>N</i> GO
Día 1	Sobre-expresados	18	12
	Sub-expresados	115	45
Día 3	Sobre-expresados	17	9
	Sub-expresados	120	49
Día 5	Sobre-expresados	5	4
	Sub-expresados	4	2

A continuación, los términos de GO asignados fueron representados de acuerdo a su frecuencia y nivel de expresión correspondiente asociados a los genes diferencialmente expresados en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento (Figura 59).

A día 1, la fosforilación proteica es el principal proceso biológico sobre-expresado seguido de los procesos metabólicos lipídicos, movimiento asociado a microtúbulos y respuesta celular a estrés. Estos procesos están vinculados con las funciones moleculares: actividad quinasa, unión a ATP y unión a proteínas. Respecto a la ontología componente celular, los genes sub-expresados a día 1 se relacionan con orgánulos como el cuerpo basal flagelar, el complejo macromolecular de dineína y el RE. Entre los principales procesos celulares sub-expresados a día 1 destacan la traducción así como procesos metabólicos de ARN, organización de orgánulos, transporte y regulación de procesos biológicos. El ensamblaje de ribosomas y la unión a proteínas representan las principales funciones moleculares asociadas a dichos procesos. Otras funciones sub-expresadas a día 1 son: actividad hidrolasa, unión a ARN y unión a iones metálicos y actividad transferasa de grupos con fósforo. Entre los compartimentos celulares implicados en dichos procesos destacan fundamentalmente los ribosomas y el núcleo.

En el día 3, se sobre-expresan genes implicados en procesos biológicos y funciones moleculares relacionados con los microtúbulos y la citocinesis, los cuales se vinculan con el componente celular del citoesqueleto. Entre la variedad de procesos biológicos sub-expresados a día 3 figuran la traducción, el plegamiento de proteínas, procesos metabólicos de ARN y regulación celular. Las principales funciones relacionadas con esos procesos son: constitución estructural de ribosomas, unión a nucleótidos y unión a ARN. Además, otras funciones sub-expresadas como la unión a proteínas no plegadas y la actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa están relacionadas con el proceso de plegamiento de proteínas. Diversos componentes celulares como el ribosoma, núcleo, complejo proteico, citoesqueleto, y mitocondria están asociados a los procesos biológicos sub-expresados a día 3.

El único proceso biológico descrito según los términos de GO entre los genes sub-expresados a día 5 es la fosforilación de proteínas. Sin embargo, se han anotado varias funciones moleculares entre las que figuran la unión a fosfolípidos, ATP, ácidos nucleicos, proteínas, iones de zinc así como la actividad serina treonina quinasa.

Resultados

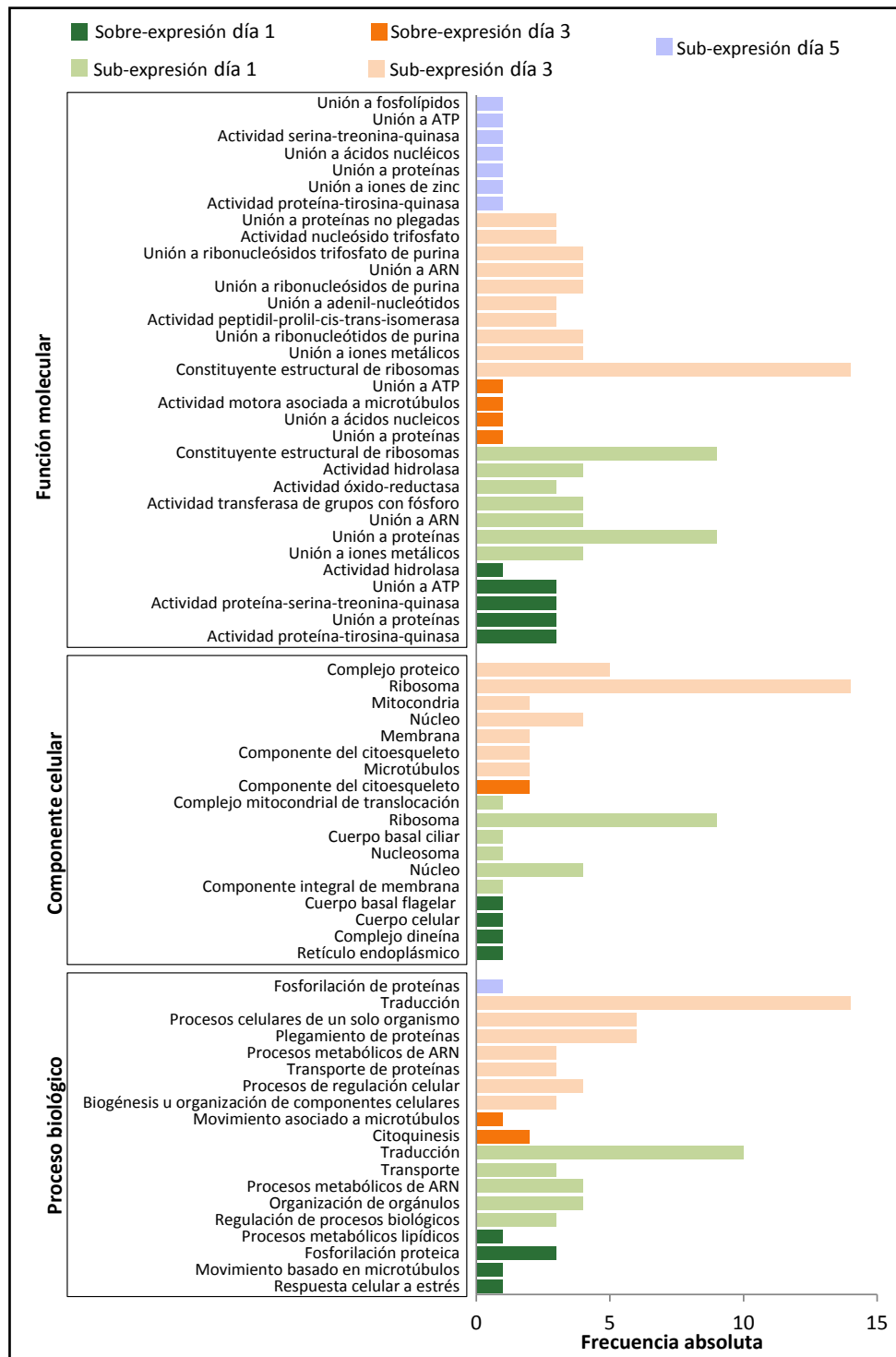


Figura 59. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR según la terminología GO. El histograma muestra las frecuencias absolutas de términos de la nomenclatura controlada GO que se han anotado en los genes diferencialmente expresados en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 respecto a pIR. Los términos GO se han clasificado de acuerdo a las ontologías: proceso biológico, componente celular y función molecular. Se detalla el nivel de expresión génica diferencial como sobre-expresión o sub-expresión en los días 1 y 3 de la curva de crecimiento de promastigotes axénicos. No se representan los términos GO asociados a las PP1 codificadas por el cromosoma 34 ya que su presencia está inducida directamente por el transfectante pIR-PP1C-34 en todos los días de la curva de crecimiento analizados.

4.5.4.4.3.- Análisis de enriquecimiento en términos de Gene Ontology sub-expresados a día 1 y 3.

A partir de los términos de GO anotados en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 y 3, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento (Figura 60). Para ello, al igual que se ha descrito en la sección 4.4.2.3., se estableció como referencia el genoma de *L. infantum* (JPCM5) y se consideraron significativos aquellos términos con un valor de $p < 0,05$ correspondiente al test exacto de Fisher.

Los principales procesos biológicos sub-expresados a día 1 y 3 son la traducción, expresión génica y procesos biosintéticos de macromoléculas (Figura 60). Además, a día 1 están representados procesos celulares relacionados con el empaquetamiento del ADN, así como procesos biosintéticos de la tetrahidrobiopterina. Asimismo, los genes sub-expresados a día 3 están enriquecidos con procesos asociados con el metabolismo de proteínas y ARN pequeño nuclear (ARNsn), biogénesis y ensamblaje de complejos de tubulina, procesos mitóticos del ciclo celular, procesos biosintéticos de cetonas y quinonas, y un proceso relativo a la transmisión vectorial.

En relación a las funciones moleculares (Figura 61), el conjunto de genes sub-expresados a día 1 y 3 está enriquecido con las actividades de constitución estructural de ribosomas, actividad selenofosfato sintetasa y actividad fosfotransferasa. Además, a día 1 destacan funciones como la actividad glutatión reductasa, aminoacil-ARNt hidrolasa, metalo endopeptidasa y 4- α -hidroxitetrahidropterina deshidratasa. Asimismo, una gran variedad de funciones moleculares están sub-expresadas de forma significativa a día 3. Entre ellas, cabe mencionar actividades relacionadas con el plegamiento de proteínas como la actividad peptidil proil *cis-trans* isomerasa, la homodimerización de proteínas y la unión a proteínas no plegadas, así como otras actividades relativas a ácidos nucleicos como la unión a ARNsno y la actividad 5'-3' exorribonucleasa. Otras actividades presentes son la actividad citocromo C oxidasa y la actividad reguladora de ATPasa.

En cuanto a la ontología componente celular (Figura 61), destacan a día 1 y 3 la sub-expresión de genes relacionados con orgánulos intracelulares no delimitados por membranas como los ribosomas y complejos ribonucleoproteicos. Además, a día 1 está representado el complejo mitocondrial tipo II ácido graso sintasa. Asimismo, en el día 3 están diferencialmente representados genes relativos a los componentes citoplasmáticos, la membrana del bolsillo ciliar, complejos ribonucleoproteicos con ARNsno, y ARN no codificante relacionado con los procesos de pseudouridilación en tripanosomátidos.

Resultados

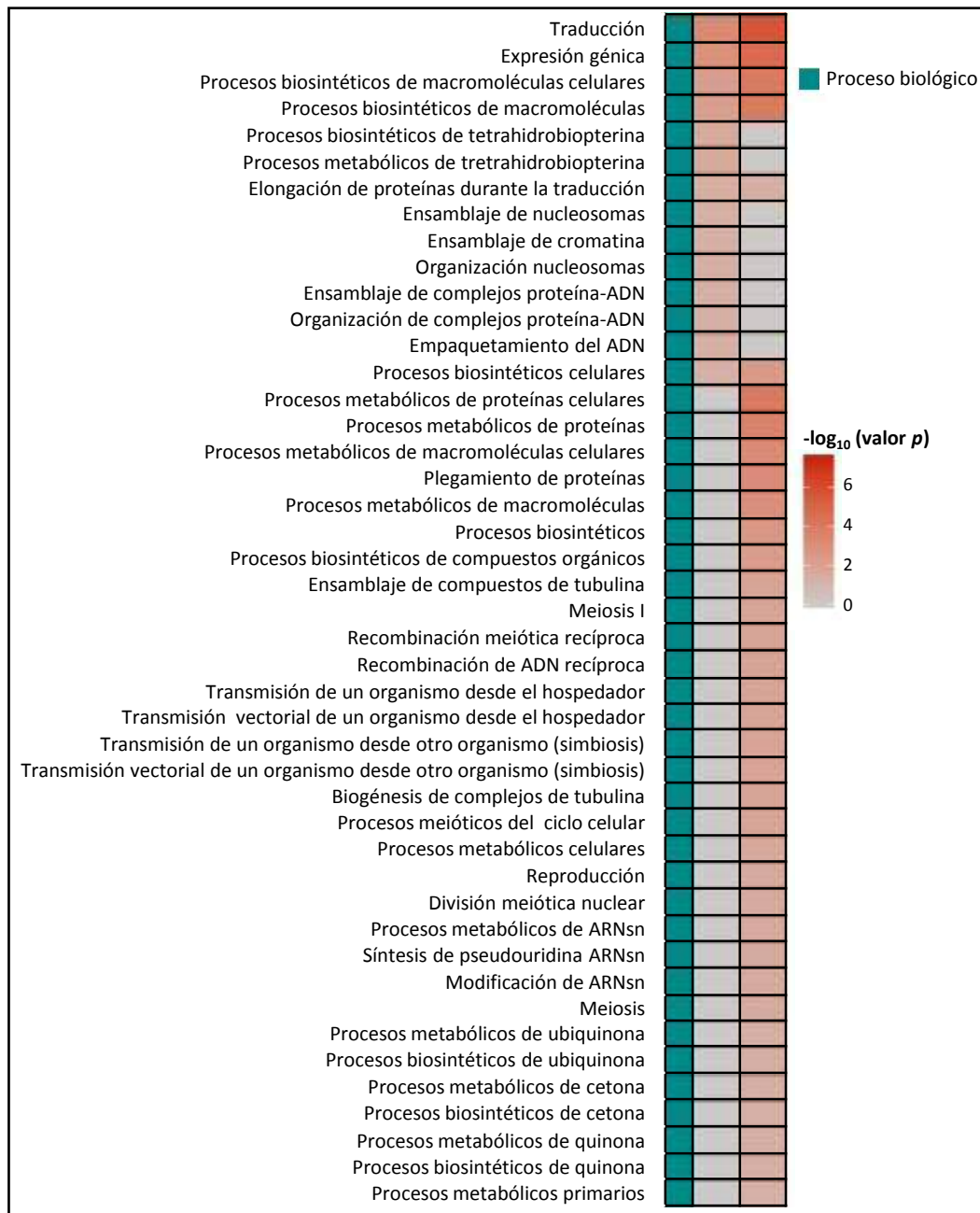


Figura 60. Análisis de enriquecimiento en términos de GO relativos a la categoría de procesos biológicos en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 y día 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR. La gráfica representa la distribución de términos de GO según su significación estadística (valor p) en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 y 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 respecto a pIR. Se considera que el conjunto de datos está enriquecido en un término GO si $p < 0,05$ según el test exacto de Fisher (BLAST2GO). El genoma de *L. infantum* cepa JPCM5 fue empleado como conjunto de referencia. Los identificadores de los términos GO representados se describen en el Anexo XVII.

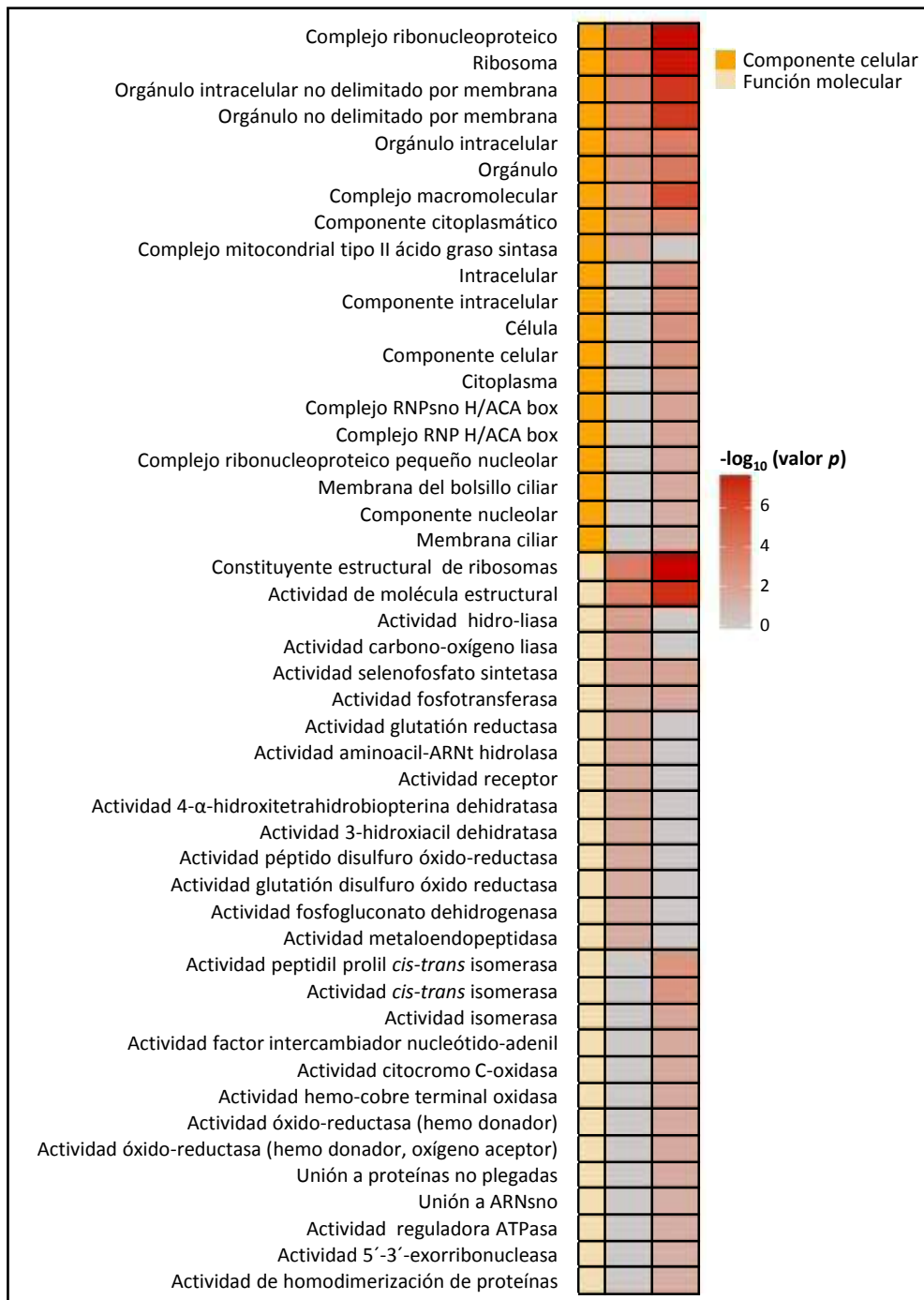


Figura 61. Análisis de enriquecimiento en términos de GO de los genes diferencialmente sub-expresados en los días 1 y 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 vs. pIR. La gráfica muestra la distribución de términos de GO según su significación estadística (valor p) en el conjunto de genes sub-expresados a día 1 y 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 respecto a pIR. Se considera que el conjunto de datos está enriquecido en un término GO si $p < 0,05$ según el test exacto de Fisher (*BLAST2GO*). Los términos de GO se agrupan en las ontologías: componente celular y función molecular. El genoma de *L. infantum* cepa JPCM5 fue empleado como conjunto de referencia. Los identificadores de los términos GO representados son descritos en el Anexo XVIII.

Resultados

4.5.4.4.4.- Genes diferencialmente expresados en pIR-PP1C-34.

Los genes diferencialmente expresados en promastigotes axénicos transfectados con pIR-PP1C-34 respecto al control pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento se recogen en las siguientes tablas (Tablas 34-39). Estos genes están agrupados de acuerdo a su nivel de expresión como sobre-expresados (Tablas 34, 36 y 38) o sub-expresados (Tablas 35, 37 y 39). En las tablas se detalla el nivel de expresión génica como tasa de variación (F) y $\log_2 F$, así como el valor p según el test de la t de Student.

Tabla 34. Genes sobre-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); $\log_2 F$ y p , valor p del test de la t de Student con nivel de significación $\alpha = 0,05$. Se destaca en negrita y cursiva el *cluster* de genes codificantes de las PP1 en estudio asociadas al cromosoma 34.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.05.0130	Proteína quinasa, putativa	1,75	0,81	0,025
LinJ.10.1460	Ácido graso desaturasa, putativa	1,74	0,80	0,004
LinJ.14.1130	Dineína, cadena pesada, putativa	1,72	0,78	0,013
LinJ.19.0170	Proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), putativa	1,83	0,87	0,001
LinJ.19.0240	Proteína hipotética conservada	1,78	0,83	0,000
LinJ.20.1080	Proteína hipotética de función desconocida	1,70	0,77	0,005
LinJ.21.0850	Proteína hipotética conservada	1,88	0,91	0,001
LinJ.22.0670	Proteína A2	1,72	0,78	0,007
LinJ.27.0140	Proteína hipotética conservada	1,70	0,77	0,004
LinJ.27.1260	Proteína hipotética de función desconocida	1,79	0,84	0,003
LinJ.30.0040	Proteína hipotética conservada	1,72	0,78	0,007
LinJ.31.2260	Proteína hipotética	1,79	0,84	0,008
LinJ.32.0820	Proteína quinasa putativa	1,73	0,79	0,001
LinJ.34.0820	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa</i>	16,88	4,08	0,000
LinJ.34.0830	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1), putativa</i>	12,13	3,60	0,000
LinJ.34.0840	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1), putativa</i>	95,27	6,57	0,000
LinJ.34.0850	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1), putativa</i>	72,16	6,17	0,000
LinJ.34.2370	Proteína putativa con dominio C2	1,81	0,85	0,000

Tabla 35. Genes sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); $\log_2 F$ y p , valor p del test de la t de Student con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.01.0040	Proteína hipotética de función desconocida	-1,91	-0,93	0,004
LinJ.01.0060	Proteína hipotética conservada	-1,97	-0,98	0,021
LinJ.01.0110	Glutarredoxina monotiol, putativa	-2,14	-1,10	0,001
LinJ.01.0190	Proteína hipotética conservada	-2,31	-1,21	0,016
LinJ.01.0590	proteína transportadora de tricarboxilatos	-1,97	-0,98	0,003

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.01.0780	Proteína hipotética conservada	-2,39	-1,26	0,036
LinJ.02.0240	Proteína hipotética conservada	-2,04	-1,03	0,003
LinJ.02.0290	Proteína de procesamiento de ARNr, putativa	-2,08	-1,05	0,006
LinJ.03.0240	Proteína ribosomal L38, putativa	-2,01	-1,00	0,027
LinJ.03.0560	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,004
LinJ.03.0580	Arginina N-metiltransferasa, putativa	-1,90	-0,92	0,001
LinJ.03.0690	Proteína hipotética conservada	-1,90	-0,92	0,000
LinJ.04.0250	Proteína hipotética conservada	-1,96	-0,97	0,008
LinJ.04.0860	Proteína hipotética conservada	-1,95	-0,97	0,012
LinJ.05.0860	Proteína hipotética conservada	-2,47	-1,30	0,025
LinJ.06.0230	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,87	0,008
LinJ.06.0410	Proteína ribosómica 60S L19, putativa	-2,94	-1,56	0,033
LinJ.06.0430	Proteína ribosómica 60S L19, putativa	-2,71	-1,44	0,031
LinJ.06.0940	Proteína hipotética conservada	-1,90	-0,93	0,050
LinJ.06.1030	Proteína hipotética de función desconocida	-2,06	-1,04	0,012
LinJ.06.1060	Proteína hipotética conservada	-2,05	-1,04	0,001
LinJ.07.0180	3 hidroxil-acil-ACP deshidratasa	-1,89	-0,92	0,045
LinJ.07.0450	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,91	0,000
LinJ.07.1130	Proteína de unión a ARN, putativa	-1,82	-0,86	0,004
LinJ.08.0260	Proteína hipotética conservada	-2,07	-1,05	0,011
LinJ.08.0750	Tuzina, putativa	-1,98	-0,98	0,000
LinJ.08.0930	Proteína hipotética conservada	-1,77	-0,83	0,046
LinJ.08.1190	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,030
LinJ.09.0540	Proteína hipotética conservada	-1,79	-0,84	0,040
LinJ.09.0910	Proteína hipotética conservada	-2,10	-1,07	0,017
LinJ.09.1210	Proteína hipotética conservada	-1,96	-0,97	0,011
LinJ.09.1371	Proteína hipotética	-1,85	-0,89	0,036
LinJ.10.0090	Proteína hipotética conservada con repeticiones tipo WD	-1,83	-0,87	0,036
LinJ.10.0270	Proteína hipotética conservada	-1,74	-0,80	0,010
LinJ.10.0660	Endonucleasa G, putativa	-1,92	-0,94	0,015
LinJ.10.0840	Proteína hipotética conservada	-1,90	-0,93	0,010
LinJ.10.0940	FKBP peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa, putativa	-1,87	-0,90	0,001
LinJ.11.0300	Proteína hipotética conservada	-2,02	-1,02	0,018
LinJ.12.0370	Proteína hipotética conservada	-1,74	-0,80	0,036
LinJ.13.0140	Proteína hipotética conservada	-2,12	-1,08	0,000
LinJ.13.0710	Proteína hipotética conservada	-2,05	-1,04	0,035
LinJ.14.1480	Proteína hipotética conservada	-2,35	-1,23	0,028
LinJ.15.1190	Proteína ribosomal ácida 60S P2	-2,99	-1,58	0,041
LinJ.15.1200	Proteína ribosomal ácida 60S P2	-2,75	-1,46	0,012
LinJ.16.0170	Proteína ribosómica 50S L17, putativa	-2,18	-1,13	0,004
LinJ.16.0300	Subunidad 9 no ATP-asa del proteosoma 26S	-1,74	-0,80	0,004
LinJ.16.0600	Histona H3, putativa	-2,35	-1,23	0,012
LinJ.16.1170	Proteína de tipo tirosil/metionil ARNt sintetasa	-1,88	-0,91	0,012
LinJ.17.0510	Proteína hipotética conservada	-1,78	-0,83	0,047
LinJ.17.1440	Proteína hipotética conservada	-2,17	-1,12	0,008
LinJ.18.0310	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,039
LinJ.18.1370	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,031

Resultados

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.19.0440	Proteína de ensamblaje de nucleosomas, putativa	-1,78	-0,83	0,001
LinJ.19.0490	Proteína hipotética conservada	-1,73	-0,79	0,005
LinJ.19.1210	Proteína hipotética conservada	-1,91	-0,93	0,003
LinJ.20.0210	Proteína hipotética de función desconocida	-2,17	-1,12	0,006
LinJ.20.1490	Proteína hipotética conservada	-2,24	-1,16	0,000
LinJ.21.0140	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,042
LinJ.21.0400	Subunidad alfa peptidasa procesamiento mitocondrial	-1,74	-0,80	0,000
LinJ.21.0600	Proteína de unión a ARN Ia, putativa	-1,79	-0,84	0,000
LinJ.21.1260	Dineína, cadena ligera, putativa	-1,75	-0,81	0,005
LinJ.21.1570	Proteína hipotética conservada	-1,85	-0,88	0,000
LinJ.22.0230	Proteína hipotética de función desconocida	-1,98	-0,99	0,001
LinJ.22.0410	Peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa PAR45, putativa	-1,77	-0,83	0,011
LinJ.22.0900	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,015
LinJ.24.0960	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,025
LinJ.24.1170	Proteína hipotética conservada	-2,15	-1,11	0,001
LinJ.24.1680	Proteína RING-box, putativa	-2,01	-1,01	0,012
LinJ.24.2130	Proteína hipotética	-1,77	-0,83	0,002
LinJ.25.0240	Proteína hipotética conservada	-2,03	-1,02	0,047
LinJ.25.0920	Proteína hipotética conservada	-1,78	-0,83	0,002
LinJ.25.1220	Proteína ribosómica S25	-3,40	-1,77	0,031
LinJ.25.1720	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,87	0,001
LinJ.25.1740	Componente regulador del huso mitótico rev7, putativa	-2,20	-1,14	0,002
LinJ.26.0110	proteína hipotética conservada	-1,78	-0,83	0,041
LinJ.26.1310	proteína hipotética conservada	-1,71	-0,77	0,012
LinJ.26.2150	proteína hipotética conservada	-2,21	-1,14	0,005
LinJ.27.0070	proteína hipotética conservada	-2,11	-1,08	0,046
LinJ.27.1450	Proteína de tipo ARN polimerasa II dirigida por ADN	-2,15	-1,11	0,013
LinJ.27.1490	proteína hipotética conservada	-1,96	-0,97	0,016
LinJ.28.0120	Subunidad 9 de la ARN polimerasa II dirigida por ADN, putativa	-2,17	-1,12	0,022
LinJ.28.0510	Proteína hipotética de función desconocida	-2,03	-1,02	0,003
LinJ.28.1930	Subunidad 1 del complejo de unión a ARN mitocondrial, putativa	-1,80	-0,85	0,006
LinJ.28.2360	Proteína ribosómica S29, putativa	-2,07	-1,05	0,008
LinJ.29.0370	Proteína hipotética conservada	-2,21	-1,14	0,035
LinJ.29.0410	Proteína hipotética conservada	-2,11	-1,08	0,007
LinJ.29.1380	Proteína hipotética conservada	-2,52	-1,34	0,048
LinJ.30.0170	2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa, putativa	-1,78	-0,83	0,001
LinJ.30.0430	Proteína hipotética conservada	-1,92	-0,94	0,004
LinJ.30.1610	Proteína hipotética conservada	-1,73	-0,79	0,032
LinJ.30.1690	Proteína hipotética conservada	-1,88	-0,91	0,006
LinJ.30.2640	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,017
LinJ.30.3520	Proteína de unión a Zinc (Yippee), putativa	-2,05	-1,04	0,014
LinJ.30.3730	Proteína hipotética conservada	-1,76	-0,81	0,037
LinJ.31.0110	O-sialoglicoproteína endopeptidasa, putativa, metalo peptidasa, Clan MK, Familia M67	-1,77	-0,82	0,021
LinJ.31.2940	Proteína hipotética conservada	-1,93	-0,95	0,002
LinJ.32.1880	Proteína hipotética conservada	-1,81	-0,85	0,023
LinJ.32.3330	Proteína ribosómica L3, putativa	-1,72	-0,79	0,042

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.32.3530	Proteína hipotética conservada	-1,82	-0,86	0,031
LinJ.32.3760	Proteína hipotética conservada	-2,44	-1,29	0,005
LinJ.33.0930	Proteína hipotética conservada	-1,73	-0,79	0,007
LinJ.33.1100	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,78	0,013
LinJ.33.1340	Proteína hipotética conservada	-2,08	-1,06	0,040
LinJ.33.3340	Ribonucleoproteína pequeña nuclear SmD2	-2,58	-1,37	0,046
LinJ.34.0410	Proteína hipotética de función desconocida	-2,06	-1,05	0,006
LinJ.34.1240	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,043
LinJ.34.3850	Proteína hipotética conservada	-1,89	-0,92	0,024
LinJ.34.3930	Proteína hipotética conservada	-1,71	-0,78	0,002
LinJ.35.1410	Proteína hipotética conservada	-1,81	-0,86	0,019
LinJ.35.2160	Proteína hipotética de función desconocida	-2,00	-1,00	0,020
LinJ.35.4680	Proteína hipotética conservada	-1,70	-0,77	0,044
LinJ.36.1660	Proteína hipotética conservada	-1,74	-0,80	0,006
LinJ.36.2650	Proteína hipotética conservada	-1,83	-0,88	0,047
LinJ.36.3540	Proteína hipotética conservada	-1,79	-0,84	0,007
LinJ.36.5650	Selenofosfato sintetasa, putativa	-1,80	-0,85	0,029

Tabla 36. Genes sobre-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$. Se destaca en negrita y cursiva el *cluster* de genes codificantes de las PP1 en estudio asociadas al cromosoma 34.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.08.0180	Proteína hipotética de función desconocida	1,76	0,81	0,008
LinJ.12.0450	Proteína hipotética de función desconocida	1,92	0,94	0,040
LinJ.14.1190	Quinesina K39, putativa	2,06	1,04	0,018
LinJ.14.1600	Quinesina K39, putativa	2,25	1,17	0,007
LinJ.15.1660	Proteína hipotética	2,83	1,50	0,049
LinJ.19.1680	Proteína hipotética	3,29	1,72	0,022
LinJ.22.1160	Proteína hipotética de función desconocida	1,74	0,80	0,010
LinJ.22.1570	Proteína hipotética	2,16	1,11	0,041
LinJ.24.0280	Proteína hipotética conservada	1,84	0,88	0,011
LinJ.33.1540	Proteína hipotética conservada	2,04	1,03	0,015
LinJ.34.0710	Proteína de la zona de anclaje flagelar	1,85	0,89	0,005
LinJ.34.0720	Proteína de la zona de anclaje flagelar	1,86	0,89	0,012
LinJ.34.0820	Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa	5,35	2,42	0,000
LinJ.34.0830	Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa	3,80	1,93	0,000
LinJ.34.0840	Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa	24,62	4,62	0,000
LinJ.34.0850	Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa	13,60	3,77	0,000
LinJ.35.2480	Proteína hipotética conservada	1,72	0,78	0,009

Resultados

Tabla 37. Genes sub-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); $\log_2 F$ y *p*, valor *p* del test de la *t* de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	<i>p</i>
LinJ.01.0190	Proteína hipotética conservada	-1,98	-0,99	0,048
LinJ.01.0300	Proteína hipotética conservada	-4,87	-2,28	0,019
LinJ.01.0430	Proteína ribosómica S7, putativa	-3,20	-1,68	0,042
LinJ.03.0020	Proteína hipotética conservada	-3,10	-1,63	0,042
LinJ.03.0940	Proteína hipotética conservada	-5,32	-2,41	0,019
LinJ.04.0090	Proteína hipotética conservada	-3,29	-1,72	0,048
LinJ.04.0630	Proteína hipotética conservada	-3,73	-1,90	0,042
LinJ.04.1070	Proteína hipotética conservada	-4,96	-2,31	0,020
LinJ.05.0020	Proteína hipotética conservada	-3,54	-1,82	0,046
LinJ.05.0450	Proteína hipotética conservada	-4,22	-2,08	0,032
LinJ.05.0860	Proteína hipotética conservada	-2,23	-1,15	0,047
LinJ.05.1190	Subunidad de <i>prefoldin</i> , putativa	-4,05	-2,02	0,029
LinJ.06.0150	Proteína hipotética conservada	-4,14	-2,05	0,031
LinJ.06.0710	Proteína hipotética conservada	-1,72	-0,79	0,040
LinJ.06.1240	Proteína hipotética conservada	-4,42	-2,15	0,023
LinJ.07.0520	Proteína hipotética conservada	-3,38	-1,76	0,049
LinJ.08.0930	Proteína hipotética conservada	-1,79	-0,84	0,044
LinJ.09.1210	Proteína hipotética conservada	-1,86	-0,89	0,020
LinJ.09.1540	Proteína hipotética conservada	-2,49	-1,31	0,049
LinJ.10.0660	Endonucleasa G, putativa	-1,88	-0,91	0,018
LinJ.11.0800	Proteína hipotética conservada	-5,22	-2,38	0,021
LinJ.12.0005	Proteína hipotética conservada	-4,37	-2,13	0,031
LinJ.12.0370	Proteína hipotética conservada	-1,77	-0,83	0,029
LinJ.13.0270	Proteína hipotética conservada	-5,53	-2,47	0,040
LinJ.13.0430	Proteína hipotética conservada	-1,77	-0,83	0,048
LinJ.13.0880	Proteína hipotética conservada	-1,87	-0,90	0,040
LinJ.13.1410	Proteína ribosómica 60S L44, putativa	-10,36	-3,37	0,015
LinJ.14.0880	Proteína hipotética conservada	-1,89	-0,92	0,045
LinJ.16.0170	Proteína ribosómica 50S L17, putativa	-1,74	-0,80	0,043
LinJ.16.0230	Proteína hipotética de función desconocida	-2,71	-1,44	0,038
LinJ.16.0640	Proteína hipotética conservada	-1,84	-0,88	0,011
LinJ.16.0950	Dineína, cadena ligera, putativa	-7,25	-2,86	0,009
LinJ.16.1160	Proteína hipotética conservada	-3,43	-1,78	0,046
LinJ.18.0030	Proteína hipotética conservada	-3,01	-1,59	0,045
LinJ.18.1540	Proteína hipotética de función desconocida	-2,08	-1,06	0,036
LinJ.21.0030	Proteína hipotética conservada	-3,31	-1,73	0,038
LinJ.21.0810	Proteína hipotética conservada	-6,15	-2,62	0,019
LinJ.21.2080	Subunidad VI de la citocromo c oxidasa (COX6), putativa	-7,99	-3,00	0,010
LinJ.21.2090	Proteína ribosómica 60S L32 (RPL32)	-3,96	-1,98	0,044
LinJ.22.0580	Proteína hipotética conservada	-2,42	-1,27	0,048
LinJ.22.1370	Proteína ribosómica 60S L14, putativa	-6,57	-2,72	0,030
LinJ.22.1410	Proteína ribosómica 60S L14, putativa	-6,46	-2,69	0,027

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.22.1490	Proteína hipotética conservada	-5,31	-2,41	0,015
LinJ.23.0680	Proteína hipotética	-3,48	-1,80	0,040
LinJ.23.1390	Proteína hipotética conservada	-4,11	-2,04	0,046
LinJ.23.1870	Proteína hipotética conservada	-2,56	-1,36	0,040
LinJ.24.1210	Proteína hipotética conservada	-1,86	-0,90	0,040
LinJ.24.1230	Proteína hipotética conservada	-1,84	-0,88	0,050
LinJ.24.1350	Ciclofilina 8 (CYP8), putativa	-4,87	-2,28	0,017
LinJ.24.1370	Proteína hipotética conservada	-4,48	-2,16	0,027
LinJ.24.2420	Proteína hipotética conservada	-3,60	-1,85	0,044
LinJ.25.2270	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,049
LinJ.26.0990	Proteína hipotética	-5,40	-2,43	0,035
LinJ.26.2290	Nitrilasa, putativa	-4,03	-2,01	0,029
LinJ.26.2490	Proteína hipotética conservada	-4,47	-2,16	0,025
LinJ.27.0110	Proteína hipotética conservada	-4,22	-2,08	0,024
LinJ.27.0160	Proteína hipotética conservada	-1,81	-0,86	0,041
LinJ.27.1960	Proteína hipotética conservada	-1,98	-0,99	0,021
LinJ.27.2330	Proteína hipotética de función desconocida	-2,99	-1,58	0,043
LinJ.27.2430	Proteína hipotética conservada con repeticiones WD	-1,89	-0,92	0,014
LinJ.28.0820	Proteína hipotética conservada	-3,42	-1,77	0,032
LinJ.29.0950	Factor 3 de ADP ribosilación	-4,15	-2,05	0,034
LinJ.29.1650	Proteína hipotética conservada	-2,59	-1,37	0,027
LinJ.29.2460	Proteína hipotética conservada	-2,96	-1,56	0,046
LinJ.29.2480	Proteína ribosómica 60S L39, putativa	-5,88	-2,56	0,033
LinJ.30.0510	Proteína hipotética	-3,24	-1,70	0,047
LinJ.30.0690	Proteína ribosómica 40S S30, putativa	-3,98	-1,99	0,047
LinJ.30.0710	Proteína ribosómica 40S S30, putativa	-4,01	-2,00	0,041
LinJ.30.0770	Co-chaperona, proteína GrpE de choque térmico	-3,05	-1,61	0,047
LinJ.30.0780	Proteína hipotética conservada	-3,10	-1,63	0,042
LinJ.30.1690	Proteína hipotética conservada	-1,75	-0,81	0,014
LinJ.30.1970	Proteína hipotética conservada	-2,37	-1,24	0,040
LinJ.30.3620	Proteína tipo mago nashi, putativa	-4,11	-2,04	0,024
LinJ.30.3780	Proteína ribosomal ácida 60S P2, putativa	-7,16	-2,84	0,013
LinJ.30.3790	Proteína ribosomal ácida 60S P2, putativa	-5,51	-2,46	0,019
LinJ.31.0130	Proteína hipotética conservada	-5,33	-2,41	0,020
LinJ.31.0210	Proteína hipotética conservada con repeticiones WD	-1,75	-0,81	0,020
LinJ.31.1620	Proteína hipotética conservada	-3,24	-1,70	0,039
LinJ.31.2830	Proteína hipotética conservada	-1,88	-0,91	0,048
LinJ.31.3280	Proteína asociada a dineína, putativa	-3,45	-1,79	0,045
LinJ.32.0520	Rab 4, putativa	-3,62	-1,86	0,032
LinJ.32.0780	Proteína hipotética conservada	-2,06	-1,04	0,036
LinJ.32.2050	Proteína de tipo choque térmico, putativa	-2,03	-1,02	0,044
LinJ.32.3130	Proteína de tipo cofactor A de unión a tubulina	-4,06	-2,02	0,020
LinJ.32.3140	Proteína tipo de unión a ATP	-4,71	-2,24	0,023
LinJ.32.3150	Proteína hipotética conservada	-3,64	-1,86	0,036
LinJ.32.3660	Proteína 2 asociada a exosomas, putativa	-1,94	-0,96	0,045
LinJ.33.0020	Proteína hipotética conservada	-4,48	-2,16	0,023
LinJ.33.0330	Proteína de tipo β -galactofuranosiltransferasa	-1,80	-0,85	0,044

Resultados

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.33.0640	Proteína hipotética conservada	-4,19	-2,07	0,021
LinJ.33.0660	Proteína hipotética conservada	-4,03	-2,01	0,031
LinJ.33.1730	Ciclofilina 4 (CYP4), putativa	-2,78	-1,47	0,028
LinJ.33.1840	Proteína de tipo factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF1)	-5,44	-2,44	0,021
LinJ.33.1990	Proteína hipotética conservada	-2,09	-1,07	0,008
LinJ.33.2850	Proteína hipotética conservada	-2,37	-1,25	0,050
LinJ.33.2860	Proteína de la familia β-cetoacil-ACP sintasa, putativa	-1,73	-0,79	0,008
LinJ.33.3340	Ribonucleoproteína pequeña nuclear SmD2	-2,62	-1,39	0,043
LinJ.34.0410	Proteína hipotética de función desconocida	-1,85	-0,88	0,020
LinJ.34.2750	Proteína hipotética conservada	-5,47	-2,45	0,016
LinJ.34.4050	Proteína hipotética conservada	-2,70	-1,43	0,037
LinJ.34.4120	Proteína nucleolar de la familia A	-2,87	-1,52	0,045
LinJ.34.4170	Autoantígeno nuclear 1 del síndrome de Sjogren, putativa	-3,22	-1,69	0,037
LinJ.35.0630	Proteína hipotética conservada	-1,85	-0,89	0,011
LinJ.35.3930	Proteína de tipo calmodulina	-3,80	-1,92	0,037
LinJ.35.4440	Proteína hipotética conservada	-3,45	-1,79	0,031
LinJ.35.4950	RAD51, proteína DMC1	-1,74	-0,80	0,002
LinJ.36.0580	Proteína hipotética conservada	-5,75	-2,52	0,015
LinJ.36.0590	Proteína de tipo ubiquitina, putativa	-4,20	-2,07	0,027
LinJ.36.0990	Proteína ribosómica 40S S18, putativa	-3,67	-1,88	0,047
LinJ.36.1130	Proteína ribosómica L24, putativa	-4,34	-2,12	0,042
LinJ.36.3420	Proteína hipotética conservada	-3,84	-1,94	0,033
LinJ.36.3800	Proteína hipotética conservada	-5,23	-2,39	0,022
LinJ.36.3850	Proteína hipotética conservada	-3,67	-1,88	0,036
LinJ.36.3940	Proteína ribosómica 40S S27-1, putativa	-3,89	-1,96	0,040
LinJ.36.5460	Proteína hipotética conservada	-2,13	-1,09	0,013
LinJ.36.5650	Selenofosfato sintetasa, putativa	-1,79	-0,84	0,030
LinJ.36.6040	Proteína con repeticiones ricas en leucina, putativa	-1,94	-0,96	0,016
LinJ.36.6610	Proteína hipotética conservada	-5,88	-2,56	0,017
LinJ.36.6620	Proteína hipotética conservada	-3,42	-1,77	0,041
LinJ.36.7270	Proteína hipotética conservada	-5,09	-2,35	0,021

Tabla 38. Genes sobre-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); log₂ F y p, valor p del test de la t de *Student* con nivel de significación α = 0,05. Se destaca en negrita y en cursiva el *cluster* de genes codificantes de las PP1 en estudio asociadas al cromosoma 34.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	p
LinJ.02.0720	Proteína hipotética	2,31	1,21	0,012
LinJ.34.0820	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa</i>	3,45	1,79	0,000
LinJ.34.0830	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa</i>	2,71	1,44	0,000
LinJ.34.0840	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa</i>	14,80	3,89	0,000
LinJ.34.0850	<i>Serina-treonina-proteína fosfatasa (PP1) putativa</i>	8,35	3,06	0,000

Tabla 39. Genes sub-expresados a día 5 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR. Los datos que se describen de cada gen son: anotación (identificadores de la base de datos *TriTrypDB*); función génica anotada; *Fold change* (F); \log_2 F y *p*, valor *p* del test de la *t* de *Student* con nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Anotación	Función génica anotada	F	Log ₂ F	<i>p</i>
LinJ.29.1210	Proteína hipotética conservada	-1,74	-0,80	0,02
LinJ.32.1900	Proteína quinasa, putativa	-1,85	-0,89	0,00
LinJ.33.3140	Proteína hipotética conservada	-1,70	-0,77	0,01
LinJ.36.1710	Proteína 2 con dedos de Zinc (poli-Zinc)	-1,73	-0,79	0,02

Dichas tablas evidencian los numerosos genes afectados por la sobre-expresión de PP1C-34 en los promastigotes axénicos transfectados con pIR-PP1C-34. En la Tabla 40 se recoge el nivel de expresión de PP1C-34 como sumatorio de los valores de F asignados a las cuatro PP1 codificadas por el cromosoma 34 en el transfectante pIR-PP1C-34. No ha sido posible determinar el nivel preciso de expresión de PP1C-34 puesto que su secuencia está integrada en el núcleo catalítico de las 4 fosfatasa en estudio. En términos generales, los resultados de RNA-Seq permiten confirmar la sobre-expresión de PP1C-34 en todos los días de la curva analizados. Sin embargo, el nivel de expresión de PP1C-34 desciende con el transcurso del tiempo. Cabe destacar que a pesar de que la tasa de variación de PP1C-34 es aproximadamente 4 veces superior a día 1 (F= 196,45) respecto a día 3 (F=47,3), la proporción de genes diferencialmente expresados es similar en ambos tiempos. Los principales grupos de genes están constituidos por los genes sub-expresados a día 1 y día 3.

Tabla 40. Tasa de variación (*Fold change*) del *cluster* PP1C-34 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento.

	<i>Fold change</i>		
	Día 1	Día 3	Día 5
LinJ.34.0820	16,88	5,35	3,45
LinJ.34.0830	12,13	3,80	2,71
LinJ.34.0840	95,27	24,62	14,80
LinJ.34.0850	72,16	13,60	8,35
PP1C-34 (Σ)	196,45	47,37	29,31

La presentación gráfica de los conjuntos de genes sub-expresados a día 1 y día 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 refleja notables diferencias en los perfiles de expresión génica (Figura 62). Únicamente se detectaron 11 genes comunes de los 224 genes sub-expresados en los días 1 y 3. Además, de los 11 genes sólo cuatro representan genes de función conocida entre los que figuran: endoG, L17, SePS y gen precursor de una ribonucleoproteína denominada SmD2.

Resultados

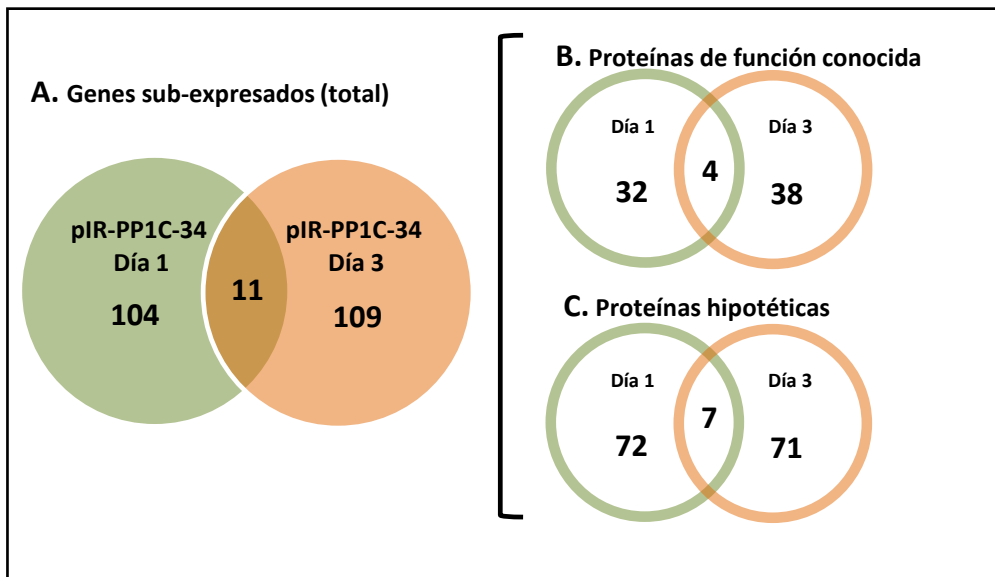


Figura 62. Diagramas de Venn de los perfiles de expresión génica diferencial a día 1 y día 3 del transfectante pIR-PP1C-34 vs pIR. Los genes sub-expresados a día 1 y día 3 se clasifican como: número total de genes (A), genes codificantes de proteínas de función conocida (B) y genes codificantes de proteínas hipotéticas conservadas y función desconocida (C).

El conjunto de genes diferencialmente expresados debido a la sobre-expresión de PP1C-34 pueden ser clasificados en los siguientes procesos celulares de acuerdo a la información recogida en la base de datos *TriTrypDB*, los términos de GO y dominios proteicos conservados.

Expresión génica.

Una gran variedad de genes relacionados con la regulación de la expresión génica están sub-expresados en el transfectante pIR-PP1C-34 en los días 1 y 3 de la curva de crecimiento de promastigotes axénicos. Entre los genes sub-expresados a día 1 figuran el gen de la histona H3, previamente observado en el transfectante pIR-PP1-240, y el gen codificante de una arginina N-metil transferasa (PRMT) (EC 2.1.1). Las PRMT catalizan la transferencia de grupos metilo a residuos de arginina de histonas y otras proteínas, desempeñando un papel importante en el control de la transcripción, *splicing*, reparación de ADN y señalización celular. Tres genes sub-expresados en el transfectante pIR-PP1-240T (sección 4.4.3.4) también lo están a día 1 en la línea pIR-PP1C-34. Estos genes codifican para la proteína de ensamblaje de nucleosomas (NAP) y dos proteínas de unión a ARN (ARNbp y LaARNbp). Además, se encuentran sub-expresados en pIR-PP1C-34 dos genes codificantes de proteínas tipo ARNpol II relativas al inicio de la transcripción, así como los genes precursores de las proteínas mitocondriales endonucleasa G y la subunidad 1 del complejo multiproteico de unión al ARNg. Dichos genes presentan un perfil de expresión equivalente al descrito a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240 (sección 4.4.2.4.). Asimismo, están sub-expresados a día 1 dos genes codificantes de proteínas implicadas en el procesamiento del ARN: la subunidad RRP41B del exosoma, descrita en pIR-PP1-240 (sección 4.4.2.4) y la proteína SmD2. Esta proteína presenta un dominio tipo LSM (PF01423) relacionado con procesos de edición y degradación del ARNm. Además del

mencionado gen SmD2, a día 3 destaca la sub-expresión de otros genes precursores de proteínas relacionados con la biogénesis del ARN: la proteína nucleolar de la familia A LinJ.34.4120 (snoRNP fA), la proteína 2 asociada al exosoma (P2A-Ex) y la proteína *Mago Nashi* (MgN). En los organismos eucariotas, la proteína MgN forma parte del complejo de unión de exones (EJC). Este complejo se une de manera inespecífica al ARNm por mediación del espliceosoma y participa en la estabilización del transcrito y su exportación al citoplasma (Tange y col., 2004). También está sub-expresado a día 3 el gen codificante de la endonucleasa G, detectado en el día 1. Asimismo, se ha observado la sub-expresión a día 5 de un gen codificante de una proteína con motivos de dedos de zinc tipo CCHC (PS50158), los cuales están implicadas en la regulación de la transcripción por su interacción con ácidos nucleicos.

Desde el punto de vista traduccional, se ha observado la sub-expresión de diversos genes precursores de proteínas ribosómicas de las subunidades 60S y 40S así como la proteína ribosomal ácida tanto a día 1 (siete genes) como a día 3 (once genes).

Modificaciones post-traduccionales y degradación de proteínas.

El gen de la selenofosfato sintetasa (SePS), implicado en la adición cotraduccional de selenocisteínas, y el gen de la glutarredoxina monotiólica (1-C-Grx), relacionado con el ensamblaje y biogénesis de centros ferro-sulfurados, están sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1C-34. Este perfil de expresión fue observado tanto en el transfectante pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T a día 1. Sin embargo, cabe destacar que el gen SePS se encuentra también sub-expresado en el día 3 de la curva de crecimiento del transfectante pIR-PP1C-34. Seis genes relativos a procesos de plegamiento de proteínas están sub-expresados a día 1 y día 3 en el transfectante pIR-PP1C-34. Entre ellos destacan cuatro proteínas con actividad *cis-trans* isomerasa, siendo detectados a día 1 los genes precursores de las proteínas FKBP y PAR45, y a día 3 las ciclofilinas CYP4 y CYP8. La sub-expresión de FKBP a día 1 se ha observado reiteradamente en los tres transfectantes analizados. Además, a día 3 están sub-expresados tres genes codificantes de proteínas con actividad chaperona: la subunidad 6 del complejo *prefoldin* (PFD6), y dos chaperonas de las familias GrpE y HSP40, respectivamente. Según las anotaciones de GO, GrpE es una proteína mitocondrial (GO:0005739) implicada en el plegamiento y transporte intracelular de proteínas (GO:0006457, GO:0030150).

En cuanto a la degradación proteica, están sub-expresadas a día 1 dos genes codificantes de las metaloendopeptidasas (GO:0004222) pertenecientes a las familias M16 Y M67. La proteína tipo M16 presenta una localización mitocondrial hipotética según los análisis de secuencia aminoacídica (PTHR11851:SF44), y M67, descrita con anterioridad en el transfectante pIR-PP1-240, es una endopeptidasa con actividad hidrolítica de O-sialoproteínas. Además, se ha observado la sub-expresión de varios genes precursores de proteínas relacionadas con la maquinaria de degradación por la vía ubiquitina-proteosoma. La subunidad 9 del proteosoma (RP9S) sub-expresada a día 1, es una proteína no ATPasa constituyente del complejo regulador 19S del proteosoma. Asimismo, una

Resultados

proteína de la familia RING y una proteína tipo ubiquitina, implicadas en procesos de ubiquitinación, están sub-expresadas en los días 1 y 3, respectivamente.

Ciclo celular.

Dos genes codificantes de proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular durante la mitosis, Mad 2 y Yippee, están sub-expresados a día 1. Este perfil de expresión también se ha observado en los transfectantes en estudio pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T (sección 4.4.2.4 y sección 4.4.3.4). Además, en el transfectante pIR-PP1C-34 está sub-expresado a día 3 un gen precursor de una proteína implicada en la recombinación homóloga en eucariotas, DMC1.

Metabolismo.

Tres genes codificantes de enzimas involucradas en los procesos biosintéticos de ácidos grasos de *Leishmania* están diferencialmente expresados en los días 1 y 3 de la curva de crecimiento en el transfectante pIR-PP1C-34. Entre ellos se encuentran los genes precursores de las enzimas 3 hidroxil-acil-ACP deshidratasa (HTD2) y β -cetoacil-ACP sintasa (KAS), sub-expresadas a día 1 y día 3, respectivamente. Estas proteínas forman parte del complejo mitocondrial tipo II de síntesis de ácidos grasos *de novo* (revisado por Ramakrishnan y col., 2013). Además, está sobre-expresado a día 1 un gen codificante de una ácido graso desaturasa, la cual participa en la generación de ácidos grasos insaturados en el RE. Otro proceso afectado en el transfectante pIR-PP1C-34 es el metabolismo del glioxilato, debido a la sub-expresión a día 1 del gen precursor de la enzima HORP. Por otro lado, está sub-expresado a día 3 el gen de la galactofuranosil transferasa (LPGR1). Esta enzima es responsable de la adición de galactofuranosa a los residuos de lipofosfoglicano, y está ubicada en el aparato de Golgi (Zhang y col., 2004). Otros genes sub-expresados a día 3 son la nitrilasa, implicada en el metabolismo del triptófano y la subunidad 6 de la citocromo c oxidasa, unidad esencial de la cadena de transporte de electrones mitocondrial para la obtención de energía.

Citoesqueleto y flagelo.

Seis genes codificantes de proteínas motoras de las familias dineínas y quinesinas están diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34. En asociación con los microtúbulos, estas proteínas intervienen en diversos procesos celulares como el transporte de orgánulos, segregación de cromosomas y movimiento de cilios y flagelos. Se ha identificado la sub-expresión de tres genes codificantes de cadenas ligeras de dineínas (DLC): LinJ.21.1260 (DLC28), a día 1, y LinJ.16.0950 (DLC4) y LinJ.31.3280 (DLC2), a día 3. De acuerdo a los análisis de su secuencia aminoacídica, DLC28 (IPR019347) y DLC4 (PTHR11886:SF2) son dineínas axonemales, mientras que DLC2 es de localización desconocida. Además, se ha hallado sobre-expresado a día 1 un gen precursor de una cadena pesada de dineína (DHC) y dos genes relativos a quinesinas K39 a día 3. Otro gen relacionado con los microtúbulos sub-expresado a día 3 es el cofactor A de unión a tubulina (TBCA).

Cinco genes codificantes de proteínas vinculadas a la región flagelar de tripanosomátidos están diferencialmente expresados en los días 1 y 3 analizados en el transfectante pIR-PP1C-34. A día 1, está sobre-expresado el gen LinJ.34.2370 precursor de una proteína con dominio C2. Esta proteína representa un componente del cuerpo basal y zona de anclaje flagelar (Zhou y col., 2011). También se encuentran sobre-expresados a día 3 los genes LinJ.34.0710 y LinJ.34.0720, codificantes de proteínas de la zona de anclaje flagelar (FAZP). El factor 3 de ribosilación (ARL-3A) y un ortólogo del autoantígeno nuclear responsable del Síndrome de *Sjögren* primario (SSNA1) están sub-expresados a día 3.

Señalización celular.

Varios genes codificantes de proteína-quinasas están diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34. A día 1 está sobre-expresado un gen precursor de una proteína tipo MAPK (LinJ. 19.0170) y dos proteínas quinasas (LinJ.05.0130 y LinJ.32.0820). Los estudios de GO y la presencia de dominios proteicos conservados las definen como proteína tirosina quinasa (GO:0004713) y serina/treonina quinasa (GO:0004674) en ambos casos. Entre los genes sub-expresados, se ha detectado a día 3 una proteína de tipo calmodulina y a día 5 la quinasa LinJ.32.1900.

Transporte y proteínas de superficie.

Al igual que se ha observado en el transfectante pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, están sub-expresados a día 1 el gen precursor del transportador mitocondrial de ácidos tricarbóxicos LinJ.01.0590 y el gen codificante de la proteína de superficie tuzina LinJ.08.0750. Otro gen sub-expresado a día 3 relacionado con la función de transporte celular es el LinJ.32.0520, codificante de una proteína de tipo Rab (Rab4). Las enzimas Rab son proteínas especializadas en la regulación del tráfico de membrana pertenecientes a la familia de las GTPasas Ras. En mamíferos, Rab 4 está implicado en el reciclaje de diversas proteínas de superficie.

Otros genes de funciones diversas.

Entre los genes diferencialmente expresados a día 1, destaca la sobre-expresión del gen A2. Además, se ha identificado la sub-expresión a día 3 de un gen ortólogo del factor inhibitorio de macrófagos humanos (MIF). La proteína MIF es una citoquina activadora de la respuesta innata por interacción con el receptor CD74, induciendo la ruta MAPAK/ARK1/2 que protege a los macrófagos de la activación de la apoptosis inducida (Calandra y Roger, 2003).

El gen LinJ.32.3140 sub-expresado a día 3 codifica para una proteína de unión a ATP y presenta un dominio de tipo tiorredoxina (SSF52833). Estos dominios están presentes en proteínas involucradas en numerosas funciones celulares como la formación de puentes disulfuro, protección celular frente a estrés oxidativo y señalización celular.

El perfil de expresión génica descrito en el transfectante pIR-PP1C-34 está representado en la Figura 63, estando excluidos los genes codificantes de proteínas hipotéticas y de función desconocida.

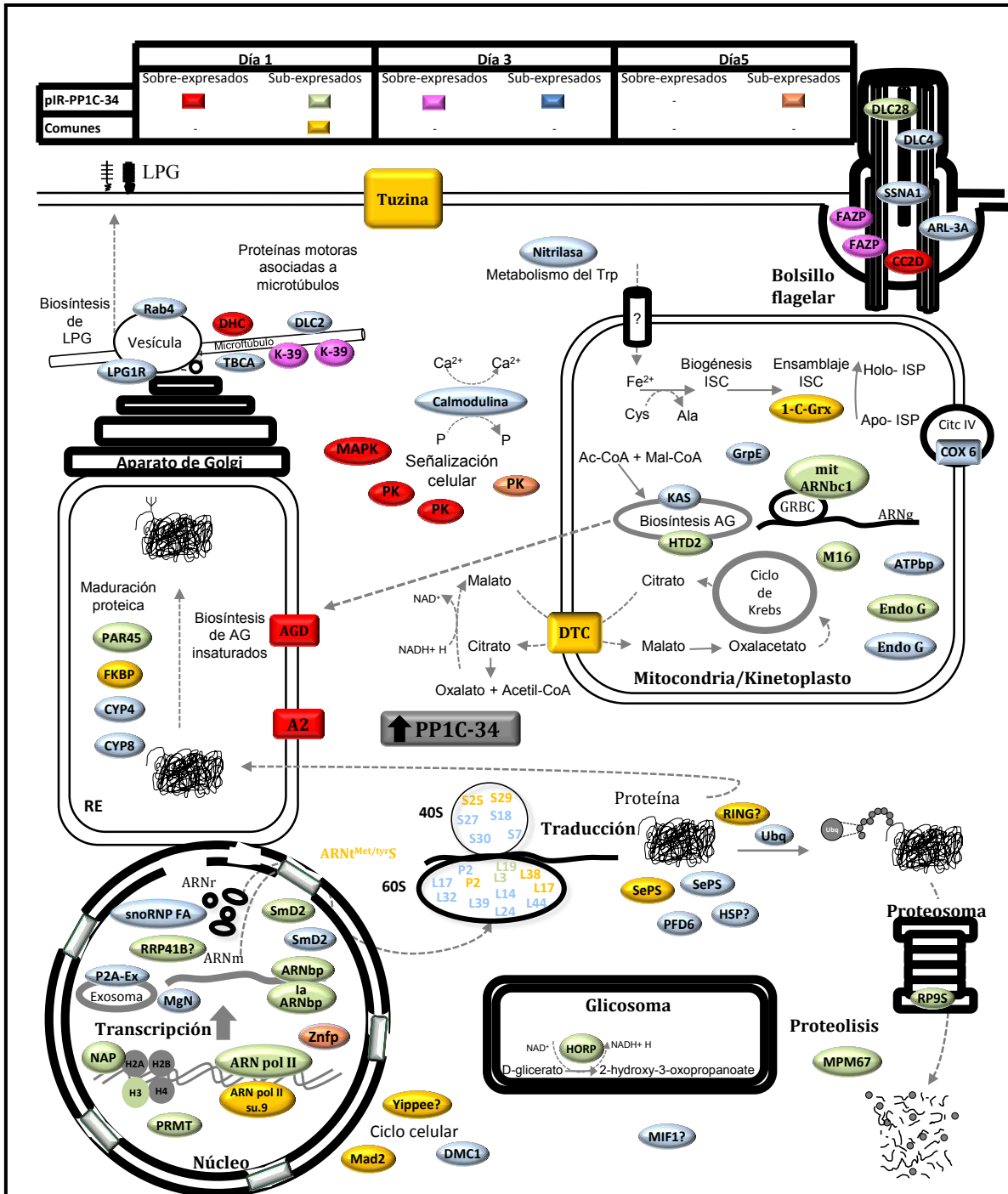


Figura 63. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial del transfectante pIR-PP1C-34. Se detallan los genes diferencialmente expresados codificantes de proteínas de función conocida en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento, así como la localización subcelular y relaciones funcionales de las proteínas que codifican. Abreviatura: ISC, centros ferro-sulfurados.

4.5.4.5.- Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de promastigotes transfectados con pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34.

Se llevó a cabo un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica a día 1 en los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. Para ello se realizó un análisis mediante *clustering* jerárquico basado en la distancia euclídea siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.10.2.1. Como ha sido puesto de manifiesto en los análisis individuales, el *clustering* de los GDE en los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 refleja un predominio de la sub-expresión en los perfiles de expresión génica a día 1. Además, la sobre-expresión de las diferentes PP1 en estudio, induce un perfil de expresión génica similar en los tres transfectantes analizados, como puede observarse en la Figura 64.

Los genes diferencialmente expresados pueden ser agrupados en función de sus niveles de expresión en 9 *clusters*. Los 8 primeros *clusters* representan genes sub-expresados y el *cluster* 9 está formado por genes sobre-expresados. Los *clusters* 1 y 2 están constituidos por genes con niveles de sub-expresión similares que están presentes mayoritariamente en los tres transfectantes. Sin embargo, cabe mencionar los puntos de divergencia observados entre éstos. En el *cluster* 1 destacan cinco genes sub-expresados únicamente en pIR-PP1-240. Estos genes codifican para proteínas hipotéticas y de función desconocida, presentando uno de ellos (LinJ.26.1780) un dominio PF09340 asociado a la acetilación de histonas. En el caso de los promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T figura el gen LinJ.13.0710, precursor de una proteína hipotética de función desconocida con un dominio tipo LYRM (motivo leucina/ tirosina/arginina). Las proteínas con dominios LYRM forman parte de los complejos mitocondriales OXPHOS (fosforilación oxidativa), participando como subunidades accesorias o factores de ensamblaje. Este tipo de proteínas también desempeñan un papel esencial en la biogénesis de grupos ferro-sulfurados y en el metabolismo del acetato, y algunas de estas proteínas se asocian al sistema mitocondrial tipo I de síntesis de ácidos grasos (Angerer, 2013). LinJ.11.0300 y LinJ.27.1450 son genes que están sub-expresados en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1C-34 que están incluidos en el *cluster* 1. El primer gen es precursor de una proteína hipotética conservada de tipo Sec 20 (PF03908), implicada en el transporte vesicular de moléculas en el aparato de Golgi, y el segundo es el gen ARNpol II, el cual presenta mayor nivel de sub-expresión en el transfectante pIR-PP1-240. En el *cluster* 2 destaca el gen LinJ.21.2150, codificante de la proteína ribosómica 40S S6; y el gen LinJ.27.0070, precursor de una proteína hipotética transmembrana de función desconocida, siendo identificados dichos genes de forma exclusiva en los transfectantes pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34, respectivamente.

Los *clusters* 3 y 4 agrupan los genes que presentan mayores niveles de sub-expresión. En el *cluster* 3 destacan cuatro genes sub-expresados únicamente en pIR-PP1C-34. Entre ellos figuran dos genes ribosomales 60S L19, el gen SmD2 descrito con anterioridad, y dos genes codificantes de proteínas hipotéticas de función desconocida, LinJ.01.0780 y LinJ.29.1380.

Resultados

El *cluster* 4 está constituido por cuatro genes, estando tres de ellos presentes en todos los transfectantes analizados. Entre los genes comunes, destaca por su nivel de sub-expresión el gen codificante de la proteína ribosomal 40S S25, seguido del gen LinJ.25.1220 precursor de la proteína ribosomal ácida P2 y el gen LinJ.37.3760, codificante de una proteína hipotética de función desconocida. El cuarto gen presente en el *cluster* 4, LinJ.15.1190, está sub-expresado de forma exclusiva en el transfectante pIR-PP1C-34 y codifica también para la proteína ribosomal ácida P2.

Dentro del *cluster* 5 se incluyen genes con menores niveles de sub-expresión respecto a los *clusters* anteriores. Entre ellos se observa un bloque de doce genes propios del promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34, representado en su mayoría por genes de función desconocida. Entre los genes de función conocida figuran: la endopeptidasa M16, la subunidad 9 del complejo regulador 19S del proteosoma, el gen PAR45 con actividad protil *cis-trans* isomerasa y la cadena ligera de la dineína DLC28.

El *cluster* 6 está formado por genes con niveles de expresión similar al *cluster* 5. Entre ellos se observan dos genes característicos del transfectante pIR-PP1-240 y cuatro genes propios de pIR-PP1C-34. Los genes sub-expresados en el transfectante pIR-PP1-240 codifican para dos proteínas hipotéticas conservadas: LinJ.16.0860 y LinJ.05.0080. Este último gen presenta un dominio PF07890 asociado con la maduración de ribosomas como fue descrito en la Sección 4.4.2.4. Entre los genes sub-expresados en pIR-PP1C-34 se incluyen la subunidad ribosómica 60S L3 y tres genes precursores de proteínas hipotéticas: LinJ.35.1410, con un dominio de unión a ARN (IPR000504), LinJ.25.1720 con dominio SH3 (SSF50104) relacionado con proteínas tipo Ras y Src implicadas en vías de señalización de regulación del citoesqueleto, y LinJ.34.3930 con dominio GRIP (Golin 97, RanB2alfa, lh1p y p230/Golgi-245) (PF01465) asociado con proteínas del aparato de Golgi en eucariotas y proteínas superhélice.

El *cluster* 7 está compuesto por cinco genes sub-expresados. LinJ.25.1970 y LinJ.30.3650 están presentes de forma exclusiva en el transfectante pIR-PP1-240T y son precursores de una proteína hipotética de función desconocida y la proteína ribosómica 40S S14, respectivamente. Además, el *cluster* 7 incluye el gen FKBP detectado en los tres transfectantes y dos genes codificantes de proteínas hipotéticas de función desconocida en pIR-PP1-240T, LinJ.19.0780 y LinJ.21.1570, los cuales presentan un perfil de expresión común a pIR-PP1-240 y pIR-PP1C-34, respectivamente

El *cluster* 8 está constituido por catorce genes identificados únicamente en pIR-PP1-240T. Ocho de ellos codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida, dos son precursores de las proteínas ribosomales L18a y S6 y los tres restantes incluyen las proteínas de función conocida: PPSCMT, RFK y ARD1, descritas con anterioridad en la Sección 4.4.3.4.

Los genes sobre-expresados están agrupados en el *cluster* 9. Entre ellos destaca el gen LinJ.19.0240, codificante de una proteína hipotética conservada asociada al centrosoma (Wheeler y col., 2015) y que está presente en los tres transfectantes.

Asimismo, cabe mencionar los genes que presentan los mayores niveles de sobre-expresión en pIR-PP1C-34. Entre ellos figuran el gen codificante de CC2D, MAPK y una proteína con dominio de unión a ARN. Este último gen está sobre-expresado también en el transfectante pIR-PP1-240.

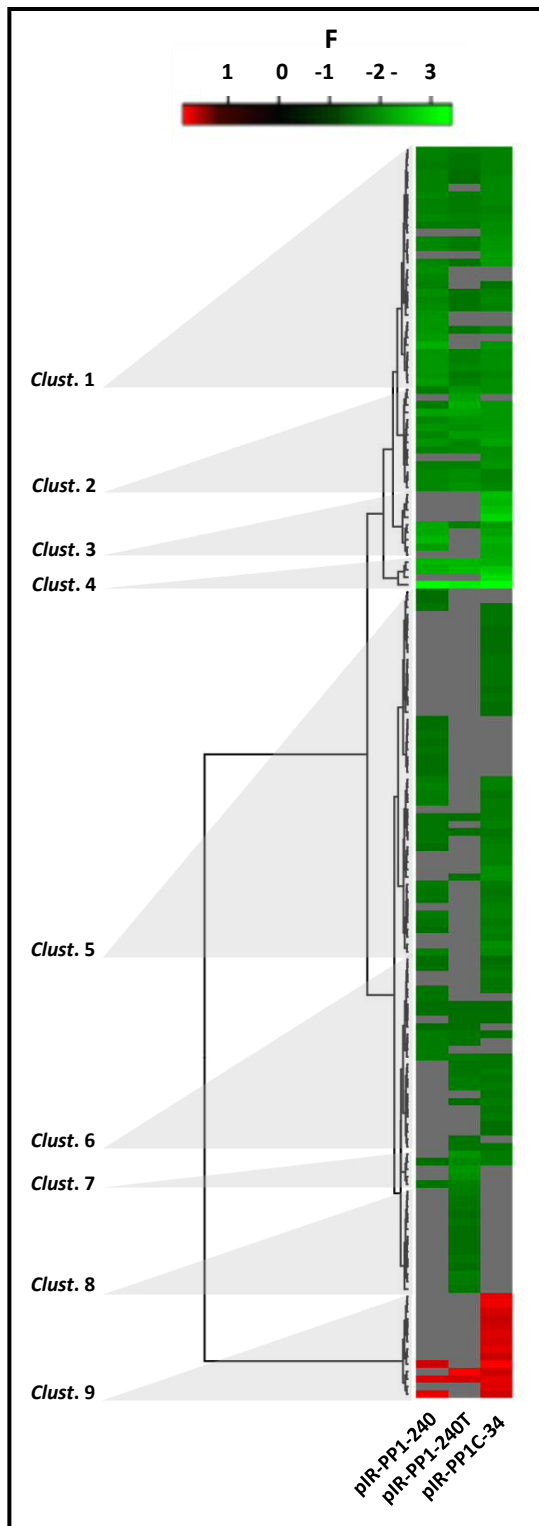


Figura 64. Clustering jerárquico de los GDE a día 1 en pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 vs. pIR. El gráfico muestra el *clustering* jerárquico elaborado en base a la distancia euclídea y el mapa de intensidad obtenido en función de los niveles de expresión de los GDE a día 1 en los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 respecto al control pIR. Los genes se consideran sobre-expresados si $F \geq 1,7$ (rojo) o sub-expresados si $F \leq -1,7$ (verde), con una significación estadística $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) según el test de la *t* de *Student*. Se representan en gris los genes que no cumplen los criterios definidos para F y p .

Resultados

Por otro lado, el diagrama de Venn de los genes sub-expresados a día 1 en las tres líneas *knock-in* refleja las similitudes entre los perfiles de expresión génica de pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 (Figura 65). Más de la mitad de los genes diferencialmente expresados están presentes en los tres transfectantes. De los 17 genes de función conocida comunes descritos con anterioridad en pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T (Sección 4.4.4), sólo uno de ellos no está presente en pIR-PP1C-34, el gen *SNARE* LinJ.17.0430. Asimismo, el transfectante pIR-PP1-240 presenta un perfil más afín a PP1C-34, con un total de 69 genes comunes.

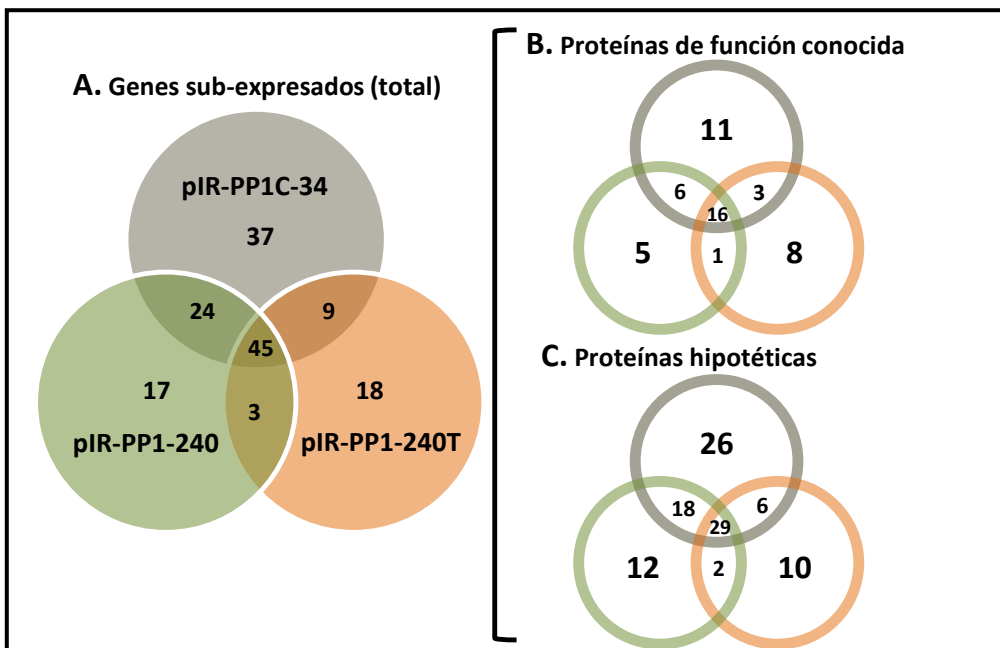


Figura 65. Diagramas de Venn de los perfiles de expresión génica diferencial a día 1 de los transfectantes pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34. Los genes sub-expresados a día 1 se clasifican como: número total de genes (A), genes codificantes de proteínas de función conocida (B) y genes codificantes de proteínas hipotéticas conservadas y función desconocida (C).

5. DISCUSIÓN

5.1.- Conservación de la secuencia de las proteínas PP1-240 y del cluster PP1-34.

Las PP1 están implicadas en la regulación de una gran variedad de procesos celulares mediante la desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina. A pesar de que las PP1 han sido ampliamente estudiadas en diferentes organismos eucariotas (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004), se desconoce el papel que desempeñan en el género *Leishmania* spp. debido a la complejidad que representa su estudio.

Las PP1 se encuentran entre las proteínas más conservadas en la escala evolutiva entre los organismos eucariotas, con una similitud de secuencia media aproximada del 70% (Barton y col., 1994; Lin y col., 1999). Esto hecho se ilustra por ejemplo con *Giardia lamblia*, un protozoo de divergencia temprana de la rama evolutiva de los eucariotas que presenta una PP1 con una identidad de secuencia del 72% respecto a las PP1 de mamífero (Ceulemans y col., 2002). Los organismos eucariotas contienen de 1 a 8 genes codificantes de diferentes PP1 (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004). En el caso de *L. infantum*, han sido anotados 8 genes precursores de proteínas de tipo PP1 (Brenchley y col., 2007), de las cuales han sido estudiadas en esta tesis doctoral la PP1 codificada por el gen LinJ.15.0240 o PP1-240 y del cluster de genes compuesto por las cuatro PP1 codificadas por el cromosoma 34 o cluster PP1-34. Los alineamientos múltiples llevados a cabo han revelado una similitud de secuencia del 45% para la proteína PP1-240 y del 60% para la secuencia consenso del cluster PP1-34 con respecto a 9 PP1 codificadas por organismos diferentes (Figura 18). El nivel de identidad observado ha sido similar al descrito previamente en las PP1 de *Trypanosoma* spp. (~55%) (Lin y col., 1999), representando las PP1 de los tripanosomátidos una de las PP1 más divergentes entre los organismos eucariotas analizados (Barton y col., 1994). El menor grado de identidad observado en la proteína PP1-240 se debe en parte a la presencia de una región adicional de 27 aminoácidos comprendida entre las posiciones 109 y 135 (Figura 16). Dicha secuencia ha sido identificada también en otras especies de *Leishmania* analizadas (Tabla 12 y Anexo II), pudiendo constituir una región específica con interés desde el punto de vista terapéutico (Peti y Page, 2015). Las cuatro PP1 definidas como cluster PP1-34, se caracterizan por la presencia de un núcleo catalítico común altamente conservado (>95%) y un extremo N-terminal variable (Figura 17). Dicha evidencia ha sido observada también entre las PP1 de mamíferos, estando descritas 4 isoformas denominadas PP1 α , PP1 β , PP1Y1 y PP1Y2 (Cohen, 1988; Sasaki y col., 1990). Por ello, las cuatro PP1 integradas en el cluster PP1-34 de *L. infantum* podrían corresponder a diferentes isoformas derivadas de la misma proteína, al igual que ocurre en mamíferos.

A pesar de mostrar una identidad de secuencia media inferior a la descrita en otros organismos eucariotas, las proteínas PP1-240 y el cluster PP1-34 de *L. infantum* mantienen inalterados todos los residuos característicos de las proteínas serina-treonina fosfatasa salvo las posiciones 106 (CG), 272 (RG) y 323 (SAPNY) de la proteína PP1-240 que han sido sustituidas por Pro, Arg y Thr, respectivamente. De acuerdo a los estudios de estructura terciaria de diferentes PP1 de mamíferos (Egloff y col., 1995; Goldberg y col., 1995; Kelker y col., 2009), dichas variaciones no afectan a residuos críticos asociados a la actividad

Discusión

enzimática de las PP1. Así pues, la proteína PP1-240 y el *cluster* PP1-34 mantienen invariables todos los aminoácidos implicados en la interacción con sustratos e iones metálicos (Egloff y col., 1995) (Figura 18). Estos datos confirman la conservación de la proteína PP1-240 y del *cluster* PP1-34 a lo largo de la evolución.

Por otro lado, los extremos N y C terminal representan las áreas de mayor variabilidad de las proteínas PP1-240 y del *cluster* PP1-34, coincidiendo con los análisis previos realizados sobre las PP1 de organismos eucariotas (Barker y col., 1994). De acuerdo al modelado predictivo (Anexo VI), el extremo N-terminal divergente presente en las proteínas PP1-240 y *cluster* PP1-34, muestra una localización excéntrica al núcleo catalítico. Dicha región ha sido identificada como una secuencia determinante en la localización subcelular de las isoformas PP1 α , PP1 β y PP1 γ_1 de mamífero (Lesage y col., 2005). Además, en el caso de PP1-240 destaca la presencia de un extremo C-terminal variable de mayor longitud y sin una estructura definida (Anexo XB). Esta observación es consistente con resultados cristalográficos previos, que definen el extremo C-terminal de las PP1 de mamífero como un elemento desordenado con ausencia de función a nivel estructural (Egloff y col., 1995). La presencia de un residuo de treonina susceptible de ser fosforilado en el extremo C-terminal de PP1-240, sugiere que esta región podría representar una secuencia de autorregulación enzimática como ha sido puesto de manifiesto en otras PP1 estudiadas (Dohadwala y col., 1994; Yamano y col., 1994).

En base a la elevada homología de secuencias de las proteínas codificadas por el *cluster* PP1-34 y los estudios previos de expresión diferencial (Alcolea, 2010), se decidió analizar inicialmente la actividad fosfatasa de la PP1 codificada por el gen LinJ.34.0840 ó PP1-840. Estos estudios corroboraron la actividad serina-treonina fosfatasa de la proteína PP1-840-MBP obtenida en condiciones nativas a partir del sistema de expresión compuesto por el vector pETM-41 y la cepa *SHuffle express* de *E. coli* (sección 4.2.2.).

La selección del sistema de expresión se basó en los estudios de solubilidad descritos en la sección 4.2.1., los cuales pusieron de manifiesto la presencia mayoritaria de la proteína PP1-840 en cuerpos de inclusión de *E. coli* (Figura 19). Este hecho ha sido observado en otras proteínas PP1 de organismos eucariotas, representando la solubilización de dichas enzimas un desafío técnico. Aunque la sobre-expresión de las PP1 se induce fácilmente en *E. coli*, las proteínas resultantes son altamente insolubles (revisado por Peti y Page, 2015). Para superar estas limitaciones, se han investigado diferentes sistemas de expresión y purificación de las PP1 (Berndt y Cohen, 1990; Zhang y col., 1992; Alessi y col., 1993; Zhang y col., 1994; MacKintosh y col., 1996; Watanabe y col., 2003). Entre ellos, se han descrito múltiples procedimientos de replegamiento (*refolding*) asociados a chaperonas específicas de PP1. Sin embargo, se descartó el desarrollo de esta metodología debido a los bajos rendimientos de proteína soluble activa producidos (revisado por Peti y Page, 2015).

En base a los resultados obtenidos mediante el protocolo de expresión de PP1 asistido por chaperonas descrito por el grupo de Peti (Kelker y col., 2009), se desarrolló una estrategia adaptada para la producción de la proteína PP1-840 en la cepa M15 de *E.*

coli a partir del vector pQE-30. Entre los factores determinantes implementados para el aumento del rendimiento de la solubilidad de la proteína PP1-840 se incluyen: expresión a baja temperatura (10°C), adición de Mn^{2+} en el medio de cultivo para la estabilización de la estructura de la proteína debido a su interacción con el centro activo y coexpresión de la PP1-840 con las chaperonas GroEL y GroES. Además, una vez finalizado el tiempo de expresión, el cultivo celular fue resuspendido en LB fresco en presencia de cloranfenicol (200µg/ml) durante 2 horas. Se ha descrito que este último paso elimina la actividad ribosomal y permite un *refolding in vivo* de la PP1X de mamífero en presencia de las chaperonas GroEL y GroES (Kelker y col., 2009). Sin embargo, el procedimiento mencionado no mejoró la solubilidad de la proteína PP1-840 de *L. infantum*.

Fundamentado en los estudios de secuencia de aminoácidos que revelaron la presencia de once residuos de cisteína, se expresó la proteína PP1-840 en la cepa *SHuffle express* de *E. coli*. Estas células permiten la correcta formación de puentes disulfuro en las proteínas sintetizadas debido a la expresión citoplasmática de la enzima disulfuro isomerasa DsbC y la delección de los genes que codifican la tiorredoxina reductasa y glutarredoxina reductasa (Lobstein y col., 2012). Sin embargo, dicho sistema no mejoró la solubilidad de la proteína PP1-840 por lo que se desarrolló una nueva estrategia basada en la expresión de la proteína PP1-840 como proteína de fusión con el *tag* de MBP en el extremo C-terminal. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la insuficiencia del *tag* MBP en la solubilización de la proteína cuando éste era empleado como único factor de solubilización en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* (Figura 19 B-1), así como en combinación con las chaperonas Cpn 10 y Cpn 60 en la cepa *Artic express* (DE3) (Figura 19 B-2). La PP1-840 sólo se obtuvo en condiciones nativas cuando se expresó en la cepa *SHuffle* de *E. coli* en combinación con el *tag* MBP (Figura 19 B-3), poniendo en evidencia la importancia de los puentes disulfuro como elemento estabilizador de la estructura proteica PP1-840-MBP.

Los ensayos de actividad enzimática realizados con la proteína de fusión PP1-840-MBP, reflejaron un nivel de actividad 40 veces inferior al de la proteína PP1 de mamífero empleada como control del experimento (Figura 21). Dicho resultado se podría deber a la presencia de formas incompletas y/o productos de degradación de la proteína PP1-840-MBP observadas mediante el análisis por *Western blot* realizado (Anexo VIII). Asimismo, el estudio de codones raros de la secuencia génica codificante de la proteína PP1-840 reflejó la existencia de 15 codones presentes con baja frecuencia en el genoma de *E. coli* (Anexo IX). Se ha descrito que la sobre-expresión de proteínas eucariotas en *E. coli* que presentan un sesgo en la frecuencia de codones pueden dar lugar a fallos en el proceso de traducción (Kane, 1995; Sayers y col., 1995; Kurland y Gallant, 1996). Por tanto, las bandas de peso molecular inferior a la proteína PP1-840-MBP podrían corresponder con formas incompletas no funcionales, lo que justificaría la menor tasa de actividad descrita. Además, la actividad de la proteína PP1-840-MBP podría verse afectada por un plegamiento incorrecto debido a su expresión en el sistema heterólogo de *E. coli* descrito (Figura 20). Estudios previos han puesto de manifiesto variaciones en el nivel de actividad obtenido en PP1 recombinantes producidas en *E. coli* con respecto a las proteínas PP1 nativas de mamífero obtenidas directamente del músculo esquelético (revisado por Peti y col., 2013).

Discusión

No obstante, sería necesario llevar a cabo una mejora del sistema de purificación diseñado para la proteína PP1-840 y realizar un ensayo de actividad más exhaustivo que incluya el uso de inhibidores específicos de PP1 para la correcta caracterización funcional de PP1-840.

5.2.- Niveles de expresión génica de PP1-240 y del cluster PP1-34.

Los estudios por qRT-PCR y *Western blot* han permitido determinar los niveles de expresión génica de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum*. En cuanto a los niveles de ARNm analizados por qRT-PCR, se ha detectado una tasa de expresión constante de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 a lo largo de la curva de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico (Figura 25). Estos resultados coinciden con la abundancia de proteína PP1-240 observada por *Western blot* (Figura 29), lo que sugiere que la expresión génica de PP1-240 es constitutiva en promastigotes de cultivo axénico. Este hecho es consistente con la hipótesis de expresión constitutiva del genoma de *Leishmania* spp. descrita por diversos autores (Holzer y col., 2006; Leifso y col., 2007; Saxena y col., 2007). Sin embargo, en el caso del *cluster* PP1-34 se ha detectado un ligero incremento de la abundancia de proteína en promastigotes axénicos en fase estacionaria según los estudios de *Western blot* (Figura 30), por lo que podría existir un mecanismo de regulación a nivel post-transcripcional que controlase la expresión de estos genes. Esta observación podría estar relacionada con el patrón de fosforilación variable detectado en los residuos de serina-treonina de proteínas en *Leishmania* (Dell y Engel, 1994). Además, la disposición en tándem observada en los genes codificados por el *cluster* PP1-34, también ha sido detectada en otras PP1 de *Leishmanian* spp. y *Trypanosoma* spp. (revisado por Szoor, 2010). Dicha organización podría estar relacionada con la regulación de la expresión diferencial de las diferentes PP1, como ha sido descrito en algunos genes de *Leishmania* spp. como la cisteína proteasa o la glucoproteína gp63 (Kelly y col., 2001; Mundodi y col., 2002). No obstante, cabe destacar que el anticuerpo anti-PP1C-34 generado no permite discriminar entre las diferentes proteínas integradas en el *cluster* PP1-34. Por tanto, debemos considerar los niveles proteicos detectados como una primera aproximación al perfil de expresión génica del *cluster* PP1-34.

Por otro lado, los estudios llevados a cabo por qRT-PCR para evaluar los niveles de transcrito de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 sobre las poblaciones PNA⁻, Pro-Pper y Amas con respecto a promastigotes de cultivo axénico en fase logarítmica y estacionaria, mostraron unas tasas de variación, inferiores a 2 en todos los casos (Figura 26). Se desconoce si estas pequeñas variaciones suponen consecuencias biológicas relevantes para *Leishmania*.

El estudio comparativo de los niveles de expresión génica de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 detectados por qRT-PCR en promastigotes extraídos del vector *P. perniciosus* respecto a promastigotes metacíclicos PNA⁻ obtenidos de cultivo axénico, reflejan la sobre-expresión de los genes LinJ.15.0240, LinJ.34.08320 y LinJ.34.0850 (Figura 27). Aunque el cultivo axénico de promastigotes mimetiza *in vitro* el proceso de desarrollo en el tubo

digestivo del vector (Neal y Miles, 1963; Lemma y Schiller, 1964; Steiger y Steiger, 1977; Berens y Marr, 1978), los resultados obtenidos ponen de manifiesto la influencia del cultivo en los perfiles de expresión génica de *L. infantum*. Esta observación ha sido también reflejada en diferentes estudios transcriptómicos (Alcolea y col., 2010a; Alcolea y col., 2014; Alcolea y col., 2016b; Alcolea y col., 2016c).

En cuanto a los niveles de proteína evaluados por *Western blot* en el estadio amastigote, cabe destacar la mayor abundancia de PP1-240 detectada en amastigotes intracelulares obtenidos a partir de infecciones *in vitro* de células U937 con respecto a amastigotes axénicos (Figura 31). Esta observación coincide con las diferencias de expresión génica reflejadas por otros autores entre los diferentes modelos de cultivo de amastigote mencionados (Rochette y col., 2009; Fiebig y col., 2015). No obstante, la proteína PP1-240 presentó un tamaño molecular superior al observado en el estadio promastigote. Esto se podría deber a la formación de agregados de la subunidad catalítica PP1-240 con proteínas reguladoras, dado el sistema de control enzimático descrito para las PP1 (revisado por Cohen, 2002).

5.3.- Localización subcelular de la proteína PP1-240 y del cluster PP1-34.

Los ensayos de IFI han confirmado el perfil de expresión observado mediante *Western blot* para la proteína PP1-240 y el cluster PP1-34 en el ciclo biológico de *L. infantum*. De este modo la proteína PP1-240 ha sido observada tanto en el estadio promastigote como en el estadio amastigote (Figuras 32 y 34), mientras que el cluster PP1-34 sólo se detectó en el estadio promastigote (Figura 33).

La localización flagelar de PP1-240 y del cluster PP1-34 en el estadio promastigote sugiere que éstas proteínas podrían participar en procesos moleculares relacionados. No obstante, a diferencia de la proteína PP1-240, que se distribuye en toda la extensión del apéndice flagelar y el bolsillo flagelar (Figura 32), las PP1 codificadas por el cluster PP1-34 se disponen principalmente en el bolsillo flagelar (Figura 33). Este área presenta un papel fundamental en la morfogénesis de los tripanosomátidos (Field y Carrington, 2009; Gadelha y col., 2013) y está implicada en procesos de endocitosis y exocitosis celular (Engstler y col., 2007). Asimismo, la correcta formación del bolsillo flagelar es crucial para la viabilidad y la infectividad del parásito, como se ha puesto de manifiesto en *T. brucei* (Absalon y col., 2008; Bonhivers y col., 2008). Además, el bolsillo flagelar se encuentra estrechamente relacionado con el flagelo (Wheeler y col., 2016), donde se encuentra también la proteína PP1-240 (Figura 32). El flagelo es el orgánulo responsable de la motilidad de *Leishmania* y presenta un papel esencial durante la migración, evasión y persistencia del parásito en los tejidos del hospedador (revisado por Gluenz y col., 2010). Por tanto, de acuerdo a su localización subcelular, la proteína PP1-240 y el cluster PP1-34 podrían presentar un papel clave en la infectividad y los procesos de diferenciación celular que tienen lugar durante el ciclo biológico de *Leishmania*. No obstante, teniendo en cuenta la localización dinámica de las cuatro isoformas de mamífero observada durante el

Discusión

ciclo celular, sería interesante evaluar la disposición de las diferentes PP1 de *L. infantum* durante el proceso de división del parásito (Andreassen y col., 1998; Trinkle-Mulcahy y col., 2003).

5.4.- Caracterización de la proteína PP1-240 y del cluster PP1-34 mediante líneas knock-in de sobre-expresión.

A continuación, se discuten los estudios realizados para la caracterización de las proteínas PP1-240 y del cluster PP1-34 a partir de diferentes líneas *knock-in* de sobre-expresión en promastigotes de cultivo axénico de *L. infantum*.

5.4.1.- Análisis de los niveles de expresión de PP1-240 y PP1-240T en las respectivas líneas pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T y estudio de la capacidad infectiva.

En el caso de PP1 240 se generaron las líneas celulares *knock-in* pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T para la sobre-expresión constitutiva de PP1-240 en su versión completa y sin el extremo N-terminal (PP1-240T), respectivamente (sección 4.5.). Los estudios transcriptómicos llevados a cabo mediante RNA-Seq confirmaron la sobre-expresión inducida tanto de PP1-240 como de PP1-240T en todos los días de la curva de crecimiento analizados (días 1, 3 y 5) (Tabla 23). Sin embargo, los análisis por *Western blot* mostraron la sobre-expresión de las proteínas PP1-240 y PP1-240T únicamente durante las primeras 24-48 horas de la curva de crecimiento (Figura 38). Estos resultados ponen de manifiesto diferencias entre los perfiles de expresión génica a nivel transcripcional y traduccional, lo que sugiere la activación de mecanismos de control, que en *Leishmania* se producen fundamentalmente en los niveles post-transcripcional, traduccional y/o post-traduccional (revisado por Clayton y Shapira, 2007). Esto se podría deber al estrés celular generado por la sobre-expresión de la subunidad catalítica PP1-240, cuyo incremento citoplasmático podría conllevar a una desfosforilación indiscriminada de sustratos con efectos nocivos sobre la célula (revisado por Gallego y Virshup, 2005; Fardilha y col., 2010). En los organismos eucariotas y diferentes modelos bacterianos, se ha descrito una baja correlación entre los niveles de ARNm y proteína cuando las células son expuestas a situaciones de estrés (revisado por Vogel y Marcotte, 2012). Asimismo, las mayores diferencias observadas entre las tasas de transcripción y traducción de *Leishmania* ocurren cuando los parásitos en cultivo *in vitro* son sometidos a estrés celular mediante variaciones de pH y temperatura, mimetizando el ambiente del tubo digestivo del vector durante el proceso de metaciclo génesis o la diferenciación de los promastigotes a amastigotes en los fagocitos del hospedador mamífero (Bates y col., 1992; Dillon y col., 2015; Kloehn y col., 2015)

En *Leishmania*, se ha descrito la regulación post-transcripcional de diversos genes (gp63, β -tubulina, HSP70, HSP83, histona H2A, etc) donde las regiones 3'UTR representan los principales elementos de control (Boucher y col., 2002; McNicoll y col., 2005; Rochette y col., 2005). Sin embargo, las observaciones realizadas en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T no pueden ser extrapoladas a los mecanismos de regulación que suceden

en la cepa *wild type*, ya que las regiones 3'UTR y 5'UTR asociadas a los genes codificantes de PP1-240 y PP1-240T derivan de secuencias intergénicas de *Leishmania* spp. presentes en el vector pIRmcs. Por otro lado, cabe destacar que la sobre-expresión de la subunidad catalítica PP1-240 y PP1-240T en las diferentes líneas *knock-in* es dependiente de la actividad traduccional de *L. infantum*, ya que las secuencias génicas correspondientes han sido integradas entre los *clusters* de genes precursores del ARNr dirigidos por la ARNpol I. Estudios recientes han puesto de manifiesto un descenso en la tasa de transcripción y traducción en promastigotes metacíclicos con respecto a promastigotes procíclicos (revisado por De Pablos y col., 2016) (Figura 66). Teniendo en cuenta dichas evidencias, es posible que los elevados niveles de transcrito de PP1-240 y PP1-240T detectados en las correspondientes líneas *knock-in* a día 1 estén saturando los mecanismos de control puestos en marcha por el parásito para contrarrestar el potencial efecto tóxico de la proteína PP1-240. Este hecho justificaría la sobre-expresión de la proteína PP1-240 únicamente durante las primeras 24-48 horas de la curva de crecimiento.

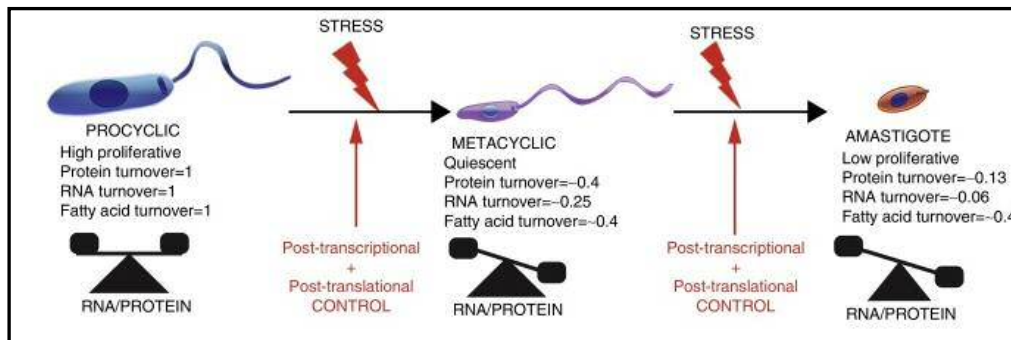


Figura 66. Esquema de las variaciones de las tasas de recambio de ARN y proteína a lo largo del ciclo biológico de *Leishmania* spp. Imagen tomada de De Pablos y col., 2016.

El perfil de expresión descrito para las proteínas PP1-240 y PP1-240T mediante los estudios por *Western blot* se reprodujo en las líneas *knock-in* pIR-PP1-240-GFP y pIR-PP1-240T-GFP, siendo detectada la sobre-expresión de las respectivas proteínas de fusión PP1-240-GFP y PP1-240T-GFP únicamente durante las primeras 24-48 horas de la curva de crecimiento (Figura 39). No obstante, en los transfectantes generados a partir del vector pIR-GFP se evidenció también la presencia de una banda adicional de tamaño molecular equivalente a la proteína GFP durante los 5 primeros días de la curva de crecimiento. Este hecho podría ser consecuencia de un *trans-splicing* alternativo (Liang y col., 2003b) o de la degradación de las proteínas de fusión generadas. Dicha observación ha sido también reflejada en *L. donovani* durante la sobre-expresión de la proteína PTR1-GFP, siendo identificada la proteína GFP libre como un producto de degradación proteico (Kumar y col., 2007). Cabe destacar que los ensayos por microscopía de fluorescencia realizados en los transfectantes derivados de la línea pIR-GFP no proporcionaron información adicional sobre los estudios de localización subcelular previamente realizados en la cepa silvestre (Anexo XIV). Esto fue debido al enmascaramiento de la localización subcelular de la

Discusión

proteína de fusión PP1-240 por la proteína GFP libre detectada, así como a la pérdida de fluorescencia observada en el transfectante pIR-PP1-240T. No obstante, es necesario indicar la presencia adicional de fluorescencia en el transfectante pIR-PP1-240 a lo largo del flagelo respecto a la línea control pIR-GFP, donde la señal se restringió al citoplasma celular. Este hecho coincide con la localización de PP1-240 descrita anteriormente en la cepa silvestre (Figura 32). La ausencia de fluorescencia observada en la línea pIR-PP1-240T-GFP puede deberse al estrés celular generado por la sobre-expresión de la subunidad catalítica PP1-240 sin el extremo N-terminal, al igual que ha sido puesto de manifiesto cuando la proteína GFP se expone a estrés oxidativo y pH ácido (Alnuami y col., 2008).

Por otro lado, los estudios *in vitro* mostraron una capacidad infectiva semejante en las líneas pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T con respecto a la observada en la línea control pIR (Figura 40). Estos resultados se correlacionan con la ausencia de sobre-expresión de las proteínas PP1-240 y PP1-240T en los respectivos promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T cuando se encuentran en fase estacionaria (Figura 38). No obstante, se advirtió un descenso en el número de amastigotes por célula en ambas líneas respecto a los promastigotes control (Figura 40-B). Estos resultados sugieren una influencia de las PP1-240 y PP1-240T sobre la viabilidad celular de los amastigotes. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo ensayos adicionales que confirmen dicha hipótesis puesto que los resultados obtenidos no fueron significativos desde el punto de vista estadístico. Esta observación concuerda con los estudios de infección con la proteína quinasa LmxPk4 de *L. mexicana* donde se detectó un defecto en la división de los amastigotes una vez establecida la infección (Kuhn y Wiese, 2005)

5.4.2.- Análisis funcional mediante RNA-Seq de la proteína PP1-240 a partir de las líneas *knock-in* pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T.

El ensayo de RNA-Seq llevado a cabo a partir de la línea *knock-in* pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T durante los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento de promastigotes de cultivo axénico ha puesto de manifiesto la expresión diferencial de 103 y 92 genes (Tablas 15 y 24), respectivamente. En ambos casos más del 80% de los genes diferencialmente expresados se detectaron a día 1 (Figuras 47 y 51). Estos resultados se correlacionan con los elevados niveles de ARNm y proteína descritos anteriormente en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T a día 1. Cabe destacar que a pesar de que el análisis por RNA-Seq reveló la sobre-expresión de PP1-240 y PP1-240T en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento, la tasa de variación fue 4 y 2,5 veces superior a día 1 respecto al resto de los días analizados en los correspondientes transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T (Tablas 23 y 31). Por tanto, estas evidencias justificarían que la mayoría de los genes diferencialmente expresados sean detectados principalmente a día 1. Por otro lado, se ha observado que la sobre-expresión de las proteínas PP1-240 y PP1-240T conduce a una alteración de los perfiles de expresión génica en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-

240T con predominio de la sub-expresión en más del 85% de los genes diferencialmente expresados (Figuras 47 y 51).

De acuerdo a los términos de GO anotados y el análisis de enriquecimiento funcional (Figuras 48, 49, 52 y 53), los genes diferencialmente expresados tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T se relacionan fundamentalmente con los procesos biológicos de expresión génica, traducción, transporte de moléculas y actividades metabólicas. Sin embargo, algunos procesos metabólicos observados en pIR-PP1-240, como los procesos metabólicos de pteridina, no se detectaron en pIR-PP1-240T, mientras que otros como los procesos metabólicos de riboflavina o el transporte de iones metálicos son propios del transfectante pIR-PP1-240T. Estos resultados ponen de manifiesto ciertas diferencias entre los perfiles de expresión génica de los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T.

Ente los genes diferencialmente expresados relacionados con la regulación de la expresión génica a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240 (Figura X), destacan la histona H3 y la ARNpol II. En *L. infantum*, se ha descrito que la síntesis de histonas se encuentra íntimamente ligada a la replicación de ADN, pudiendo existir un mecanismo de regulación de expresión génica de histonas a nivel post-traduccional (Soto y col., 1996; Soto y col., 1997, 2000). En el caso concreto de la histona H3, se ha observado que los niveles de transcrito descienden cuando los promastigotes entran en fase estacionaria, sugiriendo un modo de regulación asociado a la proliferación celular (Soto y col., 1996). En vertebrados, se ha descrito que la subunidad reguladora RepoMan en asociación con PP1 γ media la defosforilación de la histona H3 al final de la mitosis y regula la acción de la quinasa Aurora B en los cromosomas (Qian y col., 2011). Además, la descondensación de los cromosomas en levaduras y nematodos parece estar asociada con la defosforilación de la histona H3 (Hsu y col., 2000). También, se ha observado la fosforilación de la histona H3 en otros protozoos como *P. falciparum*, agente causal de la malaria cerebral (Dastidar y col., 2013). Todas estas evidencias sugieren que la histona H3 podría constituir un sustrato de acción para las PP1 *L. infantum*. En cuanto a la ARNpol II, estudios realizados en organismos multicelulares han reflejado que la subunidad reguladora PNUITS actúa en asociación con PP1 controlando el nivel de fosforilación del extremo C-terminal de la polimerasa y permitiendo una expresión génica adecuada para el correcto desarrollo de los organismos (Ciurciu y col., 2013). En *T. brucei*, se ha descrito que la ARNpol II y cuatro isoformas de PP1 dispuestas en tándem derivan de la misma unidad de transcripción, pudiendo existir una asociación funcional entre ambas enzimas (Evers y Cornelissen, 1990). Por ello, la sub-expresión de la ARNpol II podría estar vinculada con la actividad fosfatasa de las proteínas PP1 en *L. infantum*. Asimismo, cabe destacar la sub-expresión a día 1 de la subunidad RRP41B del exosoma tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T. Esta proteína forma parte del complejo del exosoma en *Trypanosoma* spp., implicado en el procesamiento del ARNr 5,8S, y es esencial para la viabilidad celular (Estevez y col., 2001).

En relación con la traducción, se han identificado al menos 10 genes codificantes de diferentes subunidades estructurales de los ribosomas que se encuentran sub-

Discusión

expresados a día 1 en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. De acuerdo a estudios previos llevados a cabo en organismos eucariotas, la fosforilación reversible de proteínas está implicada en los mecanismos de regulación de la traducción, estando descrita la interacción de las PP1 con diferentes proteínas ribosomales como S6 y L5 (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004). También están sub-expresados a día 1 varios genes relacionados con la modificación post-traducciona de proteínas como la Dol-PP-Pasa asociada a la N-glicosilación en pIR-PP1-240 ó la subunidad ARD1 y la proteína transmembrana PPSCMT, relacionadas con los respectivos procesos de acetilación y metilación en pIR-PP1-240T. Además, se han hallado sub-expresados a día 1, tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T, los genes codificantes de las proteínas FKBP y RING, vinculados a procesos de plegamiento y estabilidad de proteínas. En este último grupo también se incluye la endopeptidasa MPM67 sub-expresada en pIR-PP1-240 a día 1. Dichos resultados se correlacionan con los estudios de fosfoproteómica realizados en *Leishmania*, que sugieren la importancia de la fosforilación como mecanismo de control asociado a los procesos de inicio de la traducción, modificaciones post-traduccionales y degradación de las proteínas (Morales y col., 2008; Hem y col., 2010; Morales y col., 2010; Tsigankov y col., 2013). Las proteínas implicadas en la regulación traduccional y post-traducciona de la expresión génica juegan un papel muy importante en la biología de estos parásitos ya que carecen de mecanismos de regulación transcripcional (revisado por Clayton y Shapira, 2007).

Por otro lado, al menos cuatro genes precursores de proteínas de membrana se encuentran sub-expresados en pIR-PP1-240. Entre ellos figuran tres transportadores de moléculas: un transportador de ácidos tricarbóxicos (DTC) y un transportador mitocondrial asociado a fosfato (mPCP) a día 1, así como un transportador tipo ABC1 a día 3. El cuarto gen corresponde con la proteína transmembrana tuzina. Aunque se desconoce el papel que desempeña esta proteína en tripanosomátidos, estudios en animales de experimentación han revelado que tiene propiedades inmunogénicas (Lakshmi y col., 2014). Asimismo, se ha establecido una asociación evolutiva entre la tuzina y la proteína de superficie δ -amastina de *Leishmania*, lo que sugiere la existencia de una relación funcional entre ambas familias de genes (Jackson, 2010). Teniendo en cuenta que las PP1 participan en la regulación de diferentes receptores de membrana, canales y bombas iónicas (revisado por Ceulemans y Bollen, 2004), es posible que la proteína PP1-240 esté implicada en el control de la actividad de los transportadores de membrana citados así como de la proteína tuzina de función desconocida. Cabe destacar que los genes DTC y tuzina así como una proteína tipo SNARE, también se encuentran sub-expresados a día 1 en el transfectante pIR-PP1-240T, lo que sugiere la posible vinculación entre el estado de fosforilación y las PP1 de dichas proteínas.

Varios genes relacionados con los procesos de diferenciación del parásito se encuentran sub-expresados en el transfectante pIR-PP1-240. Entre ellos se incluyen los genes SHERP y META1, codificantes de proteínas características de promastigotes metacíclicos (Uliana y col., 1999; Knuepfer y col., 2001). La posible vinculación entre la fosforilación y el proceso de metaciclo génesis fue puesto de manifiesto previamente en un

estudio de *L. amazonensis* basado en la detección de la actividad quinasa A. (Genestra y col., 2004). Además, se ha hallado sub-expresado a día 5 el gen codificante de la proteína ATG8. Estas proteínas han sido observadas en autofagosomas durante la diferenciación de *L. major* (Besteiro y col., 2006). Igualmente, cabe destacar la sub-expresión a día 1 del gen precursor de la proteína Endo G, una nucleasa mitocondrial asociada a los procesos de apoptosis celular de tripanosomátidos. No obstante, dicha enzima podría estar también implicada en el desarrollo de *Leishmania* como indican las menores tasas de crecimiento e infectividad detectadas en hemi-*knockouts* de *L. infantum* (Rico y col., 2014). Estas observaciones son consistentes con estudios previos llevados a cabo en tripanosomátidos, donde se relaciona la actividad quinasa y fosfatasa con los procesos de diferenciación del parásito (Eriksson y col., 1992; Li y Donelson, 1995; Grellier y col., 1999; Orr y col., 2000; Kuhn y Wiese, 2005; Allocco y col., 2006; Banerjee y col., 2006; Li y col., 2006). Asimismo, se encuentran sub-expresados a día 1, tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T, los genes codificantes de las proteínas Mad2 y *Yippee*, las cuales se asocian con la regulación de la mitosis en organismos eucariotas (Wassmann y col., 2003; Hosono y col., 2010). Como se ha mencionado anteriormente (sección 1.4.3.4), las PP1 desempeñan un papel fundamental en el control del ciclo celular mediante la modulación de la actividad de diversas proteínas reguladoras (revisado por Rebelo y col., 2015). Por tanto, es posible que las PP1 de *L. infantum* también desempeñen una función reguladora durante el ciclo celular del parásito. Esta relación ha sido sugerida en otros tripanosomátidos como *T. brucei*, donde los ensayos con inhibidores específicos de PP1 y PP2A dieron lugar a defectos en la citocinesis y segregación de orgánulos (Das y col., 1994; Washington y col., 2002; Li y col., 2006).

En cuanto al metabolismo de *Leishmania* spp., se ha detectado en pIR-PP1-240 la sub-expresión a día 1 de tres genes relacionados con tres procesos diferentes: HGPRT, implicada en la ruta recuperación de purinas (Shih y col., 1998); HORP, ligada al ciclo del glioxilato (Simon y col., 1978); y PTR1, asociada a la reducción de pteridinas y folatos (Nare y col., 1997). Cabe destacar que los dos primeros procesos tienen lugar en el glicosoma y el tercero en el citoplasma. Las PP1 presentan una gran versatilidad funcional y pueden actuar en diferentes compartimentos celulares dependiendo de las subunidades reguladoras con las que interaccionen (revisado por Cohen, 2002), por lo que es posible la participación de la proteína PP1-240 en los distintos procesos mencionados. PTR1, es una enzima que se encuentra regulada a lo largo del ciclo biológico de *Leishmania*, presentando los mayores niveles de expresión durante la fase logarítmica de la curva de crecimiento (Kumar y col., 2007). Teniendo en cuenta los niveles de sub-expresión detectados para PTR1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 a día 1, es posible que su expresión esté asociada al estado de fosforilación. Además, se ha hallado en el transfectante pIR-PP1-240T la sub-expresión de una riboflavina quinasa a día 1 y una invertasa a día 5, que no han sido detectadas en pIR-PP1-240. Esta última enzima puede desempeñar un papel importante en la supervivencia del parásito ya que representa una vía alternativa para la obtención de energía a partir de la sacarosa extracelular durante el

Discusión

desarrollo de los promastigotes en el interior del hospedador invertebrado (Lyda y col., 2015).

Tres de los seis genes sobre-expresados a día 1 en la línea *knock-in* pIR-PP1-240 codifican para proteínas de función conocida. Dos de ellos, LinJ.34.0840 y LinJ.34.0850, corresponden con dos PP1 incluidas en el *cluster* PP1-34. Estos resultados sostienen la posible relación funcional sugerida para las PP1 codificadas por el *cluster* PP1-34 y la proteína PP1-240 en base a los ensayos de localización subcelular por IFI (Figuras 32 y 33). El tercer gen sobre-expresado corresponde con el gen A2, una proteína característica del estadio amastigote que se asocia con el proceso de diferenciación y la supervivencia del parásito en el hospedador mamífero (Zhang y Matlashewski, 1997). Estudios recientes sugieren que esta proteína se expresa en *Leishmania* spp. en respuesta a estrés celular y que puede jugar un papel importante en la supervivencia del parásito asociado a las elevadas temperaturas que se alcanzan en los órganos viscerales y la típica fiebre de la LV (McCall y Matlashewski, 2010).

Además, en el transfectante pIR-PP1-240T destaca la sobre-expresión a día 3 del gen LinJ.35.3510 codificante de una proteína hipotética con actividad peroxidasa, lo que sugiere un incremento del estrés oxidativo celular asociado a la sobre-expresión de PP1-240T. Se ha descrito que los organismos aeróbicos responden a situaciones de estrés mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que podría estar ocurriendo en pIR-PP1-240T (revisado por Fedoroff, 2006). No obstante, estudios recientes atribuyen a las ROS un nuevo papel como segundos mensajeros en la transducción de señales (revisado por Reczek y Chandel, 2015). Uno de los mejores mecanismos caracterizados, es la modificación de la actividad enzimática por H₂O₂ a través de la oxidación de los grupos tiol de las proteínas (D'Autreaux y Toledano, 2007). Este mecanismo ha sido identificado en la regulación de la función de diferentes fosfatasa como PETN, OTO1B y MAPK (revisado por Reczek y Chandel, 2015). Teniendo en cuenta la presencia de 10 residuos de cisteína en la fosfatasa PP1-240, no podemos descartar una posible vinculación entre el sistema de equilibrio redox celular y la desfosforilación mediada por PP1 en *Leishmania*.

En cuanto al metabolismo del hierro, se ha hallado en la línea *knock-in* pIR-PP1-240T a día 5 la sub-expresión de dos genes codificantes de sendas proteínas de membrana implicadas en la captación de hierro: la reductasa férrica (LFR1), y el transportador de hierro/zinc (LIT1). En *Leishmania*, estas proteínas se encuentran reguladas por la disponibilidad de hierro, estando sobre-expresadas ante la escasez del metal como ocurre en amastigotes intracelulares (Huynh y col., 2006; Flannery y col., 2011). Sin embargo, la homeostasis del hierro celular se encuentra también condicionada por el estrés oxidativo celular (revisado por Bresgen y Eckl, 2015). Esto es debido a la capacidad del hierro para formar radicales hidroxilo altamente reactivos en presencia de H₂O₂. Teniendo en cuenta el posible aumento del estrés oxidativo citado con anterioridad en pIR-PP1-240T, es posible que los genes codificantes de LFR1 y LIT1 se encuentren sub-expresados para limitar la captación de hierro y evitar un incremento del daño celular.

Asimismo, se ha hallado la sub-expresión a día 1, tanto en pIR-PP1-240 como en pIR-PP1-240T, de dos genes precursores de enzimas con potencial redox: una glutarredoxina monotiol ó 1-C-Grx y una selenofosfato sintasa. En organismos eucariotas, la función de las 1-C-Grx se relaciona principalmente con procesos de biogénesis o ensamblaje de centros ferro-sulfurados en la mitocondria (Molina-Navarro y col., 2006) así como con la activación/inactivación de factores de transcripción para controlar el uso y captación de hierro en función de sus niveles celulares. (Muhlenhoff y col., 2010; Hoffmann y col., 2011). En *Trypanosoma* spp., se han identificado tres 1-C-Grx, presentando una de ellas un dominio tipo tiorredoxina con un sitio activo de ditiol (revisado por Comini y col., 2013). Aunque la función de 1-C-Grx no se conoce todavía, se ha descubierto que esta proteína es indispensable para la forma infectiva de *T. brucei* en el hospedador mamífero y que su sobre-expresión influye en la tasa de crecimiento celular cuando se expone el parásito a un ambiente deficiente en hierro o en presencia a H₂O₂ (Comini y col., 2008). Por ello, no podemos descartar una posible asociación de la sub-expresión de 1-C-Grx en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T tanto con la homeostasis del hierro como con el metabolismo redox celular. En cuanto a la selenofosfato sintasa, un estudio mediante ARN de interferencia en *T. brucei* también ha puesto de manifiesto la posible relación de las selenoproteínas con la exposición a largo plazo frente al estrés oxidativo (Costa y col., 2011). Por tanto, ambas enzimas podrían estar reguladas por PP1 en *Leishmania* en relación a un ambiente oxidante.

El análisis comparativo realizado sobre los datos de RNA-Seq revela perfiles de expresión similares a día 1 entre los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Concretamente, el estudio de los conjuntos de genes sub-expresados a día 1 refleja un total de 48 genes comunes (Figuras 56 y 57), incluyendo tanto los genes codificantes de proteínas hipotéticas como los genes precursores de proteínas de función conocida. Estos genes representan más de la mitad de los genes diferencialmente expresados en ambos transfectantes. Por tanto, los perfiles de expresión detectados en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240 indican que la proteína PP1-240 mantiene cierta actividad a pesar de la delección del extremo N-terminal. Asimismo, los resultados sugieren que el extremo N-terminal de la proteína PP1-240 podría tener una función relevante en la interacción con ciertas proteínas reguladoras mientras que en otras, dicha asociación podría llevarse a cabo a través de la superficie de la subunidad catalítica PP1-240, como ha sido puesto de manifiesto para la mayoría de las PP1 descritas (revisado por Heroes y col., 2013).

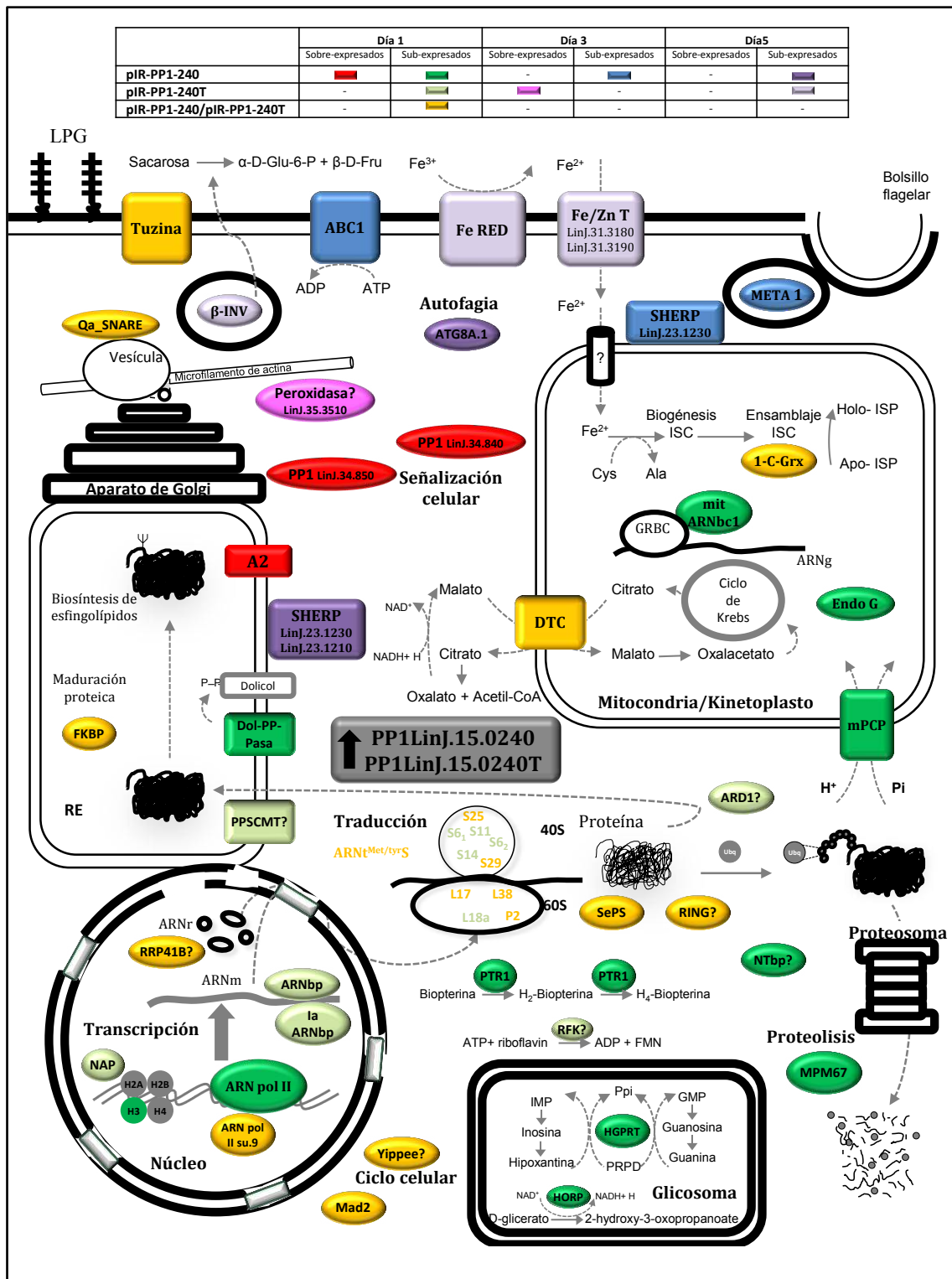


Figura 67. Esquema de los perfiles de expresión génica diferencial de los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Se detallan los genes diferencialmente expresados codificantes de proteínas de función conocida en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T en el periodo de tiempo analizado (días 1, 3 y 5), así como la localización subcelular y relaciones funcionales de las proteínas que codifican.

5.4.3.- Análisis de los niveles de expresión del *cluster* PP1-34 en la línea pIR-PP1C-34 y estudio de la capacidad infectiva.

Para la caracterización funcional del *cluster* PP1-34 se llevó a cabo la generación de la línea celular *knock-in* pIR-PP1C-34 en promastigotes de cultivo axénico. Esta línea sobre-expresa la subunidad catalítica del *cluster* PP1-34, la cual presenta una identidad de secuencia del 98% entre las cuatro proteínas codificadas por el cromosoma 34 (Figura 17).

Los estudios transcriptómicos llevados a cabo por RNA-Seq confirmaron la sobre-expresión de PP1C-34 en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento analizados (Tabla 40). Sin embargo, a diferencia de lo observado en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, no se detectó la sobre-expresión de la proteína PP1C-34 mediante *Western blot* en ningún día de la curva de crecimiento. Como ha sido puesto de manifiesto en la sección 5.4.2., la falta de correlación entre los niveles de transcrito y proteína identificados podría ser consecuencia del estrés celular motivado por la sobre-expresión de PP1C-34 y la posible desfosforilación no controlada de sustratos. De igual modo, no podemos deducir a partir de los resultados obtenidos en el transfectante pIR-PP1C-34 los mecanismos de regulación asociados a la expresión del *cluster* PP1-34 en la cepa *wild type* de *L. infantum*, puesto que las regiones 3'-UTR y 5-UTR derivan de los elementos intergénicos presentes en el vector pIRmcs. Sin embargo, cabe destacar que la proteína PP1C-34 fue detectada por *Western blot* en el transfectante pIR-PP1C-34-GFP como proteína de fusión con GFP en el extremo C-terminal (Figura 39). Estos resultados sugieren que la presencia de GFP podría retrasar la degradación de la proteína PP1C-34 en el transfectante pIR-PP1C-34-GFP. Por otro lado, no fue posible evaluar la localización subcelular de PP1C-34-GFP en promastigotes de *L. infantum* debido a la pérdida de fluorescencia de GFP. Como ha sido discutido con anterioridad en pIR-PP1-240T esto podría estar asociado al estrés celular generado por la sobre-expresión de PP1C-34 (Alnuami y col., 2008).

Los ensayos de infección *in vitro* llevados a cabo a partir de la línea *knock-in* pIR-PP1C-34 reflejaron tasas de infección similares a las observadas en la cepa *wild type* (Figura 41). Estos resultados coinciden con la ausencia de sobre-expresión de PP1C-34 descrita para PP1C-34. No obstante, del mismo modo que ocurre en pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, los resultados numéricos indican una menor tasa de amastigotes por células tras 72 horas de infección. A pesar de la ausencia de significación estadística de estos resultados es posible que la sobre-expresión de las PP1 en estudio interfiera en la viabilidad celular de los amastigotes.

5.4.2.- Análisis funcional mediante RNA-Seq del *cluster* PP1-34 a partir de la línea *knock-in* pIR-PP1C-34.

El estudio por RNA-Seq de la línea celular pIR-PP1C-34 puso de manifiesto la expresión diferencial de 279 genes en los días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento (Tabla 32). Aproximadamente el 95% de los genes diferencialmente expresados se distribuyen uniformemente entre los días 1 y 3 de la curva de crecimiento (Figura 58). Sin embargo,

Discusión

estos resultados no se correlacionan con la tasa de variación descrita para PP1C-34 (Tabla 40), donde se detectó una disminución gradual de los niveles de sobre-expresión a lo largo de la curva de crecimiento. Estos resultados concuerdan con el descenso de la tasa transcripción y de recambio proteico descrita durante el proceso de diferenciación de los promastigotes de *Leishmania* (Kloehn y col., 2015). No obstante, los menores niveles relativos de expresión de PP1C-34 se hallaron a día 5, al igual que un número menor de genes diferencialmente expresados. Además, como ha sido descrito en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T, alrededor del 85% del total de genes diferencialmente expresados en pIR-PP1C-34 se encuentran sub-expresados (Figura 58).

Según los estudios de ontología génica y los análisis de enriquecimiento funcional (Figuras 59, 60 y 61), los genes sub-expresados a día 1 y 3 en el transfectante pIR-PP1C-34 se correlacionan fundamentalmente con procesos biológicos concernientes a la regulación de la expresión génica, traducción, procesos biosintéticos de macromoléculas y plegamiento de proteínas. Dichos procesos se vinculan esencialmente con los componentes celulares del núcleo, ribosomas y mitocondria. Estos resultados muestran un perfil de expresión similar al detallado en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. En diversos ensayos de fosfoproteómica se han identificado variaciones en los perfiles de fosforilación durante el proceso de diferenciación de *Leishmania*, vinculándose dichas modificaciones post-traduccionales principalmente con las funciones celulares de inicio de la traducción, plegamiento de proteínas y catabolismo proteico (Morales y col., 2008; Hem y col., 2010; Morales y col., 2010). No obstante, en el caso de pIR-PP1C-34 destaca también la sobre-expresión de diversos genes relativos al cuerpo basal y al complejo de dineína que se relacionan con la fosforilación de proteínas, movimiento asociado a microtúbulos y citocinesis. Este perfil de expresión, detectado exclusivamente en el transfectante pIR-PP1C-34, coincide con los estudios realizados en células de mamíferos en los que se asocia la actividad fosfatasa tipo 1 con la organización del citoesqueleto (Eriksson y col., 1992). Asimismo, la vinculación entre el control de la citocinesis y el citoesqueleto con la actividad PP1 también ha sido sugerida en *T. cruzi* mediante un ensayo con los inhibidores de PP1 en el que se hallaron defectos en la división celular y la morfología del parásito. (Das y col., 1994; Orr y col., 2000).

El estudio detallado de los genes diferencialmente expresados en pIR-PP1C-34 ha revelado la sub-expresión de numerosos genes previamente detectados en los transfectantes pIR-PP1-240 y pIR-PP1-240T. Entre éstos se encuentran genes de función conocida relacionados con los procesos celulares de la transcripción (NAP, H3, ARNpol II, ARNpol II su.9, ARNbp, laARNbp, RRP41B), traducción (subunidades ribosomales 40S y 60S), ciclo celular (Mad2 y *Yipee*), metabolismo del glioxilato (HORP), equilibrio redox celular (SePs y 1-C-Grx), proteínas de membrana (DTC y tuzina), proteólisis (MPM67) y apoptosis (EndoG) (Figura 56). No obstante, se han identificado algunos genes relativos a la regulación de la expresión génica que no han sido detectados en pIR-PP1-240 ni en pIR-PP1-240T, como los genes codificantes de las proteínas MgN, snoRNP FA, SmD2, PRMT, P2A-Ex, Znf descrios en la sección 4.5.4.4. Esto indica que la actividad de dichas proteínas podría estar regulada de forma exclusiva por las PP1 codificadas por el *cluster*

PP1-34. En lo que respecta al ciclo celular, además de la sub-expresión de Mad2 y Yipee, se encuentra sub-expresado a día 3 el gen DMC1, asociado a los procesos de recombinación homóloga en organismos eucariotas (Bishop y col., 1992). Sin embargo, los estudios realizados en *T. cruzi* no han establecido la vinculación de DMC1 en la reparación del ADN ni en los procesos de recombinación homóloga (Proudfoot y McCulloch, 2006), por lo que se desconoce la funcionalidad de esta proteína en tripanosomátidos.

Además, otros genes relativos al metabolismo de *Leishmania* también se encuentran diferencialmente expresados en el transfectante pIR-PP1C-34. Estos genes están asociados con procesos biosintéticos de ácidos grasos (KAS, HTD2, AGD) y del LPG (LPGR1), el metabolismo del triptófano (nitrilasa) o la cadena de transporte de electrones (Cox 6). Estudios metabólicos han puesto de manifiesto variaciones en las fuentes de energía empleadas por *Leishmania* a lo largo de su ciclo biológico (Opperdoes y Coombs, 2007). Estos datos indican que la fosforilación podría constituir un mecanismo de control metabólico para la adaptación del parásito a las variaciones de nutrientes disponibles en los distintos hospedadores.

Asimismo, se han identificado sub-expresados en pIR-PP1C-34 siete genes referentes a los procesos de plegamiento de proteínas. Entre ellos se han hallado cuatro genes precursores de proteínas con actividad *cis-trans* isomerasa (PAR45, FKBP, CYP4 y CYP8) y tres genes codificantes de proteínas con actividad chaperona (GrpE, PDF6 y HSP). Por el contrario, se encuentra sobre-expresado a día 1 el gen de la proteína A2. Como ha sido descrito con anterioridad en el transfectante pIR-PP1-240, esta proteína podría estar relacionada con la respuesta a estrés celular y el incremento de temperatura asociado a la manifestación visceral de la enfermedad (McCall y Matlashewski, 2010). El aumento de temperatura constituye una señal de estrés ambiental que es esencial para la diferenciación del promastigote a amastigote en el hospedador mamífero (Zilberstein y Shapira, 1994). Por otro lado, las proteínas de choque térmico (HSP) y las chaperonas representan unas proteínas altamente conservadas cuya expresión está regulada en situaciones de estrés celular por factores de transcripción conocidos con HSF (*heat shock transcription factors*) en los organismos eucariotas. A pesar de que las proteínas HSP se encuentran también conservadas en los tripanosomátidos (Folgueira y Requena, 2007), no se han hallado genes precursores de los factores de regulación HSF en estos organismos (Ivens y col., 2005). Sin embargo, la actividad de las chaperonas en *Leishmania* podría estar regulada por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación. Las chaperonas HSP90, HSP70, ST1/HOP y la ciclofilina 40 se hallaron entre las principales fosfoproteínas específicas de amastigote identificadas en un estudio de fosfoproteómica basado en análisis cuantitativo en gel (Morales y col., 2008). Todas estas evidencias sugieren que las PP1 de *Leishmania* podrían representar un elemento regulador de la actividad de las proteínas HSP asociadas a situaciones de estrés celular.

Por otro lado, diversos genes relacionados con el flagelo están sobre o sub-expresados en el transfectante pIR-PP1C-34. En *Leishmania*, el proceso de elongación del flagelo se encuentra íntimamente asociado al ciclo biológico del parásito (revisado por

Discusión

Bates, 2008). Mientras que los amastigotes son no móviles y presentan un flagelo corto no emergente, los promastigotes son móviles y se caracterizan por un largo flagelo cuya longitud se prolonga durante el proceso de diferenciación celular en el vector. Además, el flagelo es un orgánulo esencial para la supervivencia del promastigote en el tracto digestivo del vector (Cuvillier y col., 2003). En tripanosomátidos, los estudios del flagelo se han llevado a cabo fundamentalmente en *T. brucei*, siendo detectadas más de 300 proteínas específicas del flagelo (Broadhead y col., 2006). Sin embargo, el organismo modelo eucariota empleado para el estudio del flagelo es *Chlamidomonas reinhardtii*, a partir del cual se han podido identificar aproximadamente 360 proteínas relacionadas con la regulación de la longitud flagelar (Pazour y col., 2005). En el transfectante pIR-PP1C-34, seis genes codificantes de proteínas motoras de las familias de las dineínas y las quinesinas están diferencialmente expresadas en los días 1 y 3 de la curva de crecimiento. El ensamblaje y mantenimiento del flagelo requiere un transporte intraflagelar continuo de proteínas, donde las quinesinas y dineínas juegan un papel esencial asociado a los movimientos bidireccionales a lo largo del flagelo (Evans y col., 2006; Engel y col., 2009). La regulación de la actividad motora de las dineínas a través del estado de fosforilación ha sido puesto de manifiesto en *C. reinhardtii* (Yang y Sale, 2000). En lo que respecta a *Leishmania*, el desarrollo de mutantes nulos del gen *LmxDHC2.2*, codificante de una cadena pesada de dineína tipo 2, ha confirmado la implicación de esta proteína en el proceso de ensamblaje y morfología flagelar de *L. mexicana*, dada la aparición de promastigotes redondeados, no móviles y la pérdida de estructuras flagelares (Adhiambo y col., 2005). Además, la proteína K39, hallada sobre-expresada a día 3 en el transfectante pIR-PP1C-34, es una quinesina asociada a la manifestación visceral de la leishmaniasis (Burns y col., 1993). Aunque aún se desconoce su función, K39 se acumula en los polos celulares y presenta una distribución periférica, coincidiendo con el citoesqueleto cortical de *Leishmania* (Gerald y col., 2007). Asimismo, se han detectado diferencialmente expresados otros cinco genes codificantes de proteínas vinculadas a la región flagelar. Entre ellas, se encuentra sobre-expresada a día 1 la proteína con dominio C ó CC2D. Esta proteína representa un componente del cuerpo basal y zona de anclaje flagelar en *T. brucei*, cuya actividad se relaciona con el proceso de ensamblaje del flagelo (Zhou y col., 2011). También se han hallado sobre-expresados a día 3, dos genes codificantes de proteínas de anclaje a la zona flagelar o FAZP, las cuales están íntimamente asociadas con la región del bolsillo flagelar en *Leishmania* (Wheeler y col., 2016). El factor 3 de ribosilación (ARL-3A) y un ortólogo del autoantígeno nuclear responsable del Síndrome de Sjögren primario (SSNA1) están sub-expresados a día 3. En mamíferos, la proteína ARL-3A, miembro de la superfamilia Ras, está implicada en la polimerización de tubulina y estabilidad del citoesqueleto (Zhou y col., 2006). Además, se ha observado que ciertas mutaciones en ARL-3A afectan a la longitud flagelar en diferentes especies de *Leishmania* y *Crithidia* (Cuvillier y col., 2000). Por su parte, el ortólogo de SSNA1 en *C. reinhardtii* es reconocido como una proteína asociada al mecanismo de deflagelación denominada DIP13 y se localiza próximo a los microtúbulos del axonema, cuerpo basal y citoplasma (Pfannenschmid y col., 2003; Schoppmeier y col., 2005). En *T. brucei*, se ha observado que la proteína homóloga *TbDP13* colocaliza parcialmente con tubulina α acetilada (Price y

col., 2012). Teniendo en cuenta el perfil de expresión descrito, es posible que el *cluster* PP1-34 participe como elemento regulador durante el proceso de ensamblaje flagelar de *L. infantum*. Esta hipótesis es sostenida por la localización subcelular descrita para el *cluster* PP1C-34 en el bolsillo flagelar durante el estadio promastigote (Figura 33).

Por otro lado, se han hallado diferencialmente expresados cuatro genes codificantes de proteína quinasas a día 1 y día 5. Aunque apenas se conoce el mecanismo que regula el proceso de elongación del flagelo en organismos eucariotas, la detección de más de 80 proteínas flagelares fosforiladas en *C. reinhardtii* sugiere que la fosforilación/desfosforilación de proteínas podría presentar un papel clave en el control de dicho proceso (Wagner y col., 2006). Asimismo, se han identificado diferentes fosfatasa y quinasas con localización flagelar, lo que sostiene el estado de fosforilación proteico como mecanismo de control flagelar (Yang y col., 2000; Yang y Sale, 2000; Pazour y col., 2005). En *L. mexicana*, la delección del gen *LmxMCK* y *LmxMPK3*, codificantes de sendas MAPK, dio lugar a promastigotes con un flagelo acortado (Wiese y col., 2003; Erdmann y col., 2006), mientras que los mutantes nulos de *LmxMPK9* condujeron a la aparición de formas con un flagelo elongado (Bengs y col., 2005). Por tanto, las quinasas diferencialmente expresadas en pIR-PP1C-34 podrían corresponder con proteínas flagelares asociadas al proceso de elongación del flagelo. Además, la calmodulina, una enzima implicada con las transducción de señales está sub-expresada a día 3.

En resumen, los genes diferencialmente expresados debido a la sobre-expresión de las PP1 en estudio podrían corresponder con sustratos específicos, unidades de dirección o inhibidores de PP1. Además, teniendo en cuenta que la desfosforilación de proteínas puede inducir una activación enzimática (revisado por Bollen y col., 2010), es posible que el perfil de sub-expresión detectado en las diferentes líneas *knock-in* represente un mecanismo para contrarrestar la estimulación funcional de las proteínas promovida por la alteración de su estado de fosforilación. Por otro lado, el mecanismo de interacción de las PIP a través de la superficie proteica conservada de la región catalítica de las PP1, justificaría la identificación de 45 genes comunes en las tres líneas *knock-in* generadas. Asimismo, los perfiles de expresión génica analizados sugieren la participación de estas enzimas principalmente en procesos celulares relacionados con la regulación de la expresión génica, modificaciones post-traduccionales de proteínas, ciclo celular y citoesqueleto, entre otras. Por tanto, estos resultados representan un avance en el conocimiento sobre la funcionalidad de las PP1 en *L. infantum*. Además, teniendo en cuenta los avances científicos realizados en los últimos años (Peti y Page, 2015), las PP1 y los posibles sustratos de interacción identificados podrían representar potenciales dianas de acción en el área de la terapéutica clínica frente a la leishmaniasis. Futuros ensayos basados en el estudio del interactoma de las PP1 en *L. infantum* podrían contribuir a la identificación de tales dianas farmacológicas para el tratamiento de la leishmaniasis.

6. CONCLUSIONES

- 1.- La secuencia de aminoácidos de las proteína-fosfatasas del *cluster* PP1-34 está más conservada en la escala evolutiva que la proteína fosfatasa PP1-240. Dentro del género *Leishmania*, la identidad de secuencia es superior al 90% en ambos casos.
- 2.- Los niveles de ARNm de los genes codificantes de PP1-240 y del *cluster* PP1-34 analizados en promastigotes y amastigotes en cultivo *in vitro* revelan una expresión regular a lo largo de los procesos de diferenciación del ciclo biológico de *L. infantum*. Los genes LinJ.15.0240, LinJ.34.0820 y LinJ.34.0850 están sobre-expresados en promastigotes obtenidos del vector *P. perniciosus* respecto a promastigotes metacíclicos PNA⁻.
- 3.- Los niveles de la proteína PP1-240 son constantes a lo largo de la curva de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico y son superiores en amastigotes intracelulares que en amastigotes axénicos. En el caso del *cluster* PP1-34 los niveles de proteína aumentan en la fase estacionaria de promastigotes en cultivo axénico.
- 4.- La proteína PP1-240 se localiza en el flagelo de los promastigotes de *L. infantum*, mientras que las codificadas por el *cluster* PP1-34 se limitan al bolsillo flagelar.
- 5.- El descenso drástico de las proteína-fosfatasas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34 a niveles basales tras 24-48 horas de cultivo en las correspondientes líneas *knock-in* de *L. infantum* indica la importancia de estas proteínas como enzimas reguladoras.
- 6.- La sobre-expresión de las proteína-fosfatasas PP1-240, PP1-240T y PP1C-34 induce alteraciones de los perfiles de expresión génica en las líneas *knock-in* correspondientes, con un predominio de la sub-expresión en el 85% de los genes diferencialmente expresados. Estos genes se relacionan principalmente con procesos relacionados con la expresión génica, las modificaciones post-traduccionales de proteínas, el ciclo celular y las proteínas de membrana.
- 7.- La sobre-expresión de las proteína-fosfatasas en las líneas *knock-in* pIR-PP1-240, pIR-PP1-240T y pIR-PP1C-34 induce estrés celular de acuerdo a la sobre-expresión del gen A2 en las líneas pIR-PP1-240 y pIR-PP1C-34 y la sobre-expresión de la peroxidasa LinJ.35.3510 en la línea pIR-PP1-240T.
- 8.- La sobre-expresión de la proteína PP1C-34 afecta a procesos relacionados con el citoesqueleto, el flagelo y la señalización celular.
- 9.- El extremo N-terminal de la proteína PP1-240 está relacionado probablemente con la metacicloogénesis, debido a la sub-expresión de los genes SHERP y META1 inducida únicamente en presencia del mismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Absalon S., Blisnick T., Bonhivers M., Kohl L., Cayet N., Toutirais G., Buisson J., Robinson D., Bastin P. (2008). Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **121**, 3704-16.
- Adhiambo C., Forney J.D., Asai D.J., LeBowitz J.H. (2005). The two cytoplasmic dynein-2 isoforms in *Leishmania mexicana* perform separate functions. *Mol Biochem Parasitol* **143**, 216-25.
- Akhoundi M., Kuhls K., Cannet A., Votypka J., Marty P., Delaunay P., Sereno D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004349.
- Akopyants N.S., Matlib R.S., Bukanova E.N., Smeds M.R., Brownstein B.H., Stormo G.D., Beverley S.M. (2004). Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **136**, 71-86.
- Alcolea P.J. (2010). Análisis de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de *Leishmania infantum* mediante microarrays de ADN. In: *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I*. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de biología.
- Alcolea P.J., Alonso A., Degayon M.A., Moreno-Paz M., Jimenez M., Molina R., Larraga V. (2016a). In vitro infectivity and differential gene expression of *Leishmania infantum* metacyclic promastigotes: negative selection with peanut agglutinin in culture versus isolation from the stomodeal valve of *Phlebotomus perniciosus*. *BMC Genomics* **17**, 375.
- Alcolea P.J., Alonso A., Dominguez M., Parro V., Jimenez M., Molina R., Larraga V. (2016b). Influence of the Microenvironment in the Transcriptome of *Leishmania infantum* Promastigotes: Sand Fly versus Culture. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004693.
- Alcolea P.J., Alonso A., Gomez M.J., Moreno I., Dominguez M., Parro V., Larraga V. (2010a). Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. *Int J Parasitol* **40**, 1497-516.
- Alcolea P.J., Alonso A., Gomez M.J., Postigo M., Molina R., Jimenez M., Larraga V. (2014). Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*: from the foregut of *Phlebotomus perniciosus* to the human phagocyte. *BMC Genomics* **15**, 849.
- Alcolea P.J., Alonso A., Gomez M.J., Sanchez-Gorostiaga A., Moreno-Paz M., Gonzalez-Pastor E., Torano A., Parro V., Larraga V. (2010b). Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics* **11**, 31.
- Alcolea P.J., Alonso A., Larraga V. (2011). Proteome profiling of *Leishmania infantum* promastigotes. *J Eukaryot Microbiol* **58**, 352-8.
- Alcolea P.J., Alonso A., Moreno-Izquierdo M.A., Degayon M.A., Moreno I., Larraga V. (2016c). Serum Removal from Culture Induces Growth Arrest, Ploidy Alteration, Decrease in Infectivity and Differential Expression of Crucial Genes in *Leishmania infantum* Promastigotes. *PLoS One* **11**, e0150172.
- Alcolea P.J., Alonso A., Sanchez-Gorostiaga A., Moreno-Paz M., Gomez M.J., Ramos I., Parro V., Larraga V. (2009). Genome-wide analysis reveals increased levels

Bibliografía

- of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics* **93**, 551-64.
- Alessi D.R., Street A.J., Cohen P., Cohen P.T. (1993). Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem* **213**, 1055-66.
- Alexander D.R. (1990). The role of phosphatases in signal transduction. *New Biol* **2**, 1049-62.
- Alnuami A.A., Zeedi B., Qadri S.M., Ashraf S.S. (2008). Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. *Int J Biol Macromol* **43**, 182-6.
- Alvar J. (2001). *Las leishmaniasis : de la biología al control*. Laboratorios Intervet, Salamanca.
- Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Den Boer M., Canavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Ter Horst R., Lopez-Velez R., Moreno J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**, 334-59, table of contents.
- Alvar J., Canavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* **57**, 1-88.
- Alvar J., Croft S., Olliario P. (2006). Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Advances in Parasitology* **61**, 223-74.
- Alvar J., Velez I.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., den Boer M., Team W.H.O.L.C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**, e35671.
- Alzate J.F., Alvarez-Barrientos A., Gonzalez V.M., Jimenez-Ruiz A. (2006). Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* **11**, 161-71.
- Allen P.B., Kwon Y.G., Nairn A.C., Greengard P. (1998). Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *J Biol Chem* **273**, 4089-95.
- Allocco J.J., Donald R., Zhong T., Lee A., Tang Y.S., Hendrickson R.C., Liberator P., Nare B. (2006). Inhibitors of casein kinase 1 block the growth of *Leishmania major* promastigotes in vitro. *Int J Parasitol* **36**, 1249-59.
- Ammerman M.L., Downey K.M., Hashimi H., Fisk J.C., Tomasello D.L., Faktorova D., Kafkova L., King T., Lukes J., Read L.K. (2012). Architecture of the trypanosome RNA editing accessory complex, MRB1. *Nucleic Acids Res* **40**, 5637-50.
- Andreassen P.R., Lacroix F.B., Villa-Moruzzi E., Margolis R.L. (1998). Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **141**, 1207-15.
- Angerer H. (2013). The superfamily of mitochondrial Complex1_LYR motif-containing (LYRM) proteins. *Biochem Soc Trans* **41**, 1335-41.
- Arce A., Estirado A., Ordobas M., Sevilla S., Garcia N., Moratilla L., de la Fuente S., Martinez A.M., Perez A.M., Aranguéz E., Iriso A., Sevillano O., Bernal J., Vilas F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* **18**, 20546.
- Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., Brestelli J., Brunk B.P., Carrington M., Depledge D.P., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gardner M.J., Gingle A., Grant G., Harb O.S., Heiges M., Hertz-Fowler C., Houston R., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J.C., Kraemer E., Li W., Logan F.J., Miller J.A., Mitra S., Myler P.J.,

- Nayak V., Pennington C., Phan I., Pinney D.F., Ramasamy G., Rogers M.B., Roos D.S., Ross C., Sivam D., Smith D.F., Srinivasamoorthy G., Stoeckert C.J., Jr., Subramanian S., Thibodeau R., Tivey A., Treatman C., Velarde G., Wang H. (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* **38**, D457-62.
- Banerjee C., Sarkar D., Bhaduri A. (1999). Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein phosphatase from *Leishmania donovani*. *Parasitology* **118 (Pt 6)**, 567-73.
- Banerjee S., Sen A., Das P., Saha P. (2006). *Leishmania donovani* cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. *FEMS Microbiol Lett* **256**, 75-82.
- Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P., Ferrer L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* **24**, 324-30.
- Baneth G., Shaw S.E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* **106**, 315-24.
- Bañuls A.L., Hide M., Prugnolle F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* **64**, 1-109.
- Barker H.M., Brewis N.D., Street A.J., Spurr N.K., Cohen P.T. (1994). Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta* **1220**, 212-8.
- Barton G.J., Cohen P.T., Barford D. (1994). Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem* **220**, 225-37.
- Bates P.A. (1993). Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today* **9**, 143-6.
- Bates P.A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol* **11**, 340-4.
- Bates P.A., Robertson C.D., Tetley L., Coombs G.H. (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* **105 (Pt 2)**, 193-202.
- Bengs F., Scholz A., Kuhn D., Wiese M. (2005). LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* **55**, 1606-15.
- Bente M., Harder S., Wiesgigl M., Heukeshoven J., Gelhaus C., Krause E., Clos J., Bruchhaus I. (2003). Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* **3**, 1811-29.
- Berens R.L., Marr J.J. (1978). An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol* **64**, 160.
- Berman J.D., Gallalee J.V., Best J.M. (1987). Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* **36**, 197-201.
- Bern C., Adler-Moore J., Berenguer J., Boelaert M., den Boer M., Davidson R.N., Figueras C., Gradoni L., Kafetzis D.A., Ritmeijer K., Rosenthal E., Royce C., Russo R., Sundar S., Alvar J. (2006). Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **43**, 917-24.
- Berndt N., Cohen P.T. (1990). Renaturation of protein phosphatase 1 expressed at high levels in insect cells using a baculovirus vector. *Eur J Biochem* **190**, 291-7.

Bibliografia

- Besteiro S., Williams R.A., Morrison L.S., Coombs G.H., Mottram J.C. (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem* **281**, 11384-96.
- Bishop D.K., Park D., Xu L., Kleckner N. (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439-56.
- Blum J.J., Opperdoes F.R. (1994). Secretion of sucrase by *Leishmania donovani*. *J Eukaryot Microbiol* **41**, 228-31.
- Boggiatto P.M., Gibson-Corley K.N., Metz K., Gallup J.M., Hostetter J.M., Mullin K., Petersen C.A. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1019.
- Bollen M. (2001). Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* **26**, 426-31.
- Bollen M., Peti W., Ragusa M.J., Beullens M. (2010). The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* **35**, 450-8.
- Bonhivers M., Nowacki S., Landrein N., Robinson D.R. (2008). Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol* **6**, e105.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. (2006). High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 15**, Unit 15.8.
- Boucher N., Wu Y., Dumas C., Dube M., Sereno D., Breton M., Papadopoulou B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* **277**, 19511-20.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brautigan D.L. (2013). Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J* **280**, 324-45.
- Brenchley R., Tariq H., McElhinney H., Szoor B., Huxley-Jones J., Stevens R., Matthews K., Taberner L. (2007). The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* **8**, 434.
- Brennicke A., Marchfelder A., Binder S. (1999). RNA editing. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 297-316.
- Bresgen N., Eckl P.M. (2015). Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules* **5**, 808-47.
- Bringaud F., Muller M., Cerqueira G.C., Smith M., Rochette A., El-Sayed N.M., Papadopoulou B., Ghedin E. (2007). Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. *PLoS Pathog* **3**, 1291-307.
- Broadhead R., Dawe H.R., Farr H., Griffiths S., Hart S.R., Portman N., Shaw M.K., Ginger M.L., Gaskell S.J., McKean P.G., Gull K. (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440**, 224-7.
- Browne G.J., Delibegovic M., Keppens S., Stalmans W., Cohen P.T. (2001). The level of the glycogen targeting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats. *Biochem J* **360**, 449-59.

- Browne G.J., Fardilha M., Oxenham S.K., Wu W., Helps N.R., da Cruz E.S.O.A., Cohen P.T., da Cruz E.S.E.F. (2007). SARP, a new alternatively spliced protein phosphatase 1 and DNA interacting protein. *Biochem J* **402**, 187-96.
- Burns J.M., Jr., Parsons M., Rosman D.E., Reed S.G. (1993). Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* **268**, 17155-61.
- Burri L., Varlamov O., Doege C.A., Hofmann K., Beilharz T., Rothman J.E., Sollner T.H., Lithgow T. (2003). A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9873-7.
- Calandra T., Roger T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 791-800.
- Cavalier-Smith T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* **73**, 203-66.
- Ceulemans H., Bollen M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* **84**, 1-39.
- Ceulemans H., Stalmans W., Bollen M. (2002). Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* **24**, 371-81.
- Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* **141**, 539-43.
- Ciurciu A., Duncalf L., Jonchere V., Lansdale N., Vasieva O., Glenday P., Rudenko A., Vissi E., Cobbe N., Alphey L., Bennett D. (2013). PNUTS/PP1 regulates RNAPII-mediated gene expression and is necessary for developmental growth. *PLoS Genet* **9**, e1003885.
- Clayton C., Shapira M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* **156**, 93-101.
- Clementi A., Battaglia G., Floris M., Castellino P., Ronco C., Cruz D.N. (2011). Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature. *NDT Plus* **4**, 147-52.
- Cohen-Freue G., Holzer T.R., Forney J.D., McMaster W.R. (2007). Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **37**, 1077-86.
- Cohen P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508.
- Cohen P.T. (1988). Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett* **232**, 17-23.
- Cohen P.T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-51.
- Cohen P.T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-56.
- Comini M.A., Krauth-Siegel R.L., Bellanda M. (2013). Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes. *Antioxid Redox Signal* **19**, 708-22.
- Comini M.A., Rettig J., Dirdjaja N., Hanschmann E.M., Berndt C., Krauth-Siegel R.L. (2008). Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *J Biol Chem* **283**, 27785-98.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M., Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674-6.
- Connor J.H., Kleeman T., Barik S., Honkanen R.E., Shenolikar S. (1999). Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for

Bibliografia

- inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem* **274**, 22366-72.
- Connor J.H., Weiser D.C., Li S., Hallenbeck J.M., Shenolikar S. (2001). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* **21**, 6841-50.
- Cortes S., Afonso M.O., Alves-Pires C., Campino L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerg Infect Dis* **13**, 1431-2.
- Costa F.A., Goto H., Saldanha L.C., Silva S.M., Sinhorini I.L., Silva T.C., Guerra J.L. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* **40**, 677-84.
- Costa F.C., Oliva M.A., de Jesus T.C., Schenkman S., Thiemann O.H. (2011). Oxidative stress protection of Trypanosomes requires selenophosphate synthase. *Mol Biochem Parasitol* **180**, 47-50.
- Croft S.L., Yardley V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* **8**, 319-42.
- Cruz I., Morales M., Noguer I., Rodríguez A., Alvar J. (2002). Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* **359**, 1124-5.
- Cruz I., Nieto J., Moreno J., Canavate C., Desjeux P., Alvar J. (2006). Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* **123**, 357-88.
- Cuvillier A., Miranda J.C., Ambit A., Barral A., Merlin G. (2003). Abortive infection of Lutzomyia longipalpis insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing Leishmania amazonensis parasites. *Cell Microbiol* **5**, 717-28.
- Cuvillier A., Redon F., Antoine J.C., Chardin P., DeVos T., Merlin G. (2000). LdARL-3A, a Leishmania promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity. *J Cell Sci* **113** (Pt 11), 2065-74.
- Cyert M.S., Thorner J. (1989). Putting it on and taking it off: phosphoprotein phosphatase involvement in cell cycle regulation. *Cell* **57**, 891-3.
- Chakraborty A., Sen B., Datta R., Datta A.K. (2004). Isomerase-independent chaperone function of cyclophilin ensures aggregation prevention of adenosine kinase both in vitro and under in vivo conditions. *Biochemistry* **43**, 11862-72.
- Chang K.P., Dwyer D.M. (1976). Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* **193**, 678-80.
- Chappuis F., Sundar S., Hailu A., Ghalib H., Rijal S., Peeling R.W., Alvar J., Boelaert M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**, 873-82.
- Choi C.M., Lerner E.A. (2001). Leishmaniasis as an emerging infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* **6**, 175-82.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Chulay J.D., Fleckenstein L., Smith D.H. (1988). Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**, 69-72.
- D'Autreaux B., Toledano M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 813-24.
- da Cruz e Silva E., Fox C., Ouimet C., Gustafson E., Watson S., Greengard P. (1995). Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *The Journal of Neuroscience* **15**, 3375-89.

- da Silva R., Sacks D.L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* **55**, 2802-6.
- Das A., Gale M., Jr., Carter V., Parsons M. (1994). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces defects in cytokinesis and organellar genome segregation in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**, 3477-83.
- Dastidar E.G., Dzeyk K., Krijgsveld J., Malmquist N.A., Doerig C., Scherf A., Lopez-Rubio J.J. (2013). Comprehensive histone phosphorylation analysis and identification of Pf14-3-3 protein as a histone H3 phosphorylation reader in malaria parasites. *PLoS One* **8**, e53179.
- David C.V., Craft N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy* **22**, 491-502.
- de Freitas E., Melo M.N., da Costa-Val A.P., Michalick M.S. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* **137**, 159-67.
- De Pablos L.M., Ferreira T.R., Walrad P.B. (2016). Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. *Curr Opin Microbiol* **34**, 82-9.
- Debrabant A., Joshi M.B., Pimenta P.F., Dwyer D.M. (2004). Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *Int J Parasitol* **34**, 205-17.
- Dell K.R., Engel J.N. (1994). Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **64**, 283-92.
- Dereure J., El-Safi S.H., Bucheton B., Boni M., Kheir M.M., Davoust B., Pratlong F., Feugier E., Lambert M., Dessein A., Dedet J.P. (2003). Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes Infect* **5**, 1103-8.
- Desjeux P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**, 239-43.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**, 305-18.
- Desjeux P., Alvar J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**, 3-15.
- Dey A., Singh S. (2006). Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**, 165-70.
- Dillon L.A., Okrah K., Hughitt V.K., Suresh R., Li Y., Fernandes M.C., Belew A.T., Corrada Bravo H., Mosser D.M., El-Sayed N.M. (2015). Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. *Nucleic Acids Res* **43**, 6799-813.
- Docampo R., Moreno S.N. (1999). Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today* **15**, 443-8.
- Dohadwala M., da Cruz e Silva E.F., Hall F.L., Williams R.T., Carbonaro-Hall D.A., Nairn A.C., Greengard P., Berndt N. (1994). Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6408-12.
- Egloff M.P., Cohen P.T., Reinemer P., Barford D. (1995). Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* **254**, 942-59.
- El-Sayed N.M., Myler P.J., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., Renauld H., Worthey E.A., Hertz-Fowler C., Ghedin E., Peacock C., Bartholomeu D.C., Haas B.J., Tran A.N., Wortman J.R., Alsmark U.C.,

Bibliografia

- Angiuoli S., Anupama A., Badger J., Bringaud F., Cadag E., Carlton J.M., Cerqueira G.C., Creasy T., Delcher A.L., Djikeng A., Embley T.M., Hauser C., Ivens A.C., Kummerfeld S.K., Pereira-Leal J.B., Nilsson D., Peterson J., Salzberg S.L., Shallom J., Silva J.C., Sundaram J., Westenberger S., White O., Melville S.E., Donelson J.E., Andersson B., Stuart K.D., Hall N. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309**, 404-9.
- Engel B.D., Ludington W.B., Marshall W.F. (2009). Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. *J Cell Biol* **187**, 81-9.
- Engstler M., Pfohl T., Herminghaus S., Boshart M., Wiegertjes G., Heddergott N., Overath P. (2007). Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* **131**, 505-15.
- Erdmann M., Scholz A., Melzer I.M., Schmetz C., Wiese M. (2006). Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. *Mol Biol Cell* **17**, 2035-45.
- Eriksson J.E., Brautigam D.L., Vallee R., Olmsted J., Fujiki H., Goldman R.D. (1992). Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11093-7.
- Erondu N.E., Donelson J.E. (1991). Characterization of trypanosome protein phosphatase 1 and 2A catalytic subunits. *Mol Biochem Parasitol* **49**, 303-14.
- Estevez A.M., Kempf T., Clayton C. (2001). The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* **20**, 3831-9.
- Evans J.E., Snow J.J., Gunnarson A.L., Ou G., Stahlberg H., McDonald K.L., Scholey J.M. (2006). Functional modulation of IFT kinesins extends the sensory repertoire of ciliated neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **172**, 663-9.
- Evers R., Cornelissen A.W. (1990). The *Trypanosoma brucei* protein phosphatase gene: polycistronic transcription with the RNA polymerase II largest subunit gene. *Nucleic Acids Res* **18**, 5089-95.
- Fardilha M., Esteves S.L., Korrodi-Gregorio L., da Cruz e Silva O.A., da Cruz e Silva F.F. (2010). The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr Med Chem* **17**, 3996-4017.
- Fedoroff N. (2006). Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Ann Bot* **98**, 289-300.
- Fiebig M., Kelly S., Gluenz E. (2015). Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. *PLoS Pathog* **11**, e1005186.
- Field M.C., Carrington M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol* **7**, 775-86.
- Figueiró-Filho E., Duarte G., El-Beitune P., Quintana S., Maia T. (2004). Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **12**, 31-40.
- Flannery A.R., Huynh C., Mitra B., Mortara R.A., Andrews N.W. (2011). LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. *J Biol Chem* **286**, 23266-79.
- Flannery A.R., Renberg R.L., Andrews N.W. (2013). Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* **16**, 716-21.
- Folgueira C., Quijada L., Soto M., Abanades D.R., Alonso C., Requena J.M. (2005). The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem* **280**, 35172-83.

- Folgueira C., Requena J.M. (2007). A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 359-77.
- Franco A.O., Davies C.R., Mylne A., Dedet J.P., Gallego M., Ballart C., Gramiccia M., Gradoni L., Molina R., Galvez R., Morillas-Marquez F., Baron-Lopez S., Pires C.A., Afonso M.O., Ready P.D., Cox J. (2011). Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology* **138**, 1878-91.
- Frehlick L.J., Eirin-Lopez J.M., Ausio J. (2007). New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* **29**, 49-59.
- Gadelha A.P., Cunha-e-Silva N.L., de Souza W. (2013). Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. *J Struct Biol* **184**, 280-92.
- Gallego M., Virshup D.M. (2005). Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 197-202.
- Gannavaram S., Vedvyas C., Debrabant A. (2008). Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *J Cell Sci* **121**, 99-109.
- Genestra M., Cysne-Finkelstein L., Leon L. (2004). Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochem Funct* **22**, 315-20.
- Gerald N.J., Coppens I., Dwyer D.M. (2007). Molecular dissection and expression of the LdK39 kinesin in the human pathogen, *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol* **63**, 962-79.
- Gibbons J.A., Kozubowski L., Tatchell K., Shenolikar S. (2007). Expression of human protein phosphatase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* highlights the role of phosphatase isoforms in regulating eukaryotic functions. *J Biol Chem* **282**, 21838-47.
- Gibbons J.A., Weiser D.C., Shenolikar S. (2005). Importance of a surface hydrophobic pocket on protein phosphatase-1 catalytic subunit in recognizing cellular regulators. *J Biol Chem* **280**, 15903-11.
- Gilinger G., Bellofatto V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* **29**, 1556-64.
- Gluenz E., Ginger M.L., McKean P.G. (2010). Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol* **13**, 473-9.
- Goldberg J., Huang H.B., Kwon Y.G., Greengard P., Nairn A.C., Kuriyan J. (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **376**, 745-53.
- Gontijo N.F., Melo M.N., Riani E.B., Almeida-Silva S., Mares-Guia M.L. (1996). Glycosidases in *Leishmania* and their importance for *Leishmania* in phlebotomine sandflies with special reference to purification and characterization of a sucrase. *Exp Parasitol* **83**, 117-24.
- Gonzalez-Aseguinolaza G., Almazan F., Rodriguez J.F., Marquet A., Larraga V. (1997). Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochim Biophys Acta* **1361**, 92-102.
- Gradoni L. (2013). Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges. *Euro Surveill* **18**, 20539.
- Gradoni L. (2015). Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. *Vet Parasitol* **208**, 94-100.

Bibliografia

- Gramiccia M. (2011). Recent advances in leishmaniasis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol* **181**, 23-30.
- Grellier P., Blum J., Santana J., Bylen E., Mouray E., Sinou V., Teixeira A.R., Schrevel J. (1999). Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **98**, 239-52.
- Grevelink S.A., Lerner E.A. (1996). Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* **34**, 257-72.
- Hagiwara M., Alberts A., Brindle P., Meinkoth J., Feramisco J., Deng T., Karin M., Shenolikar S., Montminy M. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**, 105-13.
- Haile S., Papadopoulou B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* **10**, 569-77.
- Hanahan D., Meselson M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**, 333-42.
- Handman E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* **44**, 1-39.
- Hem S., Gherardini P.F., Osorio y Fortea J., Hourdel V., Morales M.A., Watanabe R., Pescher P., Kuzyk M.A., Smith D., Borchers C.H., Zilberstein D., Helmer-Citterich M., Namane A., Spath G.F. (2010). Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* **10**, 3868-83.
- Hendrickx A., Beullens M., Ceulemans H., Den Abt T., Van Eynde A., Nicolaescu E., Lesage B., Bollen M. (2009). Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol* **16**, 365-71.
- Heroes E., Lesage B., Gornemann J., Beullens M., Van Meervelt L., Bollen M. (2013). The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J* **280**, 584-95.
- Hershey J.W. (1989). Protein phosphorylation controls translation rates. *J Biol Chem* **264**, 20823-6.
- Herwaldt B.L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* **354**, 1191-9.
- Hoffmann B., Uzarska M.A., Berndt C., Godoy J.R., Haunhorst P., Lillig C.H., Lill R., Muhlenhoff U. (2011). The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antioxid Redox Signal* **15**, 19-30.
- Holzer T.R., McMaster W.R., Forney J.D. (2006). Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **146**, 198-218.
- Hosono K., Noda S., Shimizu A., Nakanishi N., Ohtsubo M., Shimizu N., Minoshima S. (2010). YPEL5 protein of the YPEL gene family is involved in the cell cycle progression by interacting with two distinct proteins RanBPM and RanBP10. *Genomics* **96**, 102-11.
- Hosono K., Sasaki T., Minoshima S., Shimizu N. (2004). Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species. *Gene* **340**, 31-43.
- Hou W.Y., Pimenta P.F., Shen R.L., Da Silva P.P. (1992). Stereo views and immunogold labeling of the pellicular microtubules at the inner surface of the plasma membrane of *Leishmania* as revealed by fracture-flip. *J Histochem Cytochem* **40**, 1309-18.
- Hsu J.Y., Sun Z.W., Li X., Reuben M., Tatchell K., Bishop D.K., Grushcow J.M., Brame C.J., Caldwell J.A., Hunt D.F., Lin R., Smith M.M., Allis C.D. (2000).

- Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-91.
- Huynh C., Sacks D.L., Andrews N.W. (2006). A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J Exp Med* **203**, 2363-75.
- Ilg T. (2001). Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Med Microbiol Immunol* **190**, 13-7.
- Ivens A., Peacock C., Worthey E., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S., Bianchetti G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R., Cronin A., Cruz A., Davies R., De Gaudenzi J., Dobson D., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'neil S., Pentony M., Pohl T., Price C., Purnelle B., Quail M., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D., Blackwell J., Stuart K., Barrell B., Myler P. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436-42.
- Jackson A.P. (2010). The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Mol Biol Evol* **27**, 33-45.
- Jesus J.B.d., Mesquita-Rodrigues C., Cuervo P. (2014). Proteomics Advances in the Study of *Leishmania* Parasites and Leishmaniasis. En: Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Santos A., Branquinha M., d'Avila-Levy C., Kneipp L., Sodr  C. (Eds.), Springer Netherlands.
- Jhingran A., Chatterjee M., Madhubala R., Myler P. (2008). Leishmaniasis: Epidemiological Trends and Diagnosis. En: *Leishmania After the Genome*. Myler P., Fasel N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Jiménez M., Gonzalez E., Iriso A., Marco E., Alegret A., Fuster F., Molina R. (2013). Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res* **112**, 2453-9.
- Kamenski T., Heilmeyer S., Meinhart A., Cramer P. (2004). Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Mol Cell* **15**, 399-407.
- Kane J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 494-500.
- Keene J.D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**, 533-43.
- Kelker M.S., Page R., Peti W. (2009). Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors. *J Mol Biol* **385**, 11-21.
- Kelly B.L., Nelson T.N., McMaster W.R. (2001). Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63). *Mol Biochem Parasitol* **116**, 101-4.

Bibliografia

- Killick-Kendrick R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* **4**, 1-24.
- Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* **17**, 279-89.
- Killick-Kendrick R., Wilkes T.J., Bailly M., Bailly I., Righton L.A. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **80**, 138-42.
- Kloehn J., Saunders E.C., O'Callaghan S., Dagley M.J., McConville M.J. (2015). Characterization of metabolically quiescent *Leishmania* parasites in murine lesions using heavy water labeling. *PLoS Pathog* **11**, e1004683.
- Knuepfer E., Stierhof Y.D., McKean P.G., Smith D.F. (2001). Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *Biochem J* **356**, 335-44.
- Krauth-Siegel R., Meiering S., Schmidt H. (2003). The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biological Chemistry* **384**, 539-49.
- Kuhn D., Wiese M. (2005). LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Mol Microbiol* **56**, 1169-82.
- Kumar P., Sundar S., Singh N. (2007). Degradation of pteridine reductase 1 (PTR1) enzyme during growth phase in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol* **116**, 182-9.
- Kurland C., Gallant J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 489-93.
- Kwiek N.C., Thacker D.F., Datto M.B., Megosh H.B., Haystead T.A. (2006). PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. *Cell Signal* **18**, 1769-78.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lainson R., Shaw J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. En: The leishmaniasis in biology and medicine. . Peters W. , Killick-Kendrick R. (Eds.).
- Lakshmi B.S., Wang R., Madhubala R. (2014). *Leishmania* genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Vaccine* **32**, 3816-22.
- Larreta R., Soto M., Quijada L., Folgosa C., Abanades D.R., Alonso C., Requena J.M. (2004). The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* **5**, 3.
- Leifso K., Cohen-Freue G., Dogra N., Murray A., McMaster W.R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* **152**, 35-46.
- Lemma A., Schiller E.L. (1964). Extracellular Cultivation of the Leishmanial Bodies of Species Belonging to the Protozoan Genus *Leishmania*. *Exp Parasitol* **15**, 503-13.
- Lesage B., Beullens M., Ceulemans H., Himpens B., Bollen M. (2005). Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1. *FEBS Lett* **579**, 5626-30.
- Li S., Donelson J.E. (1995). Inhibition of protein phosphatase 1 and 2A down-regulates beta-tubulin gene expression in *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 793-9.

- Li Z., Tu X., Wang C.C. (2006). Okadaic acid overcomes the blocked cell cycle caused by depleting Cdc2-related kinases in *Trypanosoma brucei*. *Exp Cell Res* **312**, 3504-16.
- Liang X., Haritan A., Uliel S., Michaeli S. (2003a). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic cell* **2**, 830-40.
- Liang X.H., Haritan A., Uliel S., Michaeli S. (2003b). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* **2**, 830-40.
- Lin Q., Buckler E.S.t., Muse S.V., Walker J.C. (1999). Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol* **12**, 57-66.
- Liu C.W., Wang R.H., Dohadwala M., Schonthal A.H., Villa-Moruzzi E., Berndt N. (1999). Inhibitory phosphorylation of PP1alpha catalytic subunit during the G(1)/S transition. *J Biol Chem* **274**, 29470-5.
- Lobstein J., Emrich C.A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P., Berkmen M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact* **11**, 56.
- Lukes J., Mauricio I.L., Schonian G., Dujardin J.C., Soteriadou K., Dedet J.P., Kuhls K., Tintaya K.W., Jirku M., Chocholova E., Haralambous C., Pralong F., Obornik M., Horak A., Ayala F.J., Miles M.A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9375-80.
- Lyda T.A., Joshi M.B., Andersen J.F., Kelada A.Y., Owings J.P., Bates P.A., Dwyer D.M. (2015). A unique, highly conserved secretory invertase is differentially expressed by promastigote developmental forms of all species of the human pathogen, *Leishmania*. *Mol Cell Biochem* **404**, 53-77.
- MacKintosh C., Garton A.J., McDonnell A., Barford D., Cohen P.T., Tonks N.K., Cohen P. (1996). Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett* **397**, 235-8.
- Machado-Coelho G.L., Caiaffa W.T., Genaro O., Magalhaes P.A., Mayrink W. (2005). Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **99**, 55-61.
- Magill A.J., Grogl M., Gasser R.A., Jr., Sun W., Oster C.N. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* **328**, 1383-7.
- Maia C., Campino L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol* **27**, 341-4.
- Marchini F.K., Godoy L.M.F.d., Batista M., Kugeratski F.G., Krieger M.A. (2014). Towards the Phosphoproteome of Trypanosomatids. En: Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Santos A., Branquinha M., d'Avila-Levy C., Kneipp L., Sodré C. (Eds.), Springer Netherlands.
- Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* **27**, 123-47.
- Martinez-Calvillo S., Nguyen D., Stuart K., Myler P.J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* **3**, 506-17.
- Martinez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J.C., Florencio-Martinez L.E., Manning-Cela R.G., Figueroa-Angulo E.E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 525241.
- Martinez-Calvillo S., Yan S., Nguyen D., Fox M., Stuart K., Myler P.J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* **11**, 1291-9.

Bibliografía

- McCall L.I., Matlashewski G. (2010). Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Mol Microbiol* **77**, 518-30.
- McConville M., De Souza D., Saunders E., Pyke J., Naderer T., Ellis M., Sernee M., Ralton J., Likic V. (2008). Analysis of the *Leishmania* Metabolome. En: *Leishmania After the Genome*. Myler P., Fasel N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- McKerrow J.H., Sun E., Rosenthal P.J., Bouvier J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **47**, 821-53.
- McNicoll F., Drummelsmith J., Muller M., Madore E., Boilard N., Ouellette M., Papadopoulou B. (2006). A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* **6**, 3567-81.
- McNicoll F., Muller M., Cloutier S., Boilard N., Rochette A., Dube M., Papadopoulou B. (2005). Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* **280**, 35238-46.
- Milone J., Wilusz J., Bellofatto V. (2002). Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. *Nucleic Acids Res* **30**, 4040-50.
- Mills E., Price H.P., Johner A., Emerson J.E., Smith D.F. (2007). Kinetoplastid PPEF phosphatases: dual acylated proteins expressed in the endomembrane system of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **152**, 22-34.
- Molina-Navarro M.M., Casas C., Piedrafita L., Belli G., Herrero E. (2006). Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett* **580**, 2273-80.
- Molina R., Jiménez M., Cruz I., Iriso A., Martín-Martín I., Sevillano O., Melero S., Bernal J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* **190**, 268-71.
- Molyneux D.H., Ashford R.W. (1983). *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*. London : Taylor and Francis.
- Moorhead G.B., De Wever V., Templeton G., Kerk D. (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J* **417**, 401-9.
- Morales M.A., Watanabe R., Dacher M., Chafey P., Osorio y Fortea J., Scott D.A., Beverley S.M., Ommen G., Clos J., Hem S., Lenormand P., Rousselle J.C., Namane A., Spath G.F. (2010). Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8381-6.
- Morales M.A., Watanabe R., Laurent C., Lenormand P., Rousselle J.C., Namane A., Spath G.F. (2008). Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* **8**, 350-63.
- Moreno J., Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* **18**, 399-405.
- Muhlenhoff U., Molik S., Godoy J.R., Uzarska M.A., Richter N., Seubert A., Zhang Y., Stubbe J., Pierrel F., Herrero E., Lillig C.H., Lill R. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* **12**, 373-85.
- Mullin K.A., Foth B.J., Ilgoutz S.C., Callaghan J.M., Zawadzki J.L., McFadden G.I., McConville M.J. (2001). Regulated degradation of an endoplasmic reticulum

- membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell* **12**, 2364-77.
- Mundodi V., Somanna A., Farrell P.J., Gedamu L. (2002). Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* **282**, 257-65.
- Myler P. (2008). Genome Structure and Content. En: *Leishmania After the Genome*. Myler P., Fasel N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Myler P.J., Sisk E., McDonagh P.D., Martinez-Calvillo S., Schnauffer A., Sunkin S.M., Yan S., Madhubala R., Ivens A., Stuart K. (2000). Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans* **28**, 527-31.
- Nare B., Hardy L.W., Beverley S.M. (1997). The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem* **272**, 13883-91.
- Naucke T.J., Schmitt C. (2004). Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int J Med Microbiol* **293 Suppl 37**, 179-81.
- Neal R.A., Miles R.A. (1963). Heated blood agar medium for the growth of *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. *Nature* **198**, 210-1.
- Novoa I., Zeng H., Harding H.P., Ron D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**, 1011-22.
- OMS (2010). *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*. World Health Organization, Geneva.
- Opperdoes F.R., Coombs G.H. (2007). Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* **23**, 149-58.
- Opperdoes F.R., Michels P.A. (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie* **75**, 231-4.
- Orr G.A., Werner C., Xu J., Bennett M., Weiss L.M., Takvorkan P., Tanowitz H.B., Wittner M. (2000). Identification of novel serine/threonine protein phosphatases in *Trypanosoma cruzi*: a potential role in control of cytokinesis and morphology. *Infect Immun* **68**, 1350-8.
- Papadopoulou B., Müller M., A. R., McNicoll F., Dumas C., Chow C. (2008). Regulation of Gene Expression in *Leishmania* Throughout a Complex Digenetic Life Cycle. En: *Leishmania After the Genome*. Myler P., Fasel N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Parsons M., Worthey E.A., Ward P.N., Mottram J.C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **6**, 127.
- Pazour G.J., Agrin N., Leszyk J., Witman G.B. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol* **170**, 103-13.
- Peacock C., Seeger K., Harris D., Murphy L., Ruiz J., Quail M., Peters N., Adlem E., Tivey A., Aslett M., Kerhornou A., Ivens A., Fraser A., Rajandream M., Carver T., Norbertczak H., Chillingworth T., Hance Z., Jagels K., Moule S., Ormond D., Rutter S., Squares R., Whitehead S., Rabinowitsch E., Arrowsmith C., White B., Thurston S., Bringaud F., Baldauf S., Faulconbridge A., Jeffares D., Depledge D., Oyola S., Hilley J., Brito L., Tosi L., Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, M. B. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics* **39**, 839-47.
- Pennisi M.G. (2015). Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet Parasitol* **208**, 35-47.

Bibliografía

- Peti W., Nairn A.C., Page R. (2013). Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS J* **280**, 596-611.
- Peti W., Page R. (2015). Strategies to make protein serine/threonine (PP1, calcineurin) and tyrosine phosphatases (PTP1B) druggable: achieving specificity by targeting substrate and regulatory protein interaction sites. *Bioorg Med Chem* **23**, 2781-5.
- Pfannenschmid F., Wimmer V.C., Rios R.M., Geimer S., Krockel U., Leihner A., Haller K., Nemcova Y., Mages W. (2003). Chlamydomonas DIP13 and human NA14: a new class of proteins associated with microtubule structures is involved in cell division. *J Cell Sci* **116**, 1449-62.
- Pigott D.M., Bhatt S., Golding N., Duda K.A., Battle K.E., Brady O.J., Messina J.P., Balard Y., Bastien P., Pratlong F., Brownstein J.S., Freifeld C.C., Mekaru S.R., Gething P.W., George D.B., Myers M.F., Reithinger R., Hay S.I. (2014). Global distribution maps of the leishmaniasis. *Elife* **3**.
- Price H.P., Hodgkinson M.R., Curwen R.S., MacLean L.M., Brannigan J.A., Carrington M., Smith B.A., Ashford D.A., Stark M., Smith D.F. (2012). The orthologue of Sjogren's syndrome nuclear autoantigen 1 (SSNA1) in Trypanosoma brucei is an immunogenic self-assembling molecule. *PLoS One* **7**, e31842.
- Proudfoot C., McCulloch R. (2006). Trypanosoma brucei DMC1 does not act in DNA recombination, repair or antigenic variation in bloodstream stage cells. *Mol Biochem Parasitol* **145**, 245-53.
- Qian J., Lesage B., Beullens M., Van Eynde A., Bollen M. (2011). PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Curr Biol* **21**, 766-73.
- Ramakrishnan S., Serricchio M., Striepen B., Butikofer P. (2013). Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog Lipid Res* **52**, 488-512.
- Ramos H., Valdivieso E., Gamargo M., Dagger F., Cohen B.E. (1996). Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol* **152**, 65-75.
- Ready P.D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* **58**, 227-50.
- Rebelo S., Santos M., Martins F., da Cruz e Silva E.F., da Cruz e Silva O.A. (2015). Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events. *Cell Signal* **27**, 2589-98.
- Reczek C.R., Chandel N.S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 8-13.
- Requena J.M., Folgueira C., Lopez M.C., Thomas M.C. (2008). The SIDER2 elements, interspersed repeated sequences that populate the Leishmania genomes, constitute subfamilies showing chromosomal proximity relationship. *BMC Genomics* **9**, 263.
- Rico E., Oliva C., Gutierrez K.J., Alzate J.F., Genes C.M., Moreno D., Casanova E., Gigante A., Perez-Perez M.J., Camarasa M.J., Clos J., Gago F., Jimenez-Ruiz A. (2014). Leishmania infantum EndoG is an endo/exo-nuclease essential for parasite survival. *PLoS One* **9**, e89526.
- Rioux J., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Perieres J. (1990). Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **65**, 111-25.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-40.

- Rochette A., McNicoll F., Girard J., Breton M., Leblanc E., Bergeron M.G., Papadopoulou B. (2005). Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* **140**, 205-20.
- Rochette A., Raymond F., Corbeil J., Ouellette M., Papadopoulou B. (2009). Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* **165**, 32-47.
- Rosenzweig D., Smith D., Myler P., Olafson R., Zilberstein D. (2008a). Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* **8**, 1843-50.
- Rosenzweig D., Smith D., Opperdoes F., Stern S., Olafson R.W., Zilberstein D. (2008b). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* **22**, 590-602.
- Sacks D., Hieny S., Sher A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *The Journal of Immunology* **135**, 564-9.
- Sacks D., Kamhawi S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* **55**, 453-83.
- Sacks D.L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**, 189-96.
- Sample P.J., Koreny L., Paris Z., Gaston K.W., Rubio M.A., Fleming I.M., Hinger S., Horakova E., Limbach P.A., Lukes J., Alfonzo J.D. (2015). A common tRNA modification at an unusual location: the discovery of wyosine biosynthesis in mitochondria. *Nucleic Acids Res* **43**, 4262-73.
- Santos M., Domingues S.C., Costa P., Muller T., Galozzi S., Marcus K., da Cruz e Silva E.F., da Cruz e Silva O.A., Rebelo S. (2014). Identification of a novel human LAP1 isoform that is regulated by protein phosphorylation. *PLoS One* **9**, e113732.
- Saridomichelakis M.N., Koutinas A.F. (2014). Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol* **25**, 61-71, e22.
- Sasaki K., Shima H., Kitagawa Y., Irino S., Sugimura T., Nagao M. (1990). Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* **81**, 1272-80.
- Saxena A., Lahav T., Holland N., Aggarwal G., Anupama A., Huang Y., Volpin H., Myler P.J., Zilberstein D. (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol* **152**, 53-65.
- Sayers J.R., Price H.P., Fallon P.G., Doenhoff M.J. (1995). AGA/AGG codon usage in parasites: implications for gene expression in *Escherichia coli*. *Parasitol Today* **11**, 345-6.
- Schoppmeier J., Mages W., Lechtreck K.F. (2005). GFP as a tool for the analysis of proteins in the flagellar basal apparatus of *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**, 189-200.
- Sharma U., Singh S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* **45**, 255-72.
- Shaw S.E., Langton D.A., Hillman T.J. (2009). Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol* **163**, 281-5.

Bibliografía

- Shi Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**, 468-84.
- Shih S., Hwang H.Y., Carter D., Stenberg P., Ullman B. (1998). Localization and targeting of the *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome. *J Biol Chem* **273**, 1534-41.
- Silva F.L., Oliveira R.G., Silva T.M., Xavier M.N., Nascimento E.F., Santos R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* **160**, 55-9.
- Simon M.W., Martin E., Mukkada A.J. (1978). Evidence for a functional glyoxylate cycle in the leishmaniae. *J Bacteriol* **135**, 895-9.
- Singh N., Kumar M., Singh R. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **5**, 485-97.
- Slappendel R.J. (1988). Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* **10**, 1-16.
- Smith D.F., Peacock C.S., Cruz A.K. (2007). Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniases. *Int J Parasitol* **37**, 1173-86.
- Solano-Gallego L., Miro G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G., The LeishVet G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* **4**, 86.
- Soto M., Iborra S., Quijada L., Folgueira C., Alonso C., Requena J.M. (2004). Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* **379**, 617-25.
- Soto M., Quijada L., Alonso C., Requena J.M. (1997). Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol* **90**, 439-47.
- Soto M., Quijada L., Alonso C., Requena J.M. (2000). Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control. *Biochem J* **346 Pt 1**, 99-105.
- Soto M., Requena J.M., Quijada L., Alonso C. (1996). Organization, transcription and regulation of the *Leishmania infantum* histone H3 genes. *Biochem J* **318 (Pt 3)**, 813-9.
- Spath G.F., Beverley S.M. (2001). A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol* **99**, 97-103.
- Steen R.L., Martins S.B., Tasken K., Collas P. (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**, 1251-62.
- Steiger R.F., Steiger E. (1977). Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requirements. *J Protozool* **24**, 437-41.
- Suárez B., Isidoro B., Santos S., Sierra M., Molina R., Astray J., Amela C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Publica* **86**, 555-64.
- Sundar S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**, 849-54.
- Sundar S., Chakravarty J., Agarwal D., Rai M., Murray H.W. (2010). Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* **362**, 504-12.

- Sundar S., Olliaro P.L. (2007). Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag* **3**, 733-40.
- Sundstrom C., Nilsson K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17**, 565-77.
- Symmers W. (1960). Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *The Lancet* **1**, 127-32.
- Szoor B. (2010). Trypanosomatid protein phosphatases. *Mol Biochem Parasitol* **173**, 53-63.
- Tan S., Lyulcheva E., Dean J., Bennett D. (2008). Mars promotes dTACC dephosphorylation on mitotic spindles to ensure spindle stability. *J Cell Biol* **182**, 27-33.
- Tange T.O., Nott A., Moore M.J. (2004). The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 279-84.
- Teske E., van Knapen F., Beijer E.G., Slappendel R.J. (2002). Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Vet Scand* **43**, 195-201.
- Tonks N.K., Charbonneau H. (1989). Protein tyrosine dephosphorylation and signal transduction. *Trends Biochem Sci* **14**, 497-500.
- Trinkle-Mulcahy L., Andrews P.D., Wickramasinghe S., Sleeman J., Prescott A., Lam Y.W., Lyon C., Swedlow J.R., Lamond A.I. (2003). Time-lapse imaging reveals dynamic relocalization of PP1gamma throughout the mammalian cell cycle. *Mol Biol Cell* **14**, 107-17.
- Tselentis Y., Gikas A., Chaniotis B. (1994). Kala-azar in Athens basin. *Lancet* **343**, 1635.
- Tsigankov P., Gherardini P.F., Helmer-Citterich M., Spath G.F., Zilberstein D. (2013). Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. *J Proteome Res* **12**, 3405-12.
- Tu J., Carlson M. (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Embo Journal* **14**, 5939-46.
- Turco S.J., Sacks D.L. (1991). Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **45**, 91-9.
- Turetz M.L., Machado P.R., Ko A.I., Alves F., Bittencourt A., Almeida R.P., Mobashery N., Johnson W.D., Jr., Carvalho E.M. (2002). Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* **186**, 1829-34.
- Uliana S.R., Goyal N., Freymuller E., Smith D.F. (1999). *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol* **92**, 183-91.
- Vickers T.J., Beverley S.M. (2011). Folate metabolic pathways in *Leishmania*. *Essays Biochem* **51**, 63-80.
- Vogel C., Marcotte E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**, 227-32.
- Wagner V., Gessner G., Heiland I., Kaminski M., Hawat S., Scheffler K., Mittag M. (2006). Analysis of the phosphoproteome of *Chlamydomonas reinhardtii* provides new insights into various cellular pathways. *Eukaryot Cell* **5**, 457-68.
- Wakula P., Beullens M., Ceulemans H., Stalmans W., Bollen M. (2003). Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* **278**, 18817-23.

Bibliografia

- Walsh D.A., Newsholme P., Cawley K.C., van Patten S.M., Angelos K.L. (1991). Motifs of protein phosphorylation and mechanisms of reversible covalent regulation. *Physiol Rev* **71**, 285-304.
- Walter R.D., Opperdoes F.R. (1982). Subcellular distribution of adenylate cyclase, cyclic-AMP phosphodiesterase, protein kinases and phosphoprotein phosphatase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **6**, 287-95.
- Ward R.D., Morton I.E. (1991). Pheromones in mate choice and sexual isolation between siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Parassitologia* **33 Suppl**, 527-33.
- Washington K., Ammosova T., Beullens M., Jerebtsova M., Kumar A., Bollen M., Nekhai S. (2002). Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II. *J Biol Chem* **277**, 40442-8.
- Wassmann K., Liberal V., Benezra R. (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO J* **22**, 797-806.
- Watanabe T., da Cruz e Silva E.F., Huang H.B., Starkova N., Kwon Y.G., Horiuchi A., Greengard P., Nairn A.C. (2003). Preparation and characterization of recombinant protein phosphatase 1. *Methods Enzymol* **366**, 321-38.
- Wheeler R.J., Gluenz E., Gull K. (2015). Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. *Nat Commun* **6**, 8964.
- Wheeler R.J., Sunter J.D., Gull K. (2016). Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *J Cell Sci* **129**, 854-67.
- Wiese M., Kuhn D., Grunfelder C.G. (2003). Protein kinase involved in flagellar-length control. *Eukaryot Cell* **2**, 769-77.
- Winter G., Fuchs M., McConville M.J., Stierhof Y.D., Overath P. (1994). Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J Cell Sci* **107 (Pt 9)**, 2471-82.
- Wolin S.L., Cedervall T. (2002). The La protein. *Annu Rev Biochem* **71**, 375-403.
- Yamano H., Ishii K., Yanagida M. (1994). Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *EMBO J* **13**, 5310-8.
- Yang P., Fox L., Colbran R.J., Sale W.S. (2000). Protein phosphatases PP1 and PP2A are located in distinct positions in the *Chlamydomonas* flagellar axoneme. *J Cell Sci* **113 (Pt 1)**, 91-102.
- Yang P., Sale W.S. (2000). Casein kinase I is anchored on axonemal doublet microtubules and regulates flagellar dynein phosphorylation and activity. *J Biol Chem* **275**, 18905-12.
- Zarella-Boitz J.M., Rager N., Jardim A., Ullman B. (2004). Subcellular localization of adenine and xanthine phosphoribosyltransferases in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **134**, 43-51.
- Zhang A.J., Bai G., Deans-Zirattu S., Browner M.F., Lee E.Y. (1992). Expression of the catalytic subunit of phosphorylase phosphatase (protein phosphatase-1) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 1484-90.
- Zhang K., Barron T., Turco S.J., Beverley S.M. (2004). The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **136**, 11-23.
- Zhang W.W., Matlashewski G. (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8807-11.

- Zhang Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zhang Z., Zhao S., Zirattu S.D., Bai G., Lee E.Y. (1994). Expression of recombinant inhibitor-2 in *E. coli* and its utilization for the affinity chromatography of protein phosphatase-1. *Arch Biochem Biophys* **308**, 37-41.
- Zhou C., Cunningham L., Marcus A.I., Li Y., Kahn R.A. (2006). Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell* **17**, 2476-87.
- Zhou Q., Liu B., Sun Y., He C.Y. (2011). A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **124**, 3848-58.
- Zijlstra E.E., Musa A.M., Khalil E.A.G., El Hassan I.M., El-Hassan A.M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* **3**, 87-98.
- Zilberstein D. (2008). Physiological and Biochemical Aspects of *Leishmania* Development. En: *Leishmania After the Genome*. Myler P., Fasel N. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk.
- Zilberstein D., Shapira M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* **48**, 449-70.

8. ANEXOS

Anexo I

Secuencia de aminoácidos y tamaño molecular de las PP1 codificadas por el *cluster* PP1-34.

>LinJ.34.0820 (32,5 kDa)

MIQCDRAPPQLLVRGEQIRAVLTEVREIFMSQPMLEIRPPVRVCGDTHGQYYDLLRIYEKCGFPYSNYLFLGDYVDRGKHSVETIVLQFCYKIVYPENFFLLRGNHECASINKMYGFFDDVRRYNIKLFKAFTDVFNTMPVCCVISEKIICMHGGLSPDLTDLTAINIILRPCDVPDRGILCDLLWADPENEVRGFLESDRGVSYLFGEDIVNDFLDMVMDLIVRAHQVVQRGYGFFASRQLVTVFSAPNYCGEFDNDAAVMTIDDKLQCSFLIIPAAK

>LinJ.34.0830 (34,6 kDa)

MASSTSPSSSTVPQTLIEKLLTVRGASAQRQVLIKEEDIRVVLETVREIFITQPMLEIRPPVRVCGDTHGQYYDLLRIYEKCGFPYSNYLFLGDYVDRGKHSVETIVLQFCYKIVYPENFFLLRGNHECASINKMYGFFDDVRRYNIKLFKAFTDVFNTMPVCCVISEKIICMHGGLSPDLTDLTAINIILRPCDVPDRGILCDLLWADPENEVRGFLESDRGVSYLFGEDIVNDFLDMVMDLIVRAHQVVQRGYGFFASRQLVTVFSAPNYCGEFDNDAAVMTIDDKLQCSFLIIPAAK

>LinJ.34.0840 (34,5 kDa)

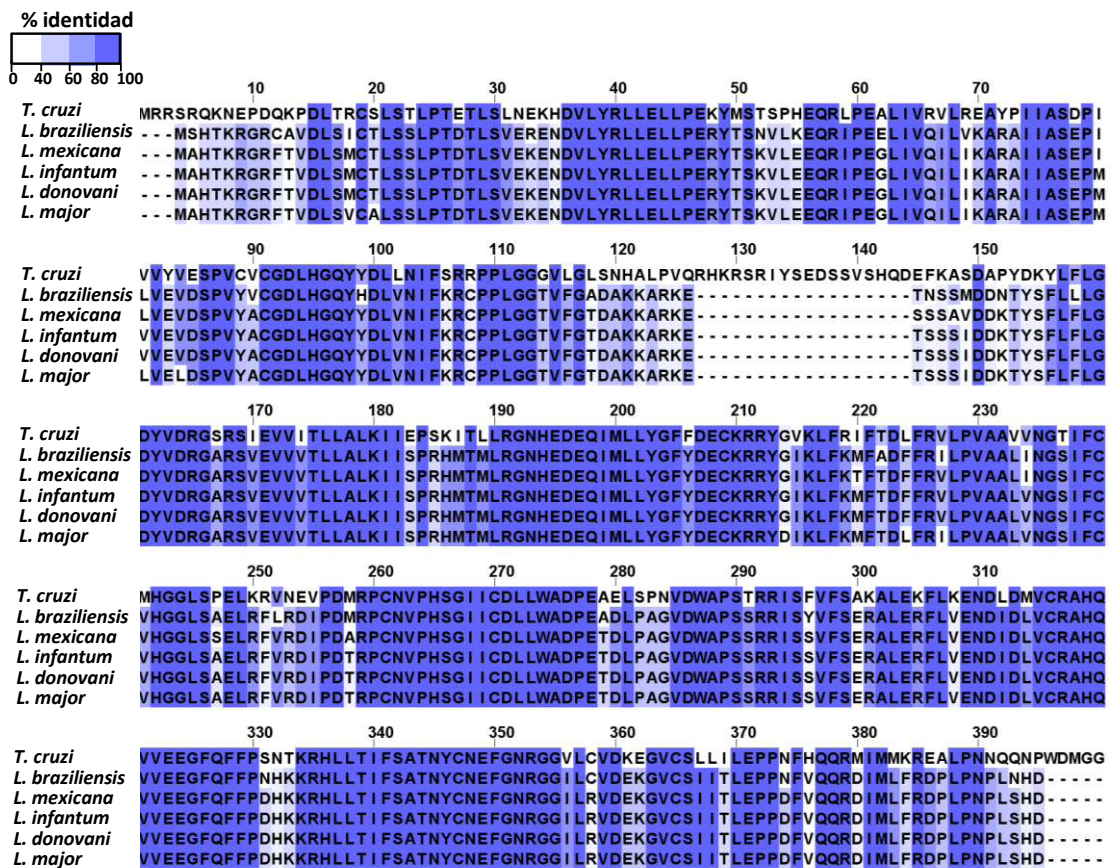
MSEVFPLVQSIVEKMLTGGDNRFQRQILIKEEEIRAVLRAVREVFMSQPMLEIRPPVRVCGDTHGQYYDLLRIYEKCGFPYSNYLFLGDYVDRGKHSVETIVLQFCYKIVYPENFFLLRGNHECASINKMYGFFDDVRRYNIKLFKAFTDVFNTMPVCCVISEKIICMHGGLSPDLTSVASVMDIERPCDVPDRGILCDLLWADPEDDVQGFLESDRGVSYLFGEDIVNDFLDMVMDLIVRAHQVMERGYGFFASRQLVTVFSAPNYCGEFDNDAAVMNIDDKLQCSFLIIPASR

>LinJ.34.0850 (34,6 kDa)

MSNAAILPMVQTLIEKMLTVKGNRMQRQILIKEEEIRAVLTEVREIFMSQPMLEIRPPVRVCGDTHGQYYDLLRIYEKCGFPYSNYLFLGDYVDRGKHSVETIVLQFCYKIVYPENFFLLRGNHECASINKMYGFFDDVRRYNIKLFKAFTDVFNTMPVCCVISEKIICMHGGLSPDLTSVASVMDIERPCDVPDRGILCDLLWADPEDDVQGFLESDRGVSYLFGEDIVNDFLDMVMDLIVRAHQVMERGYGFFASRQLVTVFSAPNYCGEFDNDAAVMNIDDKLQCSFLIIPAAK

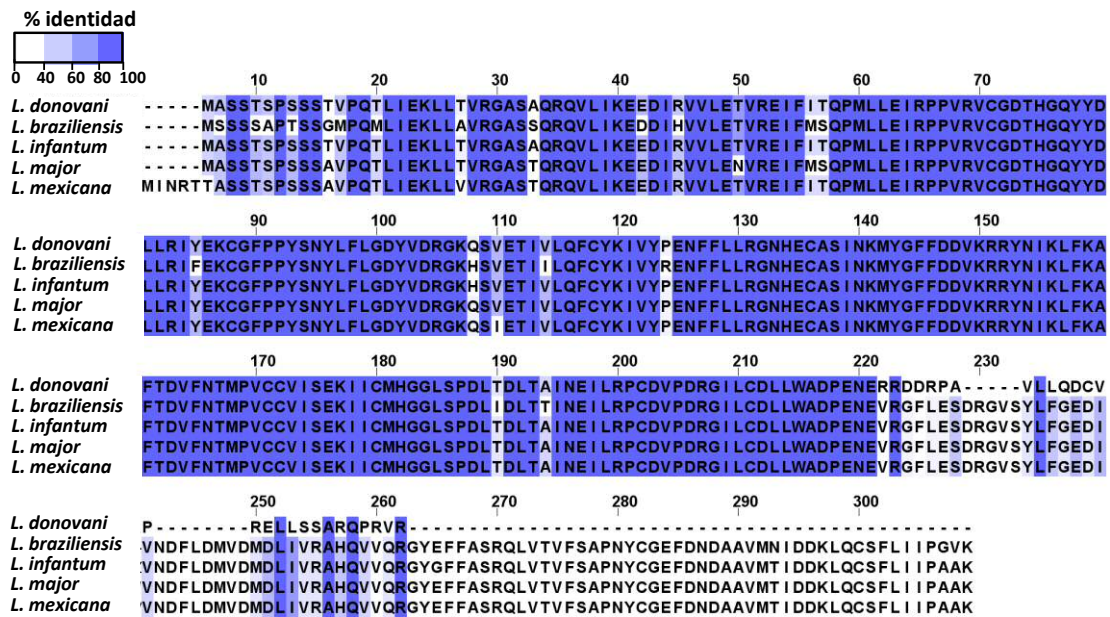
Anexo II

Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos codificada por los genes ortólogos de LinJ.15.0240 en los géneros *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. Se muestra el grado de identidad de las secuencias de aminoácidos de la PP1 ortólogas a la proteína codificada por el gen LinJ.15.0240 de *L. infantum* en diferentes especies del género *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. Número de acceso GeneDB: *L. braziliensis* (LbrM.15.0230); *L. mexicana* (LmxM.15.0220); *L. donovani* (LdBPK_150240.1); *L. major* (LmjF.15.0220); *T. cruzi* (TcCLB.506739.130).



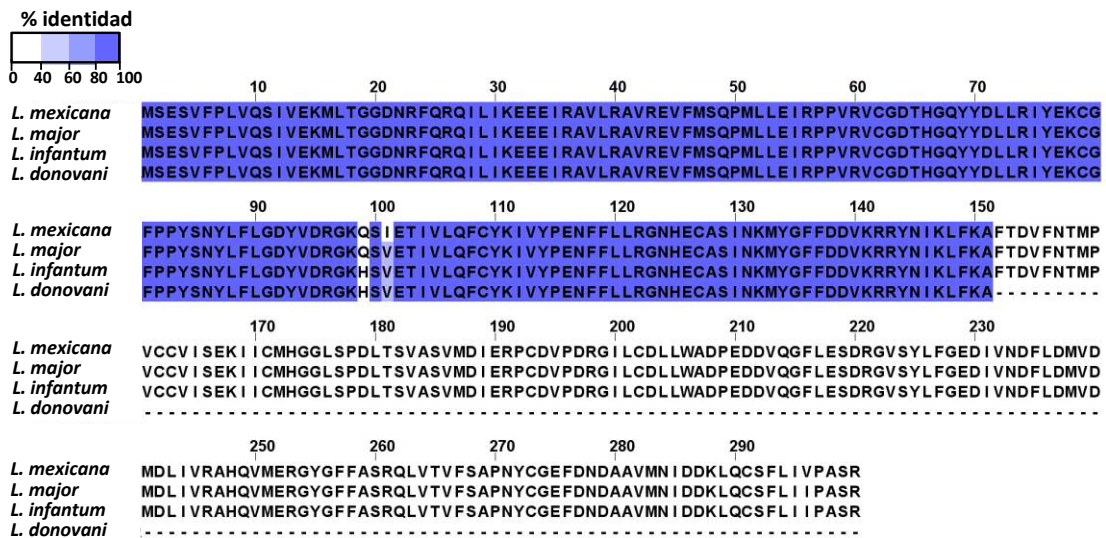
Anexo III

Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos codificada por los genes ortólogos de LinJ.34.0830 en el género *Leishmania* spp. Se muestra el grado de identidad de las secuencias de aminoácidos de la PP1 ortólogas a la proteína codificada por el gen LinJ.34.0830 de *L. infantum* en diferentes especies del género *Leishmania* spp. Número de acceso GeneDB: *L. braziliensis* (LbrM.20.0720); *L. mexicana* (LmxM.33.0790); *L. donovani* (LdBPK_340830.1); *L. major* (LmjF.34.0790).



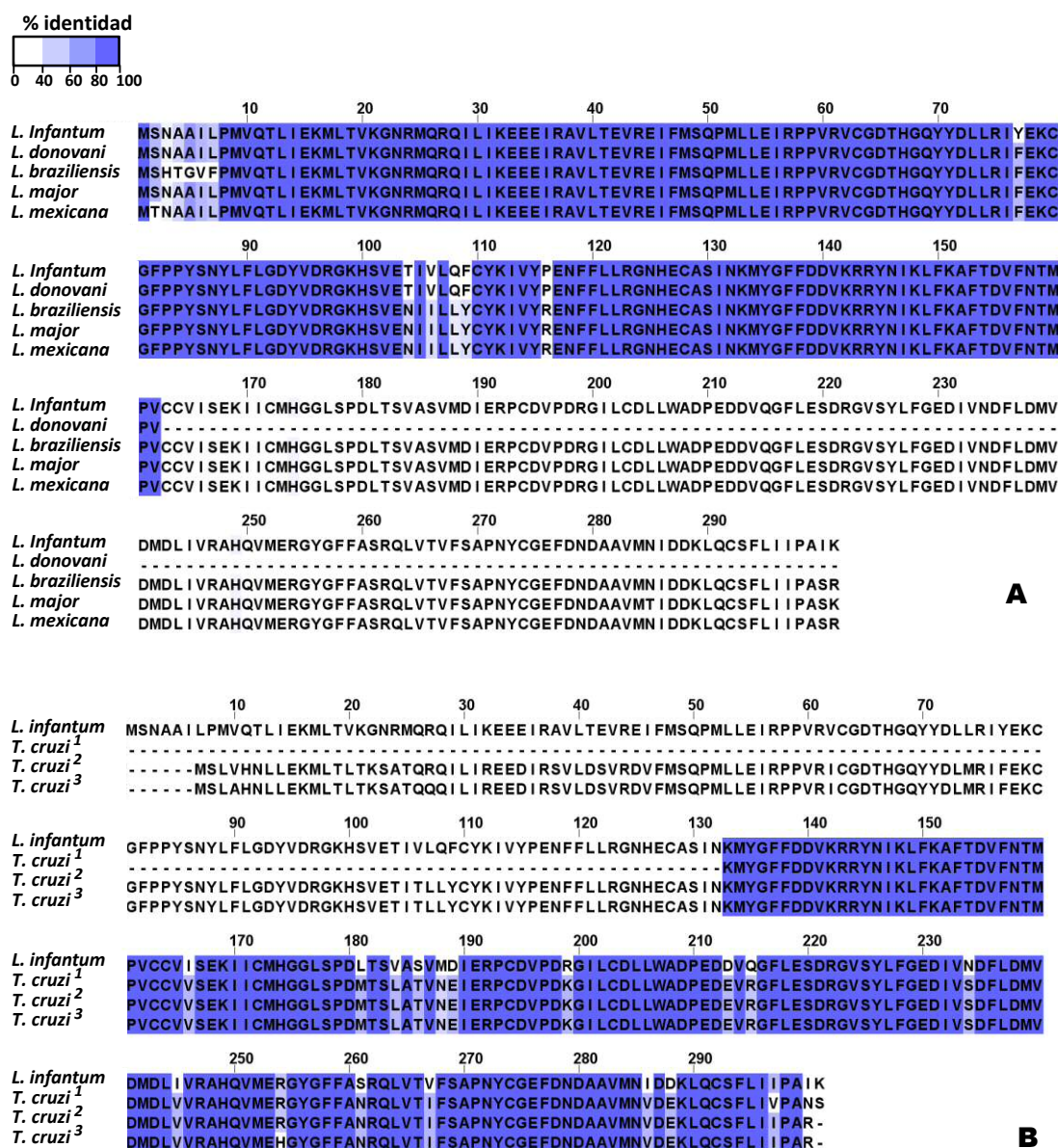
Anexo IV

Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos codificada por los genes ortólogos de LinJ.34.0840 en el género *Leishmania*. Se muestra el grado de identidad de las secuencias de aminoácidos de la PP1 ortólogas a la proteína codificada por el gen LinJ.34.0840 de *L. infantum* en diferentes especies del género *Leishmania*. Número de acceso GeneDB: *L. mexicana* (LmxM.33.0800); *L. donovani* (LdBPK_340840.1); *L. major* (LmjF.34.0800).



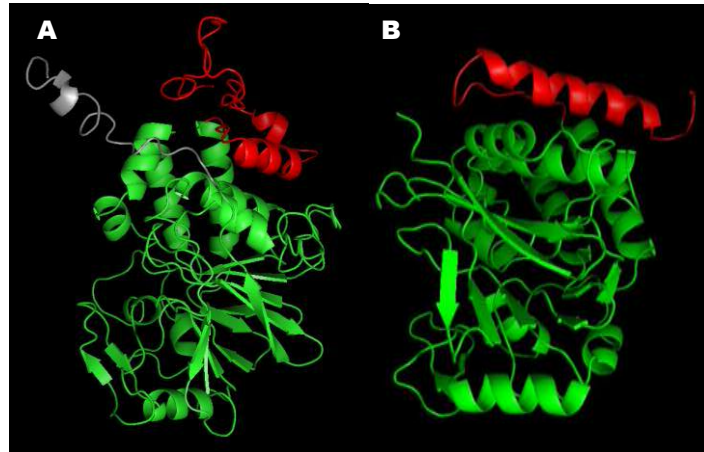
Anexo V

Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos codificada por los genes ortólogos de LinJ.34.0850 en los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. Se muestra el grado de identidad de las secuencias de aminoácidos de la PP1 ortólogas a la proteína codificada por el gen LinJ.34.0850 de *L. infantum* en diferentes especies del género *Leishmania* (A) y *Trypanosoma* (B). Número de acceso GeneDB: *L. braziliensis* (LbrM.20.0730); *L. mexicana* (LmxM.33.0810); *L. donovani* (LdBPK_340850.1); *L. major* (LmjF.34.0810); *T. cruzi*¹ (TcCLB.438059.10); *T. cruzi*² (TcCLB.509633.50); *T. cruzi*³ (TcCLB.509633.60).



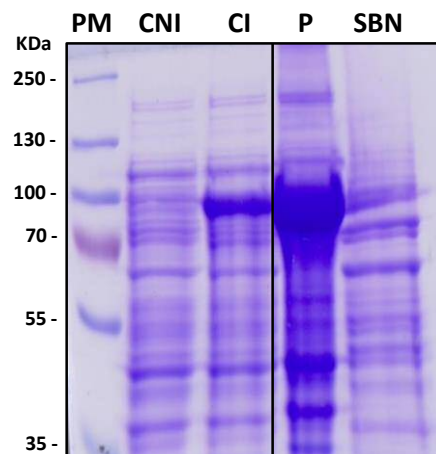
Anexo VI

Representación de la estructura tridimensional predictiva de las proteínas fosfatasas PP1-240 (A) y PP1-840 (B) de *L. infantum*. Se destaca: núcleo catalítico (verde); extremo N-terminal divergente (rojo); extremo C-terminal exclusivo de PP1-240 (gris).



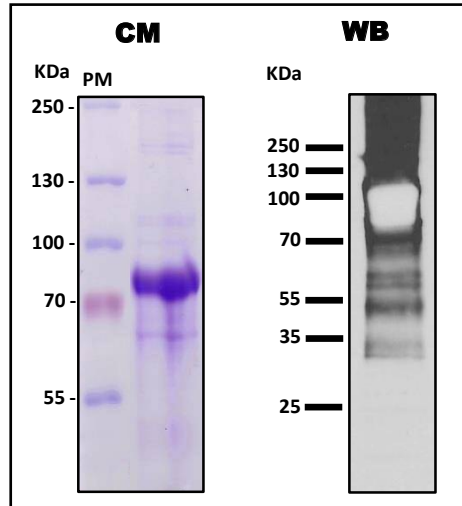
Anexo VII

Análisis de solubilidad de la proteína PP1-240-MBP en la cepa hospedadora *E. coli* SHuffle. Electroforesis en SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos a partir de la cepa de *E. coli* SHuffle transformada con el vector pETM-41-PP1-240 para evaluar la solubilidad de la proteína PP1-240-MBP. PM: peso molecular; CNI: cultivo no inducido; CI: cultivo inducido; P: fracción de proteínas insolubles tras la lisis del cultivo inducido; SBN: fracción de proteínas solubles tras la lisis del cultivo inducido. Tinción: azul de Coomassie. La proteína PP1-240 fue expresada de acuerdo al protocolo adaptado de Kelker y col., 2009 (sección 4.2.1).



Anexo VIII

Identificación de las formas incompletas de la proteína PP1-840-MBP purificada por cromatografía de afinidad con níquel. **CM:** electroforesis en SDS-PAGE de PP1-840-MBP purificada. Tinción: azul de *Coomassie* **WB:** identificación por *Western blot* de las bandas presentes en la fracción purificada PP1-840-MBP mediante un anticuerpo monoclonal anti-6xHis (dilución 1:1.000).



Anexo IX

Estudio de la frecuencia de codones raros presentes en LinJ.34.0840.

➤ **LinJ.34.0840**

ATG AGC GAA TCC GTG TTT **CCC** CTG GTA CAG AGT ATC GTG GAG AAG ATG CTC ACC GGC GGC
 GAC AAT CGC TTC CAG CGC CAA ATC CTC ATC AAG GAA GAG GAG ATC CGC GCT GTG CTG CGC
 GCC GTT **CGA** GAG GTG TTC ATG TCG CAG CCA ATG CTG CTC GAG ATC CGC CCG CCT GTG CGC
 GTG TGT GGC GAC **ACG** CAC **GGA** CAG TAC TAC GAC CTG CTG CGC ATC TAC GAG AAG TGC GGC
 TTC **CCC** CCA TAC TCG AAC TAC CTG TTC CTC GGC GAC TAC GTT GAC CGC GGC AAG CAC AGC
 GTC GAG **ACG** ATC GTC CTG CAG TTC TGC TAC AAG ATT GTG TAC **CCC** GAG AAC TTC TTT CTT
 CTG CGC GGC AAC CAC GAG TGC GCT AGC ATC AAC AAG ATG TAC **GGG** TTT TTC GAT GAT GTG
 AAG **CGG CGG** TAT AAC ATC AAG CTG TTC AAG GCG TTC **ACG** GAC GTG TTC
 AAC **ACG** ATG **CCC** GTG TGC TGC GTG ATT AGC GAG AAG ATC ATC TGC ATG CAC GGT GGC CTT
 AGC CCT GAC CTG ACC TCT GTA GCG TCC GTT ATG GAC ATC GAG CGT CCG TGC GAC GTG CCT
 GAT CGC GGC ATC CTG TGC GAT CTG CTG TGG GCG GAC CCG GAG GAT GAC GTG CAG GGC TTC
 CTG GAG AGC GAC CGC GGC GTG AGC TAC CTG TTC GGC GAG GAC ATT GTG AAC GAC TTC CTG
 GAC ATG GTG GAC ATG GAC CTG ATT GTG CGC GCG CAC CAG GTG ATG GAG CGC GGC
 TAC **GGG** TTC TTT GCG AGC CGT CAG CTT GTG ACC GTG TTC TCT GCG CCG AAC TAC TGC GGT
 GAG TTC GAC AAC GAC GCT GCC GTG ATG AAC ATC GAC GAC AAG CTG CAG TGC TCC TTC CTC
 ATC ATT **CCC** GCA TCC CGT TAG

The Number of Bases in the above Sequence = 903

The Number of Codons in the above Sequence = 301

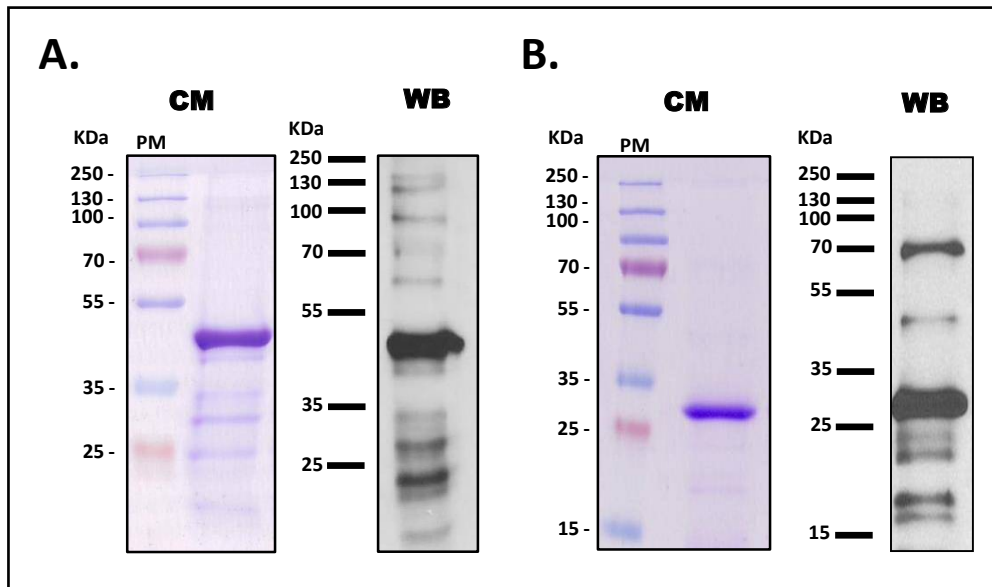
Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	1
	CGG	2
	AGG	0
	AGA	0
Glycine	GGA	1
	GGG	2
Isoleucine	AUA	0
Leucine	CUA	0
Proline	CCC	5
Threonine	ACG	4

Repeated and/or Consecutive Rare Codons

CGG CGG = 1

Anexo X

Identificación de las formas incompletas de la proteína PP1-240-R (A) y PP1C-34-R (B) en las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad con níquel CM: electroforesis de las fracciones purificadas en SDS-PAGE tras la tinción con azul de *Coomassie* WB: identificación por *Western blot* de las fracciones purificadas mediante un anticuerpo monoclonal anti-6xHis (dilución 1:1.000).



Anexo XI

Estudio de la frecuencia de codones raros presentes LinJ.15.0240 (A) y PP1C-34 (B)

A

➤ LinJ.15.0240

ATG GCA CAC **ACG** AAG **CGA GGG AGA** TTC ACC GTG GAT CTG TCC ATG TGT **ACG** CTC AGT AGC
 CTT CCT ACA GAT ACT CTC TCT GTG GAA AAA GAG AAT GAT GTG CTT TAC CGC CTT TTA GAA
 CTT CTT **CCC** GAG CGC TAC **ACG** AGC AAA GTT TTG GAA GAG CAG CGC ATT CCT GAG GGC CTC
 ATC GTG CAG ATT CTC ATC AAG GCA CGC GCT **AUA AUA** GCC AGT GAG CCG ATG GTT GTC GAA
 GTA GAT TCC CCT GTT TAC GCT TGC GGT GAT **CUA** CAC **GGG** CAG TAC TAC GAC TTG GTT AAC
 ATT TTC AAG **CGG** TGC CCA CCG CTT **GGA** GGC ACC GTT TTC **GGA** ACT GAT GCG AAG AAG GCA
 CGT AAA GAG ACC AGC TCA TCG ATC GAT GAT AAA ACA TAC AGC TTT CTG TTC CTT GGC GAT
 TAT GTC GAC CGC GGC GCT CGC TCC GTT GAG GTC GTT GTG ACA CTG CTC GCT CTC AAG ATT
 ATT TCT CCG **CGG** CAC ATG ACT ATG CTT CGC **GGA** AAC CAC GAG GAC GAA CAA ATC ATG CTC
 TTG TAT **GGA** TTT TAC GAC GAA TGC AAG **AGA** CGC TAT GGC ATT AAA CTT TTC AAA ATG TTC
 ACC GAT TTT TTT CGT GTT CTG CCT GTG GCG GCC **CUA** GTG AAC GGC TCT ATT TTC TGC GTT
 CAC GGC GGT CTC TCC GCG GAG CTC CGC TTC GTG **CGA** GAC ATC CCG GAC **ACG** CGC CCG TGC
 AAC GTC CCG CAC TCC GGC ATC ATT TGT GAC CTT CTG TGG GCA GAT **CCC** GAA ACT GAT CTG
 CCA GCT GGT GTG GAC TGG GCT CCG AGC TCG CGC **AGA** ATT TCA TCT GTG TTT TCC
 GAA **CGG** GCA CTG GAG **CGG** TTT TTA GTT GAG AAC GAC ATT GAT TTG GTG TGC CGC GCA CAT
 CAA GTG GTC GAA GAA **GGA** TTC CAG TTT TTC CCG GAT CAC AAA AAG **CGG** CAT TTG CTC ACC
 ATC TTT TCG GCA ACT AAC TAC TGC AAC GAG TTT **GGG** AAT **AGA** GGC GGC ATT TTA CGC GTG
 GAT GAG AAG GGT GTA TGC AGC ATC ATC **ACG** TTG GAA CCA CCA GAC TTT GTC CAG
 CAG **CGG** GAT ATC ATG CTT TTT **CGG** GAT CCG CTT CCA AAC CCT CTG AGC CAC GAC TGA

The Number of Bases in the above Sequence = 1125

The Number of Codons in the above Sequence = 375

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	2
	CGG	7
	AGG	0
	AGA	4
Glycine	GGA	5
	GGG	3
Isoleucine	AUA	2
Leucine	CUA	2
Proline	CCC	2
Threonine	ACG	5

Repeated and/or Consecutive Rare Codons

CGA GGG AGA = 1

AUA AUA = 1

B

➤ **PP1C-34**

ATG GAA GAG GAG ATC CGC GCT GTG CTG CGC GCC GTT **CGA** GAG GTG TTC ATG TCG CAG CCA ATG CTG
 CTC GAG ATC CGC CCG CCT GTG CGC GTG TGT GGC GAC **ACG** CAC **GGA** CAG TAC TAC GAC CTG CTG CGC
 ATC TAC GAG AAG TGC GGC TTC **CCC** CCA TAC TCG AAC TAC CTG TTC CTC GGC GAC TAC GTT GAC CGC
 GGC AAG CAC AGC GTC GAG **ACG** ATC GTC CTG CAG TTC TGC TAC AAG ATT GTG TAC **CCC** GAG AAC TTC
 TTT CTT CTG CGC GGC AAC CAC GAG TGC GCT AGC ATC AAC AAG ATG TAC **GGG** TTT TTC GAT GAT GTG
 AAG **CGG CGG** TAT AAC ATC AAG CTG TTC AAG GCG TTC **ACG** GAC GTG TTC AAC **ACG** ATG **CCC** GTG TGC
 TGC GTG ATT AGC GAG AAG ATC ATC TGC ATG CAC GGT GGC CTT AGC CCT GAC CTG ACC TCT GTA GCG
 TCC GTT ATG GAC ATC GAG CGT CCG TGC GAC GTG CCT GAT CGC GGC ATC CTG TGC GAT CTG CTG TGG
 GCG GAC CCG GAG GAT GAC GTG CAG GGC TTC CTG GAG AGC GAC CGC GGC GTG AGC TAC CTG TTC
 GGC GAG GAC ATT GTG AAC GAC TTC CTG GAC ATG GTG GAC ATG GAC CTG ATT GTG CGC GCG CAC CAG
 GTG ATG GAG CGC GGC TAC **GGG** TTC TTT GCG AGC CGT CAG CTT GTG ACC GTG TTC TCT GCG CCG AAC
 TAC TGC GGT GAG TTC GAC AAC GAC GCT GCC GTG ATG AAC ATC GAC GAC AAG CTG CAG TGC TCC TTC
 CTC ATC ATT **CCC** GCA TCC CGT TAG

The Number of Bases in the above Sequence = 813

The Number of Codons in the above Sequence = 271

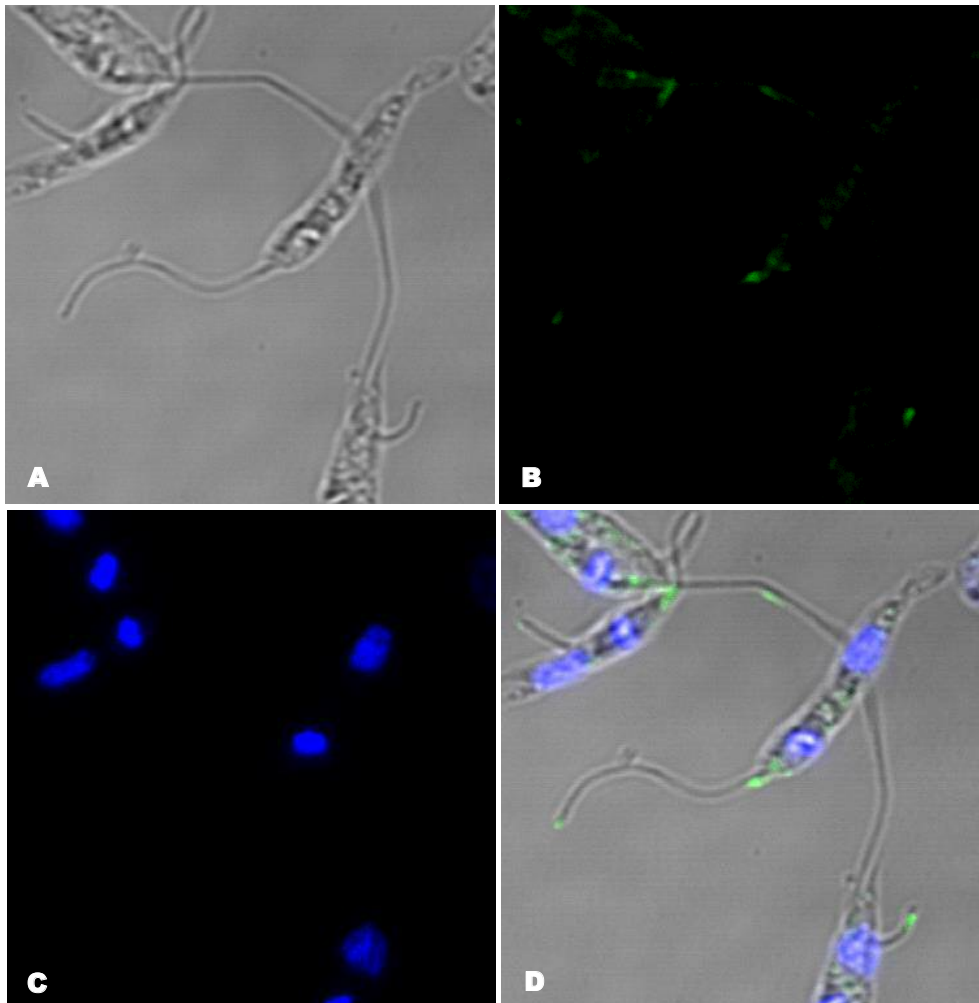
Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	1
	CGG	2
	AGG	0
	AGA	0
Glycine	GGA	1
	GGG	2
Isoleucine	AUA	0
Leucine	CUA	0
Proline	CCC	4
Threonine	ACG	4

Repeated and/or Consecutive Rare Codons

CGG CGG = 1

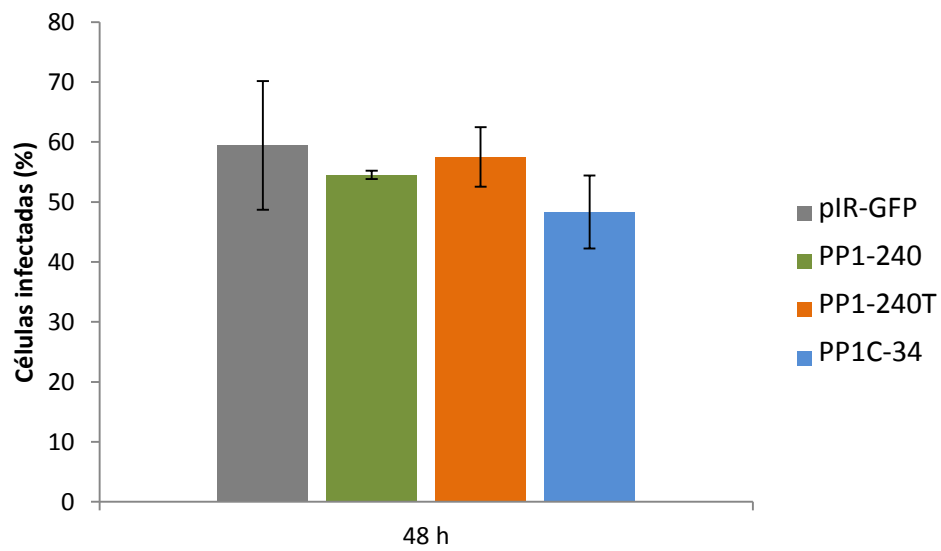
Anexo XII

Detalle de la localización subcelular del *cluster* PP1-34 en promastigotes de *L. infantum*. Análisis mediante inmunofluorescencia indirecta de la localización subcelular del *cluster* PP1-34 en promastigotes de cultivo axénico. **A:** imagen de contraste interdifereencial; **B:** fluorescencia en verde de PP1-240 marcada con un anticuerpo anti-PP1C-34 asociado a un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488; **C:** fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto marcados con DAPI; **D:** composición de las imágenes DIC, DAPI y Alexa 488.



Anexo XIII

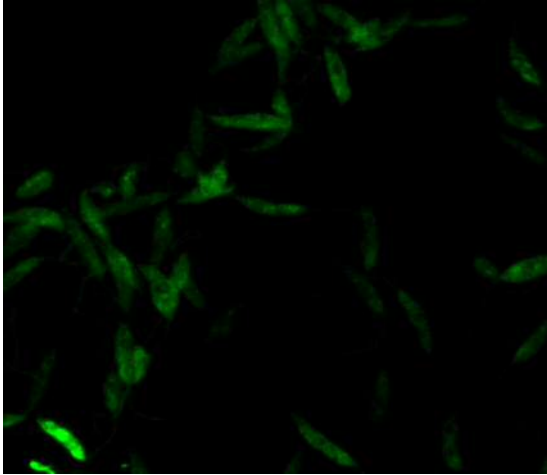
Estudio de la capacidad infectiva de promastigotes estacionarios procedentes de los transfectantes pIR-PP1-240-GFP, pIR-PP1-240T-GFP y pIR-PP1C-34-GFP respecto a la línea control pIR-GFP.



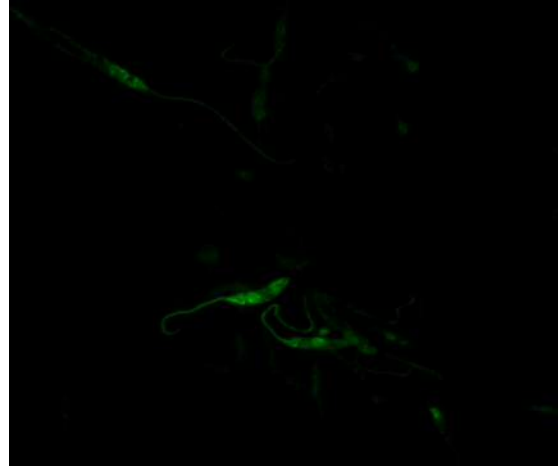
Anexo XIV

Análisis por microscopía confocal de promastigotes logarítmicos transfectados con el vector de sobre-expresión pIR-GFP (A) y pIR-PP1-240-GFP (B).

A



B



Anexo XV

Términos de GO asociados al conjunto de genes diferencialmente sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240 vs. pIR según el análisis de enriquecimiento. Los datos que se describen para cada término GO son: código de identificación según la base de datos GO; definición del término GO; ontología a la que pertenece: componente celular (C), función molecular (F) o proceso biológico (P); valor p según el test exacto de *Fisher*; número de genes presentes en la muestra asociados al término GO (N_{GO_m}); número de genes presentes en el genoma de referencia de *L. infantum* cepa JPCM5 asociados al término GO (N_{GO_g}). Los términos de GO se represen en la Figura 14 de acuerdo al valor p del test exacto de *Fisher*.

Identificador GO	Definición término GO	Ontología	N_{GO_m}	N_{GO_g}	p
GO:0031201	Complejo SNARE	C	1	1	0,008
GO:0044444	Componente citoplasmático	C	11	619	0,009
GO:0043232	Orgánulo intracelular no delimitado por membrana	C	7	331	0,017
GO:0005840	Ribosoma	C	5	187	0,018
GO:0043228	Orgánulo no delimitado por membrana	C	7	337	0,019
GO:0030529	Complejo ribonucleoproteico	C	5	215	0,031
GO:0005737	Citoplasma	C	11	777	0,044
GO:0004756	Actividad selenofosfato sintetasa	F	1	1	0,008
GO:0005484	Actividad receptor SNAP	F	1	1	0,008
GO:0047040	Actividad pteridina reductasa	F	1	1	0,008
GO:0047873	Actividad dolicol fosfato fosfatasa	F	1	1	0,008
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosomas	F	5	180	0,015
GO:0016781	Actividad fosfotransferasa	F	1	2	0,017
GO:0004362	Actividad glutatión reductasa	F	1	2	0,017
GO:0004799	Actividad timidilato sintetasa	F	1	2	0,017
GO:0042083	Actividad metiltransferasa dependiente de 5,10-metilentetrahidrofolato	F	1	2	0,017
GO:0015037	Actividad péptido disulfuro óxido-reductasa	F	1	3	0,025
GO:0015038	Actividad glutatión disulfuro óxido-reductasa	F	1	3	0,025
GO:0004616	Actividad fosfogluconato-deshidrogenasa	F	1	3	0,025
GO:0004422	Actividad hipoxantina fosforribosil transferasa	F	1	3	0,025
GO:0005198	Actividad molécula estructural	F	5	205	0,026
GO:0003899	Actividad RNA-polimerasa dirigida a DNA	F	2	33	0,030
GO:0034062	Actividad RNA polimerasa	F	2	34	0,032
GO:0004143	Actividad diacilglicerol quinasa	F	1	5	0,041
GO:0000049	Unión a ARNt	F	1	6	0,049
GO:0002101	Modificación citosina oscilante del ARNt	P	1	1	0,008
GO:0019889	Procesos metabólicos de pteridina	P	1	1	0,008
GO:0002097	Modificación de la base oscilante del ARNt	P	1	2	0,017
GO:0010467	Expresión génica	P	8	468	0,034
GO:0007205	Activación de proteína quinasa C por proteína G	P	1	5	0,041
GO:0034599	Respuesta celular a estrés oxidativo	P	1	6	0,049

Anexo XVI

Términos de GO asociados al conjunto de genes diferencialmente sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1-240T vs. pIR según el análisis de enriquecimiento. Los datos que se describen para cada término GO son: código de identificación según la base de datos GO, definición del término GO, ontología a la que pertenece: componente celular (C), Función Molecular (F) o Proceso biológico (P), valor p según el test exacto de *Fisher*, número de genes presente en la muestra asociados al término GO (N_{GO}); número de genes presente en el genoma de referencia de *L. infantum* cepa JPCM5 asociados al término GO ($N_{GO-JPCM5}$). Los términos GO son representados en la Figura 16 de acuerdo al valor p del test exacto de *Fisher*.

Identificador GO	Definición término GO	Ontología	N_{GO_m}	N_{GO_g}	p
GO:0030529	Complejo ribonucleoproteico	C	9	215	0,000
GO:0005840	Ribosoma	C	8	187	0,000
GO:0043232	Orgánulo intracelular no delimitado por membrana	C	9	331	0,001
GO:0043228	Orgánulo no delimitado por membrana	C	9	337	0,001
GO:0044444	Componente citoplasmático	C	12	619	0,001
GO:0032991	Complejo macromolecular	C	11	533	0,001
GO:0043229	Orgánulo intracelular	C	14	845	0,002
GO:0043226	Orgánulo	C	14	882	0,003
GO:0031201	Complejo <i>SNARE</i>	C	1	1	0,008
GO:0005737	Citoplasma	C	12	777	0,008
GO:0044424	Componente intracelular	C	15	1137	0,011
GO:0005622	Intracelular	C	16	1322	0,020
GO:0044464	Componente celular	C	16	1373	0,028
GO:0005623	Célula	C	16	1373	0,028
GO:0042719	Complejo proteico transportador del espacio mitocondrial intermembrana	C	1	4	0,030
GO:0005758	Espacio intermembrana mitocondrial	C	1	6	0,045
GO:0031970	Espacio intermembrana de orgánulo	C	1	6	0,045
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosomas	F	8	180	0,000
GO:0005198	Actividad de molécula estructural	F	8	205	0,000
GO:0005484	Actividad receptor SNAP	F	1	1	0,008
GO:0008531	Actividad riboflavina quinasa	F	1	1	0,008
GO:0004671	Actividad C-terminal S-isoprenilcisteína carboxil O-metil-transferasa	F	1	1	0,008
GO:0004756	Actividad selenofosfato sintetasa	F	1	1	0,008
GO:0003880	Actividad C-terminal carboxil O-metil-transferasa	F	1	1	0,008
GO:0016781	Actividad fosfotransferasa	F	1	2	0,015
GO:0051998	Actividad proteína carboxil O-metil-transferasa	F	1	2	0,015
GO:0010340	Actividad carboxil O-metil-transferasa	F	1	2	0,015
GO:0004362	Actividad glutatión reductasa	F	1	2	0,015
GO:0015038	Actividad glutatión disulfuro óxido-reductasa	F	1	3	0,023
GO:0015037	Actividad péptido disulfuro óxido-reductasa	F	1	3	0,023
GO:0008171	Actividad O-metil-transferasa	F	1	4	0,030
GO:0004143	Actividad diacilglicerol quinasa	F	1	5	0,037
GO:0000049	Unión a ARNt	F	1	6	0,045
GO:0006412	Traducción	P	8	270	0,001
GO:0010467	Expresión génica	P	9	468	0,006

Anexos

Identificador GO	Definición término GO	Ontología	N GO _m	N GO _g	p
GO:0006771	Procesos metabólicos de riboflavina	P	1	1	0,008
GO:0018410	Modificación del extremo C-terminal de proteínas	P	1	1	0,008
GO:0006481	Metilación del extremo C-terminal de proteínas	P	1	1	0,008
GO:0042726	Procesos metabólicos de compuestos con flavina	P	1	1	0,008
GO:0042727	Procesos biosintéticos de compuestos con flavina	P	1	1	0,008
GO:0009231	Procesos biosintéticos de riboflavina	P	1	1	0,008
GO:0034645	Procesos biosintéticos de macromoléculas celulares	P	8	429	0,012
GO:0009059	Procesos biosintéticos de macromoléculas	P	8	433	0,013
GO:0044267	Procesos metabólicos de proteínas celulares	P	11	769	0,021
GO:0045039	Transporte de proteínas al lumen mitocondrial	P	1	4	0,030
GO:0090151	Establecimiento de proteínas en la membrana mitocondrial	P	1	4	0,030
GO:0044260	Procesos metabólicos de macromoléculas celulares	P	14	1145	0,030
GO:0009987	Procesos celulares	P	21	2030	0,032
GO:0006766	Procesos metabólicos de vitaminas	P	1	5	0,037
GO:0006767	Procesos metabólicos de vitaminas solubles en agua	P	1	5	0,037
GO:0007205	Activación de proteína quinasa C por proteína G	P	1	5	0,037
GO:0042364	Procesos biosintéticos de vitaminas solubles en agua	P	1	5	0,037
GO:0006479	Metilación de proteínas	P	1	5	0,037
GO:0008213	Alquilación de proteínas	P	1	5	0,037
GO:0009110	Procesos biosintéticos de vitaminas	P	1	5	0,037
GO:0007007	Organización de la membrana mitocondrial interna	P	1	6	0,045

Anexo XVII

Términos GO asociados al conjunto de genes de genes diferencialmente sub-expresados a día 1 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR según el análisis de enriquecimiento. Los datos que se describen para cada término GO son: código de identificación según la base de datos GO; definición del término GO; ontología a la que pertenece: componente celular (C), función molecular (F) o proceso biológico (P); valor p según el test exacto de Fisher; número de genes presentes en la muestra asociados al término GO (N_{GO_m}); número de genes presentes en el genoma de referencia de *L. infantum* cepa JPCM5 asociados al término GO (N_{GO_g}). Los términos GO son representados en la Figura 23 de acuerdo al valor p del test exacto de Fisher.

Identificador GO	Definición término GO	Ontología	N_{GO_m}	N_{GO_g}	p
GO:0030529	Complejo ribonucleoproteico	C	10	215	0,000
GO:0005840	Ribosoma	C	9	187	0,000
GO:0043232	Orgánulo intracelular no delimitado por membrana	C	11	331	0,001
GO:0043228	Orgánulo no delimitado por membrana	C	11	337	0,001
GO:0043229	Orgánulo intracelular	C	18	845	0,002
GO:0043226	Orgánulo	C	18	882	0,004
GO:0032991	Complejo macromolecular	C	12	533	0,010
GO:0044444	Componente citoplasmático	C	13	619	0,013
GO:0031377	Complejo mitocondrial tipo II ácido graso sintasa	C	1	3	0,033
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosomas	F	9	180	0,000
GO:0005198	Actividad de molécula estructural	F	9	205	0,000
GO:0016836	Actividad hidrolasa	F	2	11	0,006
GO:0016835	Actividad carbono-oxígeno liasa	F	2	14	0,010
GO:0004756	Actividad selenofosfato sintetasa	F	1	1	0,011
GO:0004045	Actividad aminoacil-ARNt hidrolasa	F	1	2	0,022
GO:0004872	Actividad receptora	F	1	2	0,022
GO:0019171	Actividad 3-hidroxiacil dehidratasa	F	1	2	0,022
GO:0008124	Actividad 4- α -hidroxitetrahydrobiopterina dehidratasa	F	1	2	0,022
GO:0016781	Actividad fosfotransferasa	F	1	2	0,022
GO:0004362	Actividad glutatión reductasa	F	1	2	0,022
GO:0004616	Actividad fosfogluconato dehidrogenasa	F	1	3	0,033
GO:0015038	Actividad glutatión disulfuro óxido reductasa	F	1	3	0,033
GO:0015037	Actividad péptido disulfuro óxido-reductasa	F	1	3	0,033
GO:0004222	Actividad metaloendopeptidasa	F	2	29	0,040
GO:0006412	Traducción	P	10	270	0,001
GO:0010467	Expresión génica	P	13	468	0,001
GO:0034645	Procesos biosintéticos de macromoléculas celulares	P	11	429	0,006
GO:0009059	Procesos biosintéticos de macromoléculas	P	11	433	0,006
GO:0006729	Procesos biosintéticos de tetrahydrobiopterina	P	1	2	0,022
GO:0046146	Procesos metabólicos de tetrahydrobiopterina	P	1	2	0,022
GO:0006414	Elongación de proteínas durante la traducción	P	2	28	0,037
GO:0065004	Ensamblaje de complejos proteína-ADN	P	2	30	0,042
GO:0034728	Organización nucleosomas	P	2	30	0,042
GO:0031497	Ensamblaje de cromatina	P	2	30	0,042
GO:0006334	Ensamblaje de nucleosomas	P	2	30	0,042
GO:0071824	Organización de complejos proteína-ADN	P	2	30	0,042
GO:0006323	Empaquetamiento del ADN	P	2	31	0,045
GO:0044249	Procesos biosintéticos celulares	P	12	662	0,049

Anexo XVIII

Términos GO asociados al conjunto de genes de genes diferencialmente sub-expresados a día 3 en promastigotes transfectados con pIR-PP1C-34 vs. pIR según el análisis de enriquecimiento. Los datos que se describen para cada término GO son: código de identificación según la base de datos GO; definición del término GO; ontología a la que pertenece: componente celular (C), función molecular (F) o proceso biológico (P); valor p según el test exacto de Fisher; número de genes presentes en la muestra asociados al término GO (N_{GO_m}); número de genes presentes en el genoma de referencia de *L. infantum* cepa JPCM5 asociados al término GO (N_{GO_g}). Los términos GO son representados en la Figura 24 de acuerdo al valor p del test exacto de Fisher.

Identificador GO	Definición término GO	Ontología	N_{GO_m}	N_{GO_g}	p
GO:0030529	Complejo ribonucleoproteico	C	15	215	0,000
GO:0005840	Ribosoma	C	14	187	0,000
GO:0043232	Orgánulo intracelular no delimitado por membrana	C	17	331	0,000
GO:0043228	Orgánulo no delimitado por membrana	C	17	337	0,000
GO:0032991	Complejo macromolecular	C	20	533	0,000
GO:0043226	Orgánulo	C	23	882	0,000
GO:0043229	Orgánulo intracelular	C	22	845	0,000
GO:0044444	Componente citoplasmático	C	17	619	0,001
GO:0005622	Intracelular	C	27	1322	0,001
GO:0044424	Componente intracelular	C	24	1137	0,001
GO:0044464	Componente celular	C	27	1373	0,001
GO:0005623	Célula	C	27	1373	0,001
GO:0005737	Citoplasma	C	17	777	0,007
GO:0031429	Complejo RNPsno H/ACA box	C	1	1	0,012
GO:0072588	Complejo RNP H/ACA box	C	1	1	0,012
GO:0020018	Membrana del bolsillo ciliar	C	1	2	0,024
GO:0005732	Complejo ribonucleoproteico pequeño nucleolar	C	1	2	0,024
GO:0044452	Componente nucleolar	C	1	3	0,035
GO:0060170	Membrana ciliar	C	1	4	0,047
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosomas	F	14	180	0,000
GO:0005198	Actividad de molécula estructural	F	14	205	0,000
GO:0016859	Actividad <i>cis-trans</i> isomerasa	F	3	21	0,002
GO:0003755	Actividad peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa	F	3	21	0,002
GO:0004756	Actividad selenofosfato sintetasa	F	1	1	0,012
GO:0016853	Actividad isomerasa	F	4	81	0,015
GO:0004129	Actividad citocromo c oxidasa	F	1	2	0,024
GO:0016675	Actividad óxido-reductasa (hemo donador)	F	1	2	0,024
GO:0016676	Actividad óxido-reductasa (hemo donador, oxígeno aceptor)	F	1	2	0,024
GO:0016781	Actividad fosfotransferasa	F	1	2	0,024
GO:0015002	Actividad hemo-cobre terminal oxidasa	F	1	2	0,024
GO:0000774	Actividad factor intercambiador nucleótido-adenilina	F	1	2	0,024
GO:0051082	Unión a proteínas no plegadas	F	3	55	0,027
GO:0060590	Actividad reguladora ATPasa	F	1	3	0,035
GO:0030515	Unión a ARNsno	F	1	3	0,035
GO:0000175	Actividad 3'-5'-exorribonucleasa	F	1	4	0,047
GO:0042803	Actividad de homodimerización de proteínas	F	1	4	0,047
GO:0006412	Traducción	P	14	270	0,000
GO:0010467	Expresión génica	P	17	468	0,000
GO:0044267	Procesos metabólicos de proteínas celulares	P	21	769	0,000
GO:0034645	Procesos biosintéticos de macromoléculas celulares	P	15	429	0,000
GO:0009059	Procesos biosintéticos de macromoléculas	P	15	433	0,000

Identificador GO	Definición término GO	Ontología	N GO _m	N GO _g	p
GO:0019538	Procesos metabólicos de proteínas	P	22	885	0,000
GO:0044260	Procesos metabólicos de macromoléculas celulares	P	25	1145	0,001
GO:0006457	Plegamiento de proteínas	P	6	88	0,001
GO:0043170	Procesos metabólicos de macromoléculas	P	26	1270	0,001
GO:0009058	Procesos biosintéticos	P	17	708	0,002
GO:0044249	Procesos biosintéticos celulares	P	16	662	0,003
GO:1901576	Procesos biosintéticos de compuestos orgánicos	P	16	678	0,004
GO:0007021	Ensamblaje de compuestos de tubulina	P	1	1	0,012
GO:0044007	Transmisión de un organismo desde el hospedador	P	1	1	0,012
GO:0044008	Transmisión vectorial de un organismo desde el hospedador	P	1	1	0,012
GO:0007131	Recombinación meiótica recíproca	P	1	1	0,012
GO:0007127	Meiosis I	P	1	1	0,012
GO:0051822	Transmisión de un organismo desde otro organismo (simbiosis)	P	1	1	0,012
GO:0051821	Transmisión vectorial de un organismo desde otro organismo (simbiosis)	P	1	1	0,012
GO:0035825	Recombinación de ADN recíproca	P	1	1	0,012
GO:0072668	Biogénesis de complejos de tubulina	P	1	1	0,012
GO:1903046	Procesos meióticos del ciclo celular	P	1	1	0,012
GO:0044237	Procesos metabólicos celulares	P	27	1621	0,020
GO:0051321	Meiosis	P	1	2	0,024
GO:0016073	Procesos metabólicos de ARNsn	P	1	2	0,024
GO:0007126	División meiótica nuclear	P	1	2	0,024
GO:0031120	Síntesis de pseudouridina ARNsn	P	1	2	0,024
GO:0040031	Modificación de ARNsn	P	1	2	0,024
GO:0000003	Reproducción	P	1	2	0,024
GO:0006743	Procesos metabólicos de ubiquinona	P	1	3	0,035
GO:0006744	Procesos biosintéticos de ubiquinona	P	1	3	0,035
GO:0042180	Procesos metabólicos de cetona	P	1	3	0,035
GO:0042181	Procesos biosintéticos de cetona	P	1	3	0,035
GO:1901661	Procesos metabólicos de quinona	P	1	3	0,035
GO:1901663	Procesos biosintéticos de quinona	P	1	3	0,035
GO:0006414	Elongación de proteínas durante la traducción	P	2	28	0,044
GO:0044238	Procesos metabólicos primarios	P	27	1724	0,045

