

Tesis Doctoral

Clonado, caracterización y estudios funcionales de las enzimas poli (ADP-ribosa)polimerasa y poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa de *Trypanosoma brucei*

Schlesinger, Mariana

2015-03-20

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Schlesinger, Mariana. (2015-03-20). Clonado, caracterización y estudios funcionales de las enzimas poli (ADP-ribosa)polimerasa y poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa de *Trypanosoma brucei*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Schlesinger, Mariana. "Clonado, caracterización y estudios funcionales de las enzimas poli (ADP-ribosa)polimerasa y poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa de *Trypanosoma brucei*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-20.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Clonado, caracterización y estudios funcionales de las enzimas
poli(ADP-ribosa)polimerasa y poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa
de *Trypanosoma brucei*.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Biológica

Mariana Schlesinger

Director de tesis: Dra. Silvia H. Fernandez Villamil

Consejero de estudios: Dra. Silvia Moreno

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología
Molecular (INGEBI) “ Dr. Héctor N. Torres”.

Buenos Aires 2015

Fecha de defensa: 20 de Marzo de 2015

Clonado, caracterización y estudios funcionales de las enzimas poli(ADP-ribosa)polimerasa y poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa de *Trypanosoma brucei*.

Resumen

El metabolismo de polímeros de ADP-ribosa (PAR) está involucrado en múltiples funciones celulares, como la señalización y reparación del ADN, el mantenimiento de la integridad genómica, la decisión entre la supervivencia y muerte celular y el mecanismo de muerte. Poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) y poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa (PARG) son las proteínas involucradas en esta vía metabólica. PARP es la enzima encargada de sintetizar al polímero, mientras que PARG es responsable de su degradación. En *Trypanosoma brucei* ambas proteínas, denominadas TbPARP y TbPARG, son codificadas por un gen de copia única. En la presente tesis se muestra la caracterización de la actividad de TbPARP *in vitro* en la reacción de PARilación. Estudios funcionales de TbPARP y TbPARG en el contexto del parásito permitieron identificar su localización subcelular en condiciones normales y de estrés oxidativo. También se describe aquí la cinética de aparición de PAR en el núcleo. Mediante la obtención de líneas transgénicas de parásitos procíclicos sobre-expresantes de TbPARP y silenciados (ARNi) para ambas enzimas se realizaron ensayos de supervivencia a distintas concentraciones del agente genotóxico H₂O₂. Los mismos presentaron diferentes grados de citotoxicidad y variaciones en el mecanismo de muerte celular de acuerdo a la presencia o ausencia de polímero en el núcleo. También se estudió el efecto de la acumulación nuclear del polímero sobre la progresión del ciclo celular en cultivos transgénicos sincronizados.

Palabras claves: *Trypanosoma brucei*, PARP, PARG, PAR, ciclo celular, estrés oxidativo, Enfermedad del sueño.

**Cloning, characterization and functional studies of
poly(ADP-ribose)polymerase and poly(ADP-ribose)glycohydrolase
enzymes of *Trypanosoma brucei*.**

Summary

Poly(ADP-ribose)polymerase (PAR) metabolism is involved in multiple cellular functions such as DNA signaling and repair, maintenance of genomic integrity, switching between cell survival and death, and decision of death pathways. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) and poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG) are proteins involved in this metabolic pathway. PARP synthesizes the polymer while PARG is in charge of its hydrolysis. In *Trypanosoma brucei* both proteins, named TbPARP and TbPARG, are codified by a single copy gene. The present thesis shows the characterization of *in vitro* activity of TbPARP carried out in the PARylation reaction. Functional studies of TbPARP and TbPARG in the context of the parasite allowed the identification of their subcellular localization in normal conditions and under oxidative stress. Kinetics of PAR appearance in the nucleus is also described here. We obtained transgenic lines of procyclic parasites which over-expressed TbPARP or down-regulated both enzymes to perform survival assays at different concentrations of the genotoxic agent H₂O₂. They presented variation in the cytotoxicity levels and in the death pathway involved according to the presence or absence of PAR in the nucleus. It has also been studied the effect of PAR nuclear accumulation on cell cycle progression in synchronized transgenic cultures.

Key words: *Trypanosoma brucei*, PARP, PARG, PAR, cell cycle, oxidative stress, African trypanosomiasis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mirtha Flawiá y al Dr. Héctor Torres por haberme dado la posibilidad de comenzar a trabajar en el laboratorio “209” y poder realizar esta Tesis Doctoral.

Al CONICET por haberme otorgado la beca Doctoral y permitirme realizar este trabajo.

A mi directora, la Dra. Silvia Fernández Villamil, por su paciencia y confianza. Por el apoyo a todo lo que emprendí.

A mi directora de tesina, la Dra. Cristina Paveto, que con su alegría hace que el trabajo sea un esparcimiento. Al Dr. Guillermo Alonso por sus valiosos consejos, criterio y discusiones científicas.

A mis compañeros del 209. A Salo y Lau del grupo de las PAR, por compartir la ardua tarea de intentar hacer ciencia. A Ale por hacer del laboratorio un lugar más divertido. A Tami por su entusiasmo y energía por aprender. Y a los que ya no están: Pato, por haberme enseñado los primeros pasos en el laboratorio. A Cristian por haber sido mi guía con los cultivos de *T. brucei* y por sus charlas. A Mati, por estar siempre disponible cuando le preguntaba algo.

A Briardo Llorente, por haberme ayudado a ingresar al laboratorio y por ser una inspiración para cualquier científico.

Al resto de la gente del INGEBI, por su actitud de solidaridad y por generar un hermoso clima de trabajo. A Marta y Daniel, a Irma y Claudia; a Ruben, Norma, Gladys; y al resto de las personas que nos ayudan con las distintas tareas.

Al Dr. Lari Letiö por haberme permitido trabajar en su laboratorio en Finlandia y haberme permitido concretar una experiencia muy enriquecedora para mí, tanto en lo profesional como en lo humano.

A Marcos, por estar siempre cuando acudo a su ayuda para hacer los experimentos de citometría de flujo.

A Raul de la UNSAM por la gran paciencia y buena onda ante las consultas sobre los cultivos del estadio sanguíneo.

A Berti por haber planteado experimentos en conjunto y porque me enseñó a utilizar el programa Vector como nadie.

A Gabi Levi por haberme brindado su conocimiento y reactivos.

A mi familia: mi madre, mi padre y mi hermano por el apoyo incondicional. A Gus por aguantarme y quererme como soy. A mis amigos, por ser los mejores amigos que alguien pueda tener. A todos ellos, gracias totales por estar.

ABREVIATURAS

- 3'UTR: Untranslated Region - región no traducida 3'
- 3-AB: 3- Aminobenzamida
- 5'UTR: Untranslated Region - región no traducida 5'
- aa: aminoácido
- ADNa: ácido desoxirribonucleico activado
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNdc: ácido desoxirribonucleico doble cadena
- ADNk: ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
- ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ADNsc: ácido desoxirribonucleico simple cadena
- ADP-HPD: Adenosina difosfato (hidroximetil) pirrolidinediol
- ARH: ADP-ribosa hidrolasa
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNi: ARN de interferencia
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
- ARNt: ácido ribonucleico de transferencia
- BER: Base Excision Repair – Reparación por escisión de bases
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- BRCA: Breast Cancer
- BSA: seroalbúmina bovina
- cADN: ácido desoxirribonucleico complementario
- CICD: Caspase-Independent Cell Death – Muerte celular independiente de caspasas
- DAPI: 4':6-diamidino-2-fenilindol
- dcADN: ácido desoxirribonucleico doble cadena
- DTT: ditioneitol
- DSB: daño en el ADN de doble cadena
- E-64: trans-epoxysuccinil-L-leucil-amido-(4-guanidino) butano
- EN: envoltura nuclear
- ES: sitio de expresión de la VSG
- ESAGs: genes asociados al sitio de expresión de la VSG

ESB: cuerpo extra-nucleolar asociado al sitio de expresión de la VSG
eYFP: Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FCS: suero fetal de ternero
GGR: Global genome repair- Reparación global del genoma
GPI: glicosilfosfatidilinositol
hPARP-1: Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 humana
hPARP-2: Poli(ADP-ribosa) polimerasa 2 humana
HR: recombinación homóloga
HU: Hidroxiurea
IDL: insertion or deletion loops – bucles de inserciones o deleciones
IGEPAL: octilfenoxipolietoxietanol
IP: Ioduro de Propidio
IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kADN: ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
kb: kilo bases
kDa: kilo Daltons
LB: medio Luria-Bertani
mART: mono ADP-ribosil transferasa
MMEJ: Microhomology-mediated End Joining – Unión de extremos mediada por micro homología
MMR: Mismatch Repair – Reparación de bases mal apareadas
MTS: Mitochondrial signal – Señal mitocondrial
NAD⁺: Nicotinamida Adenina dinucleótido (forma oxidada)
NER: Nucleotide Excision Repair – Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ: Non Homologous End Joining – Unión de extremos no homólogos
NLS: Nuclear localisation signal – Señal de localización nuclear
NP-40: Nonidet P40
nt: nucleótidos
ORC: Complejo de reconocimiento del origen
ORF: Open Reading frame – Marco abierto de lectura
PAR: Poli (ADP-ribosa)
PARG: Poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa
PARP: Poli(ADP-ribosa) polimerasa
pb: pares de base
PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

HR: Recombinación homóloga
ROS: Reactive Oxygen Species – Especies reactivas de oxígeno
scADN: ácido desoxirribonucleico simple cadena
SDS: duodecil sulfato sódico
SFB: suero fetal bovino
SL: Splice leader - miniexón
SSB: Single-strand breaks – Daño en el ADN de cadena simple
TbPARP: Poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa de *Trypanosoma brucei*
TbPARP: Poli(ADP-ribosa) polimerasa de *Trypanosoma brucei*
TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina
TcPARG: Poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa de *Trypanosoma cruzi*
TcPARP: Poli(ADP-ribosa) polimerasa de *Trypanosoma cruzi*
TLS: Translesion synthesis - Síntesis de trans-lesión
VSG: glicoproteína variable de superficie
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE	8
INTRODUCCIÓN.....	14
ENFERMEDAD DEL SUEÑO	14
ETIOLOGÍA	14
CLÍNICA.....	14
DIAGNÓSTICO.....	16
TRATAMIENTO	16
EL PARÁSITO <i>Trypanosoma brucei</i>	17
ASPECTOS BIOLÓGICOS GENERALES DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS	17
CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO.....	17
BIOLOGÍA CELULAR DEL PARÁSITO.....	20
VARIACIÓN ANTIGÉNICA Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE	24
EL MATERIAL GENÉTICO	26
CICLO CELULAR.....	33
REPLICACIÓN DE LOS GENOMAS	37
MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN.....	41
MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN TRIPANOSOMÁTIDOS	48
LA PROTEÍNA PARP	51
ASPECTOS GENERALES.....	51
COMPOSICIÓN DE LOS DOMINIOS	57
ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LA PROTEÍNA TbPARP DE <i>Trypanosoma brucei</i>	59
ANTECEDENTES DE TcPARP EN <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
LA PROTEÍNA PARG	65
ASPECTOS GENERALES.....	65
ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LA PROTEÍNA TbPARG EN <i>Trypanosoma brucei</i>	68

ANTECEDENTES DE TcPARG EN <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
EL METABOLISMO DE PAR.....	71
SUPERVIVENCIA VERSUS MUERTE CELULAR	71
MECANISMOS DE REPARACIÓN.....	73
MUERTE CELULAR.....	78
HIPÓTESIS.....	84
OBJETIVOS	84
MATERIALES Y MÉTODOS	86
CULTIVOS DE BACTERIAS.....	86
CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	86
MEDIOS DE CULTIVO	86
ANTIBIÓTICOS.....	86
OTRAS SOLUCIONES.....	86
CULTIVOS DE <i>Trypanosoma brucei</i>	87
CEPAS DE <i>Trypanosoma brucei</i>	87
MEDIOS DE CULTIVO	87
INHIBIDORES DE PARP	87
INHIBIDORES DE PARG	87
VECTORES.....	87
VECTORES PARA BACTERIAS.....	87
VECTORES PARA PARÁSITOS	88
ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	89
BASES DE DATOS	89
PROGRAMAS.....	89
LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS.....	89
LISTA DE ANTICUERPOS UTILIZADOS	90
ÁCIDOS NUCLEICOS: METODOLOGÍAS	91
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	91
CLONADO	92
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR SHOCK TÉRMIC	93
SOUTHERN-BLOT	95
NORTHERN-BLOT	97
PROTEÍNAS: METODOLOGÍAS.....	98

EXTRACTOS PROTEICOS	98
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	99
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	100
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	101
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)	101
WESTERN-BLOT	102
DOT-BLOT	102
ENSAYOS DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>	103
ENSAYO DE RETARDO EN GEL (EMSA).....	104
SCREENING DE INHIBIDORES DE TbPARP	104
MODELADO POR HOMOLOGÍA Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL	105
PARÁSITOS: METODOLOGÍAS	105
CULTIVOS DE <i>T. brucei</i>	105
TRANSFORMACIÓN DE PARÁSITOS PROCÍCLICOS.....	107
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	108
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TbPARG <i>IN VIVO</i>	108
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	108
TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H ₂ O ₂)	109
INHIBICIÓN <i>IN VIVO</i> DE TbPARP EN CULTIVOS DE PARÁSITOS	109
ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO	110
EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H ₂ O ₂) EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR DE PARÁSITOS PROCÍCLICOS.....	111
SÍNTESIS DEL POLÍMERO EN RESPUESTA AL DAÑO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H ₂ O ₂) EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS	112
SINCRONIZACIÓN DE PARÁSITOS PROCÍCLICOS	112
MARCADO DE CÉLULAS CON IODURO DE PROPIDIO Y CITOMETRÍA DE FLUJO.....	112
ENSAYO DE ANNEXINA V/IODURO DE PROPIDIO.....	113
ANEXO.....	115
RESULTADOS Y DISCUSIONES	119
TbPARP Y TbPARG EN <i>Trypanosoma brucei</i>	119
ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y EXPRESIÓN <i>IN VIVO</i> DE TbPARP Y TbPARG	119
CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE TbPARP.....	123

EXPRESIÓN <i>IN VITRO</i> Y PURIFICACIÓN DE LA TbPARP RECOMBINANTE ..	123
ENSAYOS DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>	126
CINÉTICA ENZIMÁTICA Y CARACTERIZACIÓN DE TbPARP	130
SCREENING DE INHIBIDORES DE rTbPARP.....	135
MODELADO POR HOMOLOGÍA Y SELECTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES.....	137
CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE TbPARP	139
PRODUCCIÓN DE PAR A LO LARGO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	139
CINÉTICA DE LA FORMACIÓN Y DEGRADACIÓN DE PAR.....	140
PRODUCCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PAR EN PARÁSITOS SANGUÍNEOS....	142
CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE TbPARG.....	144
ACTIVIDAD DE TbPARG <i>IN VIVO</i>	144
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TbPARP Y TbPARG.....	146
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TbPARG.....	146
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TbPARP	146
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PAR	150
CO-LOCALIZACIÓN DE PAR Y TbPARP CON EL CUERPO BASAL	150
SUPERVIVENCIA CELULAR DE PARÁSITOS CARENTES DE UNA TbPARP FUNCIONAL.....	154
INHIBICIÓN <i>IN VIVO</i> DE TbPARP.....	154
ARN DE INTERFERENCIA DE TbPARP.....	157
MUERTE CELULAR POST-DAÑO GENÓMICO EN PARÁSITOS CARENTES DE UNA TbPARP FUNCIONAL.....	159
EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS CARENTES DE UNA TbPARP FUNCIONAL.....	159
MUERTE CELULAR POST-DAÑO GENÓMICO EN PARÁSITOS CARENTES DE TbPARG.....	161
ARN DE INTERFERENCIA DE TbPARG	161
PARÁSITOS PROCÍCLICOS TRANSGÉNICOS SOBRE-EXPRESANTES DE TbPARP	164
PARÁSITOS PROCÍCLICOS TRANSGÉNICOS SOBRE-EXPRESANTES DE TbPARP	164
CONSTRUCTOS TRUNCADOS DE TbPARP	167
GENERACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS	167
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS CONSTRUCTOS TRUNCADOS	169
EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS CON UNA EXPRESIÓN EXACERBADA DE PAR.....	174

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS SOBRE- EXPRESANTES DE TbPARP	174
EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS SOBRE- EXPRESANTES DE TbPARP	176
EFFECTO DEL NIVEL DE PAR NUCLEAR SOBRE EL CAMINO DE MUERTE CELULAR	178
CICLO CELULAR EN PROCÍCLICOS DE <i>T. brucei</i>	181
CICLO DE VIDA DE LOS PARÁSITOS PROCÍCLICOS DE <i>T. brucei</i>	181
CONCLUSIONES	191
PERSPECTIVAS	193
BIBLIOGRAFÍA.....	194

I NTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD DEL SUEÑO

ETIOLOGÍA

Trypanosoma brucei spp (que comprende *Trypanosoma brucei brucei* y las formas infectivas de humanos *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*) es el parásito responsable de la Enfermedad del Sueño Africana, también llamada Tripanosomiasis Africana. La misma está presente en 36 países al sur del Sahara en África. El parásito también infecta al ganado y a animales de caza, causándoles la enfermedad “Nagana”. De esta manera restringe el desarrollo de la economía, lo que contribuye a la pobreza de las zonas afectadas (Matthews 2005). Las personas más expuestas viven en zonas rurales y dependen de la agricultura, la pesca, la ganadería o la caza.

La estimación actual de la OMS indica que cerca de 30.000 personas se infectan cada año y más de 70 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (<http://www.who.int/MediaCentre/fichas/fs259/es/>). La misma representa una gran carga financiera para las personas que viven en África. Cuando es diagnosticada a tiempo se puede curar con medicina; sin embargo, es fatal cuando no es tratada. Un control sostenido ha disminuido el número de nuevos casos; los cuales, en 2009, estuvieron por debajo de 10.000 (9878) por primera vez en 50 años. En 2012 hubo 7.216 casos registrados.

El diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad son complejos y requieren de personal altamente calificado. Desafortunadamente, todas las drogas disponibles en la actualidad tienen efectos secundarios graves, por lo tanto el desarrollo de nuevos medicamentos es una necesidad urgente para la lucha contra este patógeno.

CLÍNICA

En ausencia de intervención terapéutica, como es cada vez más común, la Tripanosomiasis Africana humana se caracteriza por presentar dos fases patológicas principales.

En la primera etapa, los tripanosomas se encuentran en la circulación sistémica, espacios tisulares y tejidos linfáticos. La alta parasitemia circulante y la presencia de subproductos de la defensa inmunológica (principalmente moléculas del parásito tras

la lisis celular) conducen a un debilitamiento general del sistema inmune del huésped y a complicaciones en múltiples órganos (Field and Carrington 2009).

En etapas más avanzadas el parásito invade al sistema nervioso central luego de cruzar la barrera hemato-encefálica, probablemente en el plexo coroideo, aunque los detalles de este mecanismo permanecen sin develar. Esta última fase está acompañada de cambios de comportamiento bipolar, letargo, coma y finalmente la muerte (Field and Carrington 2009).

La progresión de la enfermedad depende de ambos, de la subespecie del parásito y de factores del hospedador. Además, la patología de la enfermedad es tan compleja que los mecanismos por los cuales las interacciones parásito-hospedador conducen al daño de órganos y a la supresión del sistema inmune siguen siendo poco claras (Field and Carrington 2009).

La evolución de la enfermedad del ganado en parte es similar pero, sorprendentemente, muchos animales nativos de África, entre ellos varias razas autóctonas de vacas, son refractarias a esta tripanosomiasis (Field and Carrington 2009).

Existen tres subespecies:

- *T. b. gambiense* se encuentra en 24 países de África occidental y central. Esta forma representa actualmente más del 98% de los casos reportados de la Enfermedad del Sueño y causa una infección crónica. Una persona puede estar infectada por meses o incluso años sin mayores signos o síntomas. Cuando los síntomas más evidentes aparecen, el paciente ya está a menudo en una etapa avanzada de la enfermedad, donde se ve afectado el sistema nervioso central.
- *T. b. rhodesiense* se encuentra en 13 países de África oriental y meridional. Hoy en día, esta forma representa menos del 2% de los casos reportados y causa una infección aguda. Los primeros signos y síntomas se observan unos pocos meses o semanas después de la infección. La enfermedad se desarrolla rápidamente e invade al sistema nervioso central. Sólo Uganda presenta ambas formas de la enfermedad.
- *T. b. brucei* causa la tripanosomiasis animal africana (o nagana). No es infectivo en humanos debido al "factor tripanolítico" prevalente en el suero humano.

DIAGNÓSTICO

El manejo de la enfermedad se realiza en tres pasos:

- Detección de la infección potencial: esto implica el uso de pruebas serológicas (sólo disponibles para *T.b. gambiense*) y el control de signos clínicos - generalmente ganglios cervicales inflamados.
- Diagnóstico de la presencia del parásito.
- Determinación del grado de avance de la enfermedad. Esto implica el examen del líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar. También se utiliza para determinar el resultado del tratamiento.

El diagnóstico debe hacerse lo antes posible para evitar que la enfermedad pase a la fase neurológica y deban utilizarse procedimientos terapéuticos complicados, difíciles y riesgosos.

TRATAMIENTO

El tipo de tratamiento depende de la etapa de la enfermedad. Los fármacos utilizados en la primera etapa son de menor toxicidad y más simples de administrar. Mientras más temprano se detecte la enfermedad, mayor es la posibilidad de curarse. El éxito del tratamiento en la segunda etapa depende de que el fármaco pueda cruzar la barrera hemato-encefálica para alcanzar al parásito. Tales fármacos son tóxicos y complicados de administrar.

Cuatro medicamentos están registrados para el tratamiento de la Enfermedad del Sueño. Estos medicamentos son donados a la OMS por los fabricantes y se distribuyen de forma gratuita a los países endémicos de la enfermedad.

❖ Tratamientos para la primera etapa de la enfermedad:

- Pentamidina: descubierto en 1941, se utiliza para el tratamiento de la primera etapa de la Enfermedad del Sueño causada por *T.b. gambiense*. A pesar de los efectos indeseados, en general es bien tolerada por los pacientes.
- Suramina: descubierto en 1921, se utiliza para el tratamiento de la primera etapa de *T.b. rhodesiense*. Provoca ciertos efectos indeseables en el tracto urinario y reacciones alérgicas.

❖ Tratamientos para la segunda etapa de la enfermedad:

- Melarsoprol: descubierto en 1949, se utiliza para ambas formas de la infección. Es un derivado del arsénico y tiene muchos efectos secundarios indeseables. El más

dramático es la encefalopatía reactiva (síndrome de encefalopatía) que puede ser fatal (3% a 10%). Se ha observado en varios focos un aumento en la resistencia a la droga, sobre todo en el centro de África.

- Eflornitina: esta molécula, menos tóxica que el melarsoprol, fue registrada en 1990. Sólo es eficaz contra *T.b. gambiense*. El régimen es estricto y difícil de aplicar.
- Un tratamiento combinado con Nifurtimox y Eflornitina se introdujo en 2009. Éste simplifica el uso de la Eflornitina en la monoterapia pero, por desgracia, no es eficaz para *T.b. rhodesiense*. El Nifurtimox se ha registrado para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana, pero no para la Tripanosomiasis Africana Humana. Sin embargo, después de los datos de seguridad y eficacia proporcionados por los ensayos clínicos, su uso en combinación con Eflornitina ha sido aceptado e incluido en la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS. A tal efecto, es proporcionado gratuitamente a los países endémicos.

EL PARÁSITO *Trypanosoma brucei*

ASPECTOS BIOLÓGICOS GENERALES DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS

Los tripanosomátidos son un grupo de protistas uniflagelados que pertenecen al orden taxonómico Kinetoplastida, caracterizado por presentar un ADN mitocondrial (ADNk) organizado en una estructura en forma de disco llamada **kinetoplasto**.

Aspectos interesantes de la biología fueron descritos por primera vez en estos microorganismos; como son el anclaje a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), el mecanismo de trans-splicing, la edición del ARNm y la transcripción policistronica de genes codificantes de proteínas (Field and Carrington 2009).

CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

T. brucei es un parásito digenético que presenta un ciclo de vida complejo (Fig. i1). El ciclo dual de *T. brucei* comprende a un vector, la mosca tsé-tsé (*Glossina* spp), y a un hospedador mamífero que puede incluir a seres humanos o a reservorios animales. Los reservorios animales abarcan tanto animales nativos salvajes como animales agrícolas domesticados, por lo que el control de este parásito representa un doble desafío (Field and Carrington 2009).

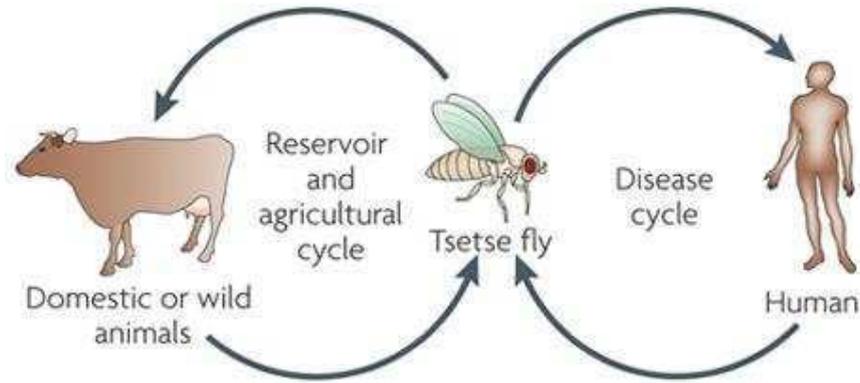


Figura i1: Hospedadores de *Trypanosoma brucei* (Field and Carrington 2009).

El ciclo de vida de *T. brucei* comienza cuando es ingerido por la mosca tsé-tsé durante la ingesta de sangre de un mamífero infectado, estableciéndose inicialmente en el intestino medio del artrópodo. Luego migra hacia las glándulas salivales, donde se prepara para la transmisión a un nuevo hospedador mamífero (Fig. i2) (Matthews 2005).

En el intestino medio de la mosca se generan formas procíclicas del parásito, las cuales son proliferativas y expresan Prociclina en su superficie. Una vez establecidos, los tripanosomátidos detienen su división y migran hacia las glándulas salivales de la mosca tsé-tsé, donde se adhieren como formas epimastigotes. Éstas son proliferativas y se unen al epitelio a través de su flagelo. A continuación se generan formas metacíclicas no proliferativas, las cuales adquieren en la cara externa de la membrana plasmática una cubierta de glicoproteínas variables de superficie (VSG) que sustituye al revestimiento de Prociclina (Matthews 2005).

En el interior del hospedador mamífero la forma sanguínea del parásito permanece libre en el torrente sanguíneo, evadiendo al sistema inmunológico por un mecanismo denominado variación antigénica; el cual implica la expresión secuencial de glicoproteínas de superficie (VSG) antigénicamente diferentes (Matthews 2005). Los tripanosomátidos en división son morfológicamente delgados (slender) y al incrementarse su número se reemplazan por formas cortas (stumpy) no proliferativas. El arresto de la división celular se produce en la fase G_1 ; de esta manera se asegura que los cambios morfológicos que se producen luego de la transmisión a la mosca tsé-tsé estén coordinados con el reinicio de un nuevo ciclo celular.

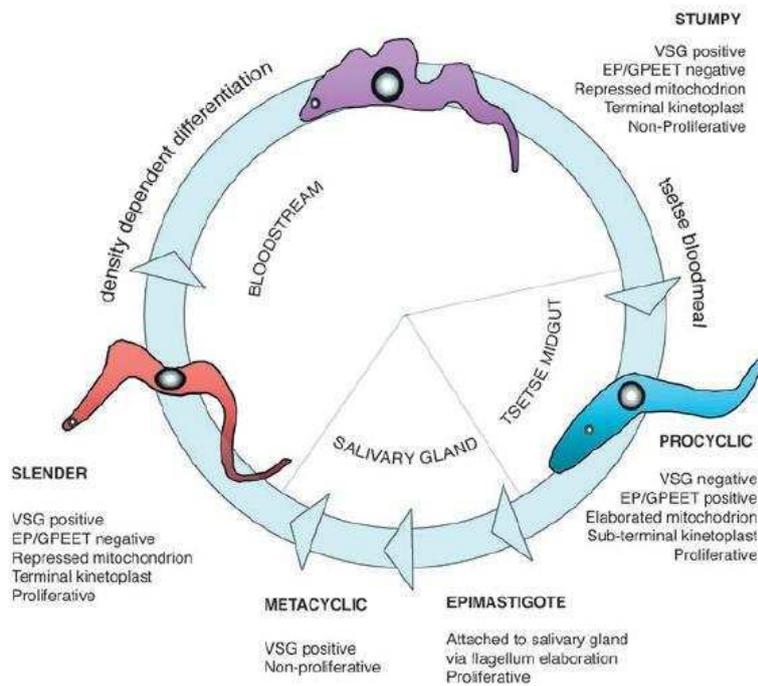


Figura i2: Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (Matthews 2005).

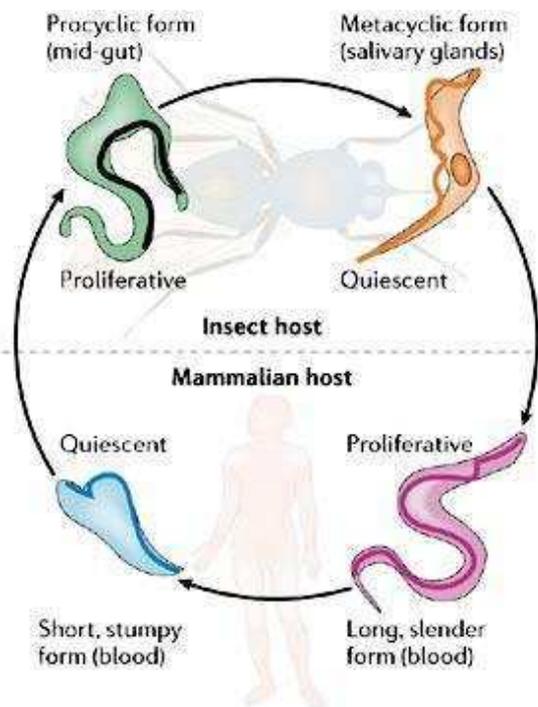


Figura i3: *Trypanosoma brucei* alterna entre formas proliferativas y formas quiescentes (Pays, Vanhollebeke et al. 2006).

Copyright © 2006 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Microbiology

Como se mencionó anteriormente, algunas etapas del ciclo de vida se arrestan y pre-adaptan a la vida del nuevo hospedador, como la forma corta del estadio sanguíneo (stumpy) y la forma metacíclica presente en las glándulas salivales de la mosca tsetse. Otros estadios sí proliferan, como la forma esbelta (slender) del estadio sanguíneo y la forma procíclica del insecto (Jones, Thomas et al. 2014) (Fig. i3). La mayoría de los estudios en *T. brucei* se han centrado en estas últimas formas del parásito, principalmente debido a que pueden ser cultivadas *in vitro* fácilmente (Matthews 2005).

La diferencia morfológica más notoria entre las distintas fases del ciclo de vida de *T. brucei* es la posición del kinetoplasto en relación al extremo posterior de la célula y al núcleo (Fig. i4). En las formas sanguíneas, el kinetoplasto se encuentra próximo al extremo posterior de la célula, y cada kinetoplasto hijo permanece en esta región durante todo el ciclo celular hasta la citocinesis. En las formas procíclicas el kinetoplasto está equidistante del núcleo y del extremo posterior. Por el contrario, en epimastigotes el kinetoplasto se encuentra en las antípodas; es decir, en el lado anterior (Matthews 2005).

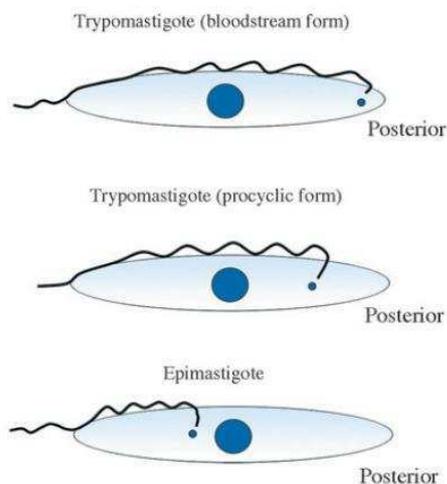


Figura i4: El kinetoplasto cambia su posición durante el ciclo de vida de *T. brucei*. Se muestra la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo y al extremo posterior de las formas sanguíneas, procíclicas, y en epimastigotes (Matthews 2005).

BIOLOGÍA CELULAR DEL PARÁSITO

La célula de *T. brucei* es alargada y tiene un citoesqueleto de microtúbulos altamente polarizado. El extremo menos de los microtúbulos mira hacia el lado anterior mientras que el extremo más hacia el posterior (Fig. i5). Esto define a la forma del parásito, que permanece intacta a lo largo de todo el ciclo celular. La duplicación del

citoesqueleto es semiconservativa y los microtúbulos hijos se montan e interdigitan entre los microtúbulos ya existentes. Los organelas de una sola copia (es decir, el bolsillo flagelar, el flagelo, el kinetoplasto, la mitocondria y el núcleo) están situadas en el corsé del citoesqueleto, entre el extremo posterior y el centro de la célula (Matthews 2005) (Fig.i6)

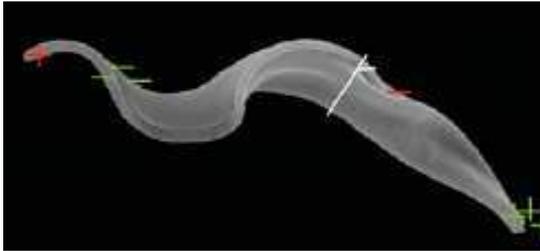


Figura i5: Micrografía electrónica de barrido. Se indica la polaridad de los microtúbulos subpeliculares en verde (+ y -) y la polaridad de los microtúbulos del flagelo en rojo (+ y -). (Vaughan and Gull 2008).

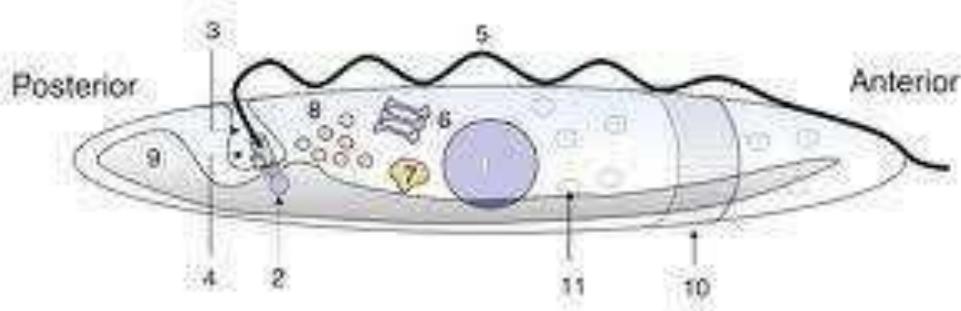


Figura i6: Arquitectura general de una célula de *T. brucei* (Matthews 2005). 1) Núcleo. 2) Kinetoplasto. 3) Bolsillo flagelar. 4) Cuerpo basal y cuerpo pro-basal. 5) Axonema y filamento paraflagelar. 6) Golgi. 7) Lisosoma. 8) Endosoma. 9) Mitocondrion. 10) Citoesqueleto microtubular. 11) Glicosomas.

La boca del bolsillo flagelar es la estructura más cercana al extremo posterior del parásito. Aquí es el punto de salida del flagelo, el cual está unido a la célula a lo largo de toda su longitud. El bolsillo flagelar es el único sitio donde se produce la endocitosis y la exocitosis; esto es importante sobre todo en la forma sanguínea, donde la superficie de la membrana está densamente cubierta con glicoproteínas variables de superficie (VSG).

Por otro lado, el único Golgi existente en el parásito se posiciona de manera estricta entre el núcleo y el bolsillo flagelar. Durante la división celular, el nuevo Golgi se forma *de novo* a partir de material procedente del viejo, y no del RE (Matthews 2005).

La motilidad de *T. brucei* depende exclusivamente de su flagelo, el cual posee una estructura de axonema convencional (9 + 2) asociada a un filamento paraflagelar (Fig. i7). El filamento paraflagelar es una estructura semirígida que está presente en los kinetoplastidos y euglenidos, y contribuye a la motilidad del parásito quizás haciendo más eficiente el golpe en el viscoso torrente sanguíneo del mamífero. La Tripanina contiene un dominio de unión a microtúbulos y parece estabilizar la interacción entre el flagelo y el citoesqueleto subpelicular, en una región llamada zona de fijación al flagelo. Esta unión parece impartir la direccionalidad del movimiento (Matthews 2005). La zona de fijación al flagelo se compone de una estructura filamentosa que conecta al cuerpo de la célula con el filamento paraflagelar del flagelo,

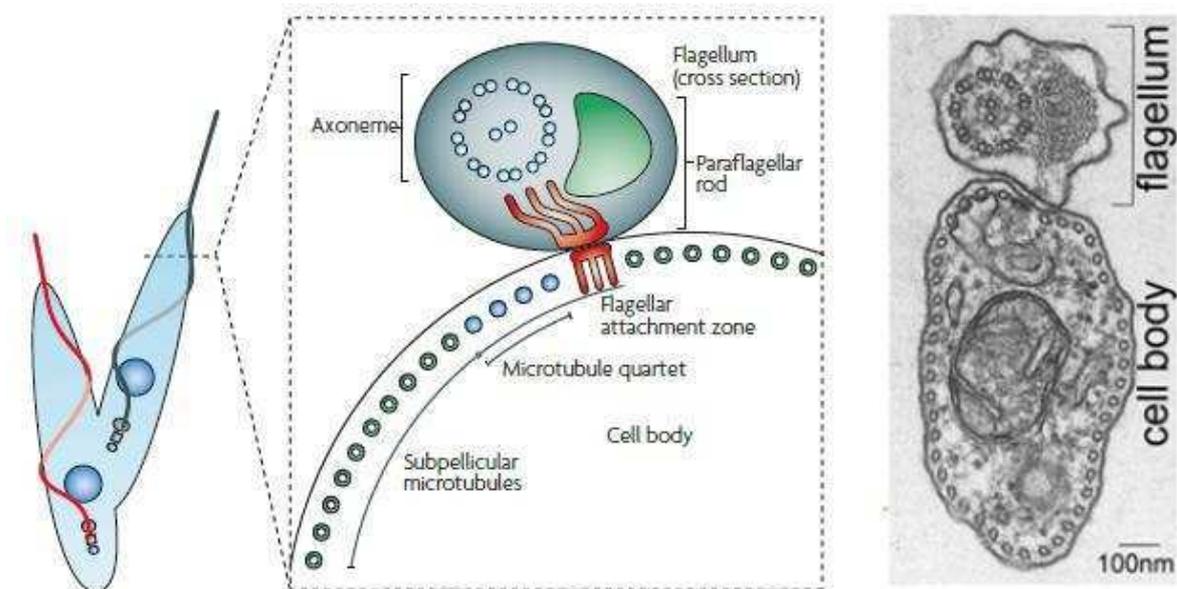


Figura i7: Estructura citoesquelética de parásitos procíclicos. Izquierda. Sección transversal de la célula mirando hacia el polo anterior que muestra la distribución de los microtúbulos en la matriz subpelicular, los microtúbulos del axonema del flagelo, el filamento paraflagelar del flagelo y la zona de unión al flagelo. La polaridad de los microtúbulos del axonema y el cuarteto de microtúbulos (en azul) está organizada de manera que el extremo menos está del lado del espectador y el más hacia el lado más alejado. Los microtúbulos restantes de la matriz subpelicular presentan la polaridad opuesta (Field and Carrington 2009). **Derecha.** Micrografía electrónica de transmisión de una sección transversal que muestra al flagelo y a los microtúbulos subpeliculares debajo de la membrana plasmática (Vaughan and Gull 2008).

además de un conjunto de cuatro microtúbulos especializados que se originan cerca de los cuerpos basales y que poseen una polaridad opuesta a la de los microtúbulos subpeliculares (Vaughan and Gull 2008).

Durante la división celular el creciente flagelo hijo sigue de manera precisa al viejo flagelo. La información se transfiere a través del conector flagelar, una estructura móvil que conecta la punta del nuevo flagelo con tres dobletes de los microtúbulos del axonema del viejo flagelo. Si bien el conector flagelar es fundamental para la división de la forma procíclica del parásito, no hay evidencia de su existencia en el estadio sanguíneo de *T. brucei*; así como tampoco hay evidencia de alguna estructura relacionada en otros kinetoplastidos.

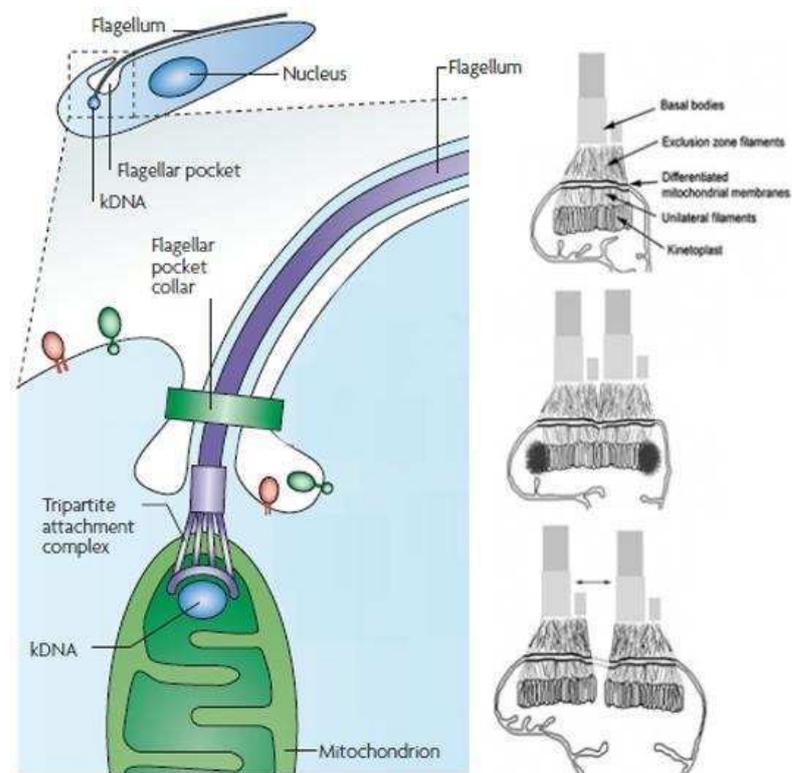


Figura i8: Complejo de unión tripartita. Izquierda: Esquema que ilustra las posiciones del bolsillo flagelar, el flagelo (que emerge desde el bolsillo y corre a lo largo del parásito hacia el extremo anterior) y el núcleo y el ADN del kinetoplasto (ADNk) (Field and Carrington 2009). **Derecha:** Representación de la región cuerpo basal /kinetoplasto / flagelo y su replicación durante el ciclo celular. La imagen superior muestra la organización del Complejo de unión tripartita en la fase G₁. La imagen del medio representa la fase S cuando la replicación del kinetoplasto está en marcha, el cuerpo pro-basal ha madurado y dos nuevos cuerpos pro-basales se han formado. La imagen inferior muestra la segregación de los cuerpos basales con la concomitante segregación del ADN kinetoplastídico (Matthews 2005).

El flagelo se origina en el cuerpo basal que, a su vez, está adherido al genoma mitocondrial. El genoma mitocondrial comprende una masa de ADN concatenado que se denomina kinetoplasto. El kinetoplasto y el cuerpo basal están unidos por un complejo de unión tripartita que debe atravesar tanto la membrana celular como la membrana mitocondrial (Fig. i8). Este complejo comprende una serie de filamentos que hacen de guía para la segregación del kinetoplasto, el cual está vinculado a la replicación y segregación del cuerpo basal y del flagelo. Asimismo, también está relacionado con los microtúbulos del citoesqueleto. El cuerpo basal es morfológicamente y funcionalmente análogo al centriolo de las células mamíferas, y tanto su maduración como su patrón de herencia están conservados (Vaughan and Gull 2008).

El mitocondrion es en sí mismo una única organela alargada que se extiende desde la parte posterior hacia la zona anterior de la célula. En el estadio sanguíneo, presenta una estructura tubular sencilla desprovista de crestas. Esto refleja la ausencia de respiración mitocondrial en esta etapa, ya que la generación de energía depende de reacciones glucolíticas llevadas a cabo en compartimentos especializados denominados glicosomas. Por el contrario, la forma procíclica no dispone de glucosa en la sangre como fuente abundante de energía, por lo que su mitocondrion es muy activo. Al igual que en el caso de otros orgánulos presentes como copia única, la segregación del mitocondrion debe realizarse con fidelidad durante la división celular.

VARIACIÓN ANTIGÉNICA Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

Ya en 1910, Ross y Thompson habían encontrado que la infección causada por *T. brucei* presentaba parasitemias recidivantes. Observaron, además, que las poblaciones presentes en cada recaída diferían antigénicamente de las del resto.

A medida que la infección progresa, el título de anticuerpos contra una determinada glicoproteína de superficie (VSG) se eleva, conduciendo a la eliminación de los parásitos que expresan esa VSG; aquellos tripanosomátidos que han cambiado su expresión a otra VSG diferente se expanden como una nueva población (Schwede and Carrington 2010) (Fig. i9). De este modo se generan continuas respuestas inmunológicas primarias contra nuevos antígenos, lo que agota al sistema inmune que presenta niveles de anticuerpos en sangre francamente altos (inmunoglobulina IgM) sin ningún efecto útil. El proceso continúa indefinidamente hasta la muerte del hospedador. Este tipo de respuesta coincide con el patrón de parasitemia observado en un huésped infectado (Stockdale, Swiderski et al. 2008).

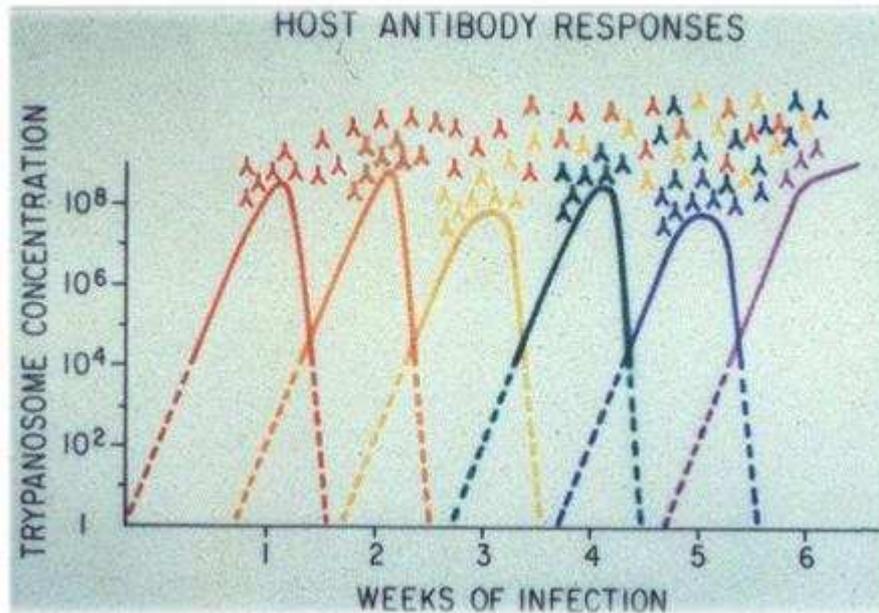


Figura i9: Diagrama que muestra la parasitemia durante la infección. Los tipos de variantes antigénicas son llamados VAT (tipo de antígeno variable). La molécula responsable de los diferentes VATs es la VSG.

T. brucei evita ser eliminado por el sistema inmune de varias maneras. En primer lugar, modula la respuesta inmunológica innata y adaptativa por un mecanismo que depende de factores que derivan del tripanosomátido. En segundo lugar, la cubierta densa en la cara externa de la membrana plasmática, compuesta por un único tipo de VSG, protege a las proteínas superficiales estables de efectores del sistema inmune y de la activación del complemento. En tercer lugar, la unión del anticuerpo a la VSG permite una rápida internalización del complejo anticuerpo-VSG, seguido de la proteólisis de la inmunoglobulina y el reciclaje de la VSG de nuevo a la superficie (Schwede and Carrington 2010).

La variación antigénica implica la expresión secuencial de VSGs antigénicamente diferentes. Las VSGs están unidas a la membrana plasmática del parásito por un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Matthews 2005) formando una monocapa gruesa de 12-25 nm que está compuesta por $\sim 10^7$ proteínas y cubre la totalidad de la membrana plasmática. Las VSGs forman homodímeros entre sí y las interacciones entre glicoproteínas adyacentes previenen que los anticuerpos lleguen a los determinantes antigénicos internos (Fig. i10). Además, su forma alargada mantiene lejos a las toxinas (Pays, Vanhollebeke et al. 2006).

Cada VSG presenta un tamaño molecular de 60 kD, con ~ 500 aminoácidos y 20 unidades de monosacáridos. Hay tres tipos de dominios N-terminales diferentes (A, B

y C) y seis tipos de dominios C-terminales (tipos 1-6). Los diferentes tipos de VSGs se clasifican de acuerdo al patrón conservado de residuos de cisteína. Todas las combinaciones de los dominios N-terminales con los dominios C-terminales parecen posibles (Schwede and Carrington 2010).

Alrededor del 20% de la capacidad codificante de proteínas del genoma está dedicada a las VSGs, lo que genera un repertorio de al menos 1.700 potenciales VSGs por genoma diploide. Casi todas las secuencias se encuentran ordenadas en tándem en las regiones subteloméricas, un lugar que favorece la recombinación mitótica.

El control de la expresión de las VSGs se desarma en la forma sanguínea corta (stumpy) del parásito, preparándose para la transmisión a la mosca tsé-tsé. El estadio procíclico del parásito no expresa VSGs, sino una glicoproteína invariable llamada Prociclina que cubre su superficie (Navarro, Penate et al. 2007) (Fig. i10). Existen dos formas de Prociclina: EP y GPEET. Se denominan de esta manera de acuerdo a la repetición de los aminoácidos que las forman y son funcionalmente distintas. GPEET es esencial en el estadio procíclico mientras que los knock-outs de EP son viables, aunque poseen poca capacidad infectiva para infectar a la mosca tsé-tsé. Ambas proteínas son rápidamente inducidas durante la diferenciación, aunque la expresión GPEET se reduce una vez que las células diferenciadas se han establecido (Matthews 2005).

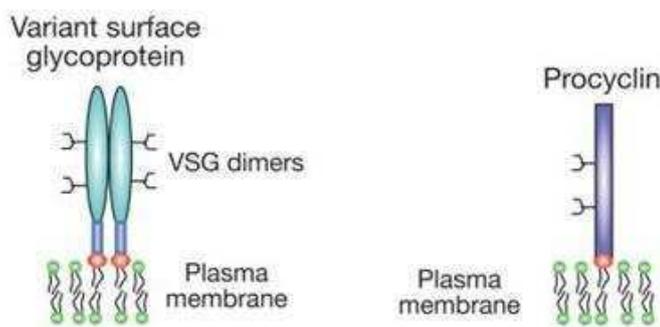


Figura i10: Antígenos de superficie de *T. brucei*. **Izquierda:** El estadio sanguíneo expresa dímeros de VSGs en su superficie. **Derecha:** El estadio procíclico expresa Prociclinas.

EL MATERIAL GENÉTICO

Los genomas secuenciados de los tres kinetoplastidos que conforman los "TriTryp" (*T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*) fueron publicados en julio de 2005 en una edición especial de Science (Science, vol 309, Edición 5733, 355, 15 de julio de 2005).

Lo que hace tan particular a la genética de los tripanosomátidos es la ausencia de promotores para la ARN polimerasa II en su genoma. Por esta razón, la transcripción no está dirigida por elementos de secuencia sino por elementos estructurales, como una región cromatínica desenrollada. Esta teoría se conoce como “landing pad” y es la razón por la cual la regulación transcripcional no es importante en estos parásitos. Como es de prever, el genoma codifica para muy pocos factores potenciales de transcripción (Clayton and Shapira 2007).

Otra peculiaridad que presentan es la transcripción de largas unidades policistrónicas compuestas por genes no relacionados. Estas unidades se procesan luego como ARNm monocistrónicos mediante dos reacciones acopladas (*trans-splicing* y poliadenilación). En el proceso de *trans-splicing* están implicados el ARN policistrónico y una secuencia de 39 nucleótidos denominada Splice Leader (SL) o miniexón. Todos los ARNm sufren *trans-splicing* y, por ende, adquieren la secuencia común SL en el extremo 5'. La fuente de esta secuencia es el precursor ARN SL, un ARN pequeño de 140 nucleótidos de largo que contiene un CAP (7,metil guanosina) en el extremo 5'. Este ARN SL es transcrito por la ARN polimerasa II a partir de ~200 genes dispuestos en tandem en dirección cabeza-cola. Sorprendentemente estos genes son los únicos que se transcriben a partir de un promotor Pol II bien definido, aunque no se traten de genes codificantes de proteínas. La adición de la SL tiene dos propósitos: la separación de los transcritos policistrónicos (junto con la poliadenilación) y la provisión del CAP para los ARNm individuales.

Se ha demostrado que la eficiencia de *trans-splicing* está modulada, comprendiendo el primer paso de regulación post-transcripcional. El siguiente control se realiza durante la exportación del ARNm al citoplasma. Para modificar el tiempo de vida media del ARNm en el citosol se requieren señales que actúen en cis en las regiones no traducidas 5' y 3' (UTR), así como también de factores proteicos que las reconozcan. En general, las UTRs 3' son más largas que las UTRs 5'. La regulación post-transcripcional permite cambios rápidos en los niveles de producción de proteínas, que a menudo involucra tasas diferenciales de degradación del ARN (Archer, Inchaustegui et al. 2011). Es probable que la vida media promedio dependa primero de la temperatura de crecimiento, ya que ésta influencia la tasa de reciclado de las enzimas. Por ejemplo, los tripanosomátidos del estadio sanguíneo crecen más rápido a 37 °C que la forma procíclica a 27 °C, y todos los ARNm son en general más estables en el estadio procíclico que en el sanguíneo. Además, la temperatura también puede influir la conformación de los ARN, por lo que señales de degradación

específicos pueden ser reconocidos por la maquinaria de regulación en un rango de temperatura determinado (Clayton and Shapira 2007).

La estructura cromatínica de *T. brucei* también es diferente a la de otros eucariotas debido a que no se forma la fibra de 30 nm y la condensación cromosómica está ausente en la mitosis. El “código de histonas” cumpliría un rol en la escasa regulación transcripcional del parásito, y han sido descritas tanto la acetilación como la metilación de histonas. También se observan grupos de agregados de cromatina en la proximidad de la envoltura nuclear (EN) y dispersos en el nucleoplasma, al igual que un prominente nucleolo que no se desintegra durante la mitosis (Navarro, Penate et al. 2007).

Otra característica inusual de la cromatina del tripanosomátido es la presencia en el ADN de una base modificada, la β -D-glucopiranosiloximetiluracilo (base J). Esta base no sería dependiente de una secuencia particular ya que se encuentra mayoritariamente en regiones repetidas del ADN, tales como en las repeticiones teloméricas y en minicromosomas. El sentido biológico de la base J todavía debe ser revelado (Ersfeld 2011).

El kinetoplasto está compuesto por dos clases de ADN circular: los maxicírculos y los minicírculos. Los maxicírculos (~ 50 copias / kinetoplasto) contienen los genes que codifican para las proteínas mitocondriales, mientras que los minicírculos (~ 10.000 copias / kinetoplasto) codifican cortos ARNs guía. Éstos actúan como templados a partir de los cuales los transcritos de los maxicírculos son editados post-transcripcionalmente mediante la incorporación o eliminación de uridinas. La extensa edición de los ARNs es una característica única de los kinetoplastidos y requiere de un complejo de edición multiproteico, el Editosoma. Curiosamente, la edición del ARN también es regulada por el desarrollo; por ejemplo, el ARNm de la subunidad II de la citocromo oxidasa es editado para corregir su correcto marco de lectura sólo en el estadio procíclico del parásito (Matthews 2005). La edición del ARN es requerida tanto en la forma sanguínea como procíclica.

El genoma nuclear de *T. brucei* consiste en 11 cromosomas diploides de megabases (1-6 Mpb), 1-5 cromosomas intermedios (200-900 kpb) y ~100 minicromosomas (50-150 kpb) (Navarro, Penate et al. 2007) (Fig. i11-A). Las últimas dos clases probablemente son haploides (Ersfeld 2011). Los cromosomas de megabases contienen los genes esenciales y la mayoría de los sitios de expresión (ES) de las VSGs. Los genes están dispuestos en módulos policistrónicos que no pueden ser considerados operones, ya que genes adyacentes pueden ser expresados diferencialmente a lo largo del ciclo de vida del parásito. Los cromosomas intermedios

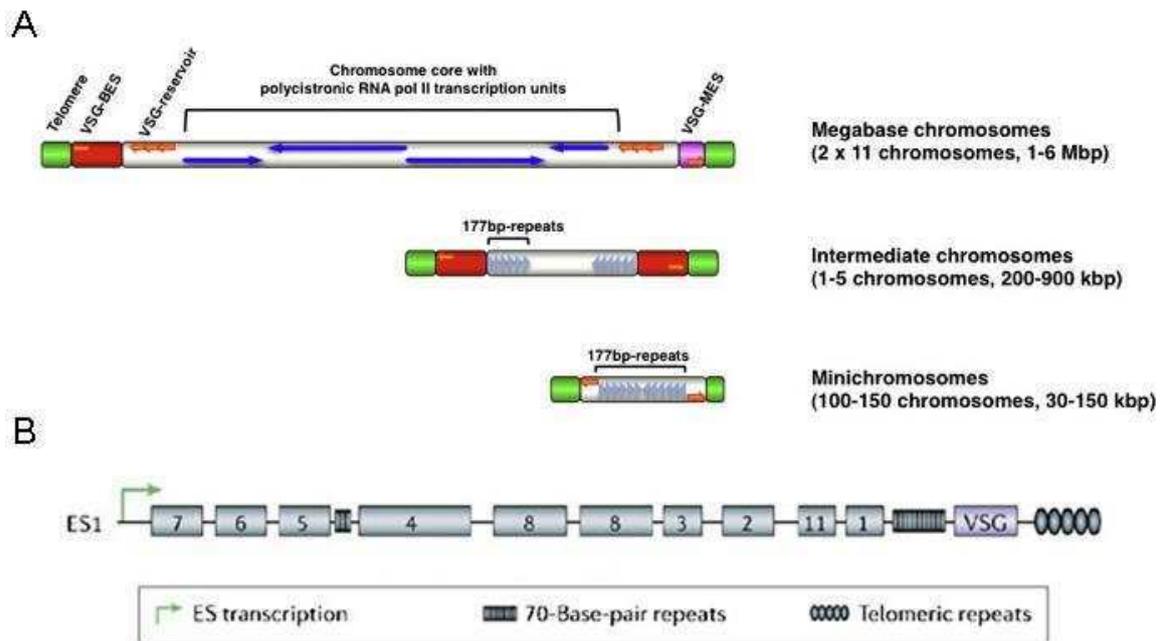


Figura i11: Organización genómica de *T. brucei*. **A.** Esquema de la organización de diferentes tipos de cromosomas en *T. brucei*. La estructura completa de los cromosomas intermedios se basa únicamente en la secuenciación parcial y es, en parte, hipotética. Se utilizan símbolos y colores similares para características idénticas en diferentes cromosomas. Flechas anaranjadas: genes VSG; flechas azules: unidades policistrónicas de transcripción que contienen genes "housekeeping"; BES: sitio de expresión en el estadio sanguíneo; MES: sitio expresión en el estadio metacíclico; VSG: glicoproteína variante de superficie. Ni los cromosomas ni sus dominios están dibujados en escala (Ersfeld 2011). **B.** Representación genómica de un ES en la región subteloamérica de los cromosomas de megabases o intermedios.

también contienen algunos ESs y los minicromosomas contienen secuencias repetidas de 177-pb en tándem, genes VSG silenciados y telómeros (Dreesen and Cross 2006). Estos últimos proveerían del repertorio de genes de VSGs que podrían ser activados por transposición duplicativa.

Además del ADN genómico y kinetoplastídico, en *T. brucei* solo ha sido identificado un único tipo de ADN extracromosómico episomal. El elemento NR es un ADN circular nuclear de hasta 400 kpb de tamaño. Consiste principalmente de diferentes tipos de repeticiones, algunas de las cuales son muy similares a las repeticiones subteloamérica de los cromosomas lineales. Una hipótesis indica que estos episomas serían un subproducto generado por eventos de recombinación. Los elementos NR son mitóticamente estables durante muchas generaciones y muy abundantes en cepas de campo; no así en cepas de laboratorio donde han sido eliminados o no pueden ser detectados. Esto es compatible con su posible rol en

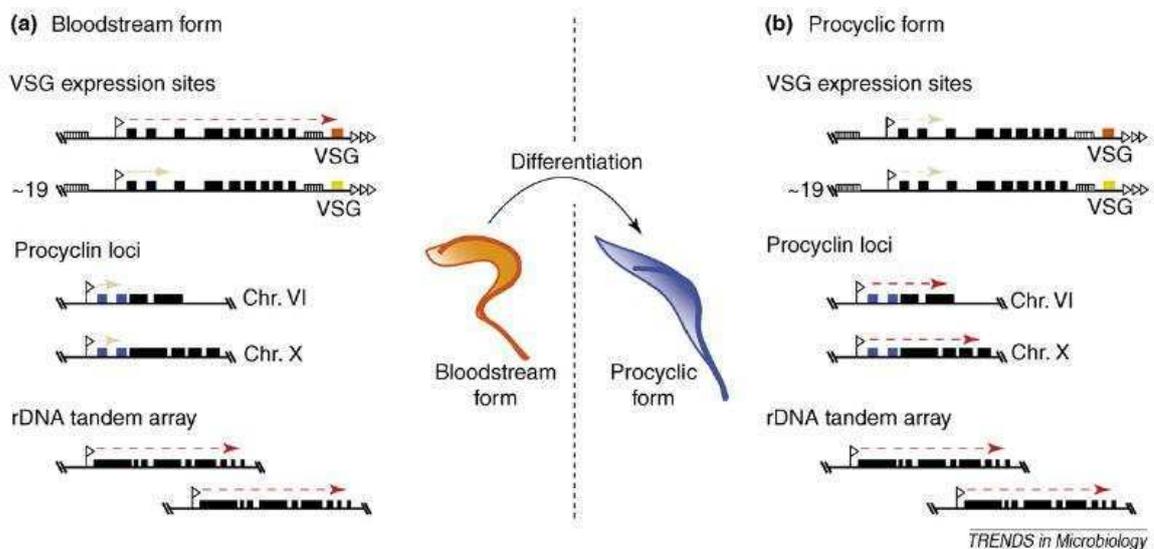


Figura i12: Organización genómica del loci transcritos por la ARN polimerasa I y patrón de expresión en los dos estadios de desarrollo de *T. brucei*. Los genes se representan como cajas negras, a excepción de los genes que codifican para las proteínas de superficie (VSG: naranja y verde; familia de Prociclina: azul). Las banderas indican la posición del promotor; la transcripción completa se indica con las flechas discontinuas en rojo y la transcripción abortada con pequeñas flechas discontinuas marrones. Las repeticiones de los telómeros están representadas por triángulos horizontales y otras secuencias repetidas se indican con cajas sombreadas verticalmente (Navarro, Penate et al. 2007).

actividades de recombinación, las cuales están reducidas en líneas adaptadas al laboratorio (Ersfeld 2011).

Los genes codificantes de los principales antígenos de superficie específicos de cada estadio son transcritos por la ARN polimerasa I; es decir, conduce la transcripción de los genes codificantes de las VSGs en el estadio sanguíneo y los genes de la familia de Prociclina en el estadio procíclico (Fig. i12). Esto es inusual para genes codificantes de proteínas, ya que normalmente la ARN polimerasa I se reserva para la transcripción del ARNr. La ARN polimerasa I se localiza en el nucléolo, donde transcribe el loci de ADNr y el locus de la Prociclina. Sin embargo, la transcripción de las VSGs por la ARN polimerasa I se realiza en un cuerpo extra-nucleolar conocido como el “cuerpo del ES” (ESB), donde se asocia con el promotor de la VSG del ES activo (Navarro, Penate et al. 2007). Se desconoce si el ESB se autoensambla alrededor del gen activo o si esta estructura excluye a otros ESs (Horn and McCulloch 2010).

La familia génica de las Prociclinas (EP y GPEET) está ordenada por copias en tándem en posiciones internas del cromosoma. La VSG que está siendo expresada,

en cambio, se localiza siempre en la región adyacente al telómero de uno de los ~20 loci policistrónicos que forman los ESs. Normalmente un ES contiene una única VSG (invariablemente en el extremo más proximal al telómero), un número de genes asociados al sitio de expresión (ESAGs) (los cuales codifican para una variedad de receptores) y una serie de repeticiones de 70 pb río arriba de la VSG (Figura i11-B). Además, un único promotor río arriba de los ESAGs dirige la expresión de todo el ES, lo que significa que primero se sintetiza un transcripto primario multigénico, a partir del cual se generan los ARNm maduros individuales (Stockdale, Swiderski et al. 2008).

Los genes de las VSGs están sujetos a una expresión monoalélica desde los telómeros haploides de los cromosomas, es decir, sólo se transcribe uno de los 10-20 ESs teloméricos en un momento dado; esto se denomina Exclusión alélica. El silenciamiento de todos los demás ESs mantiene la integridad de la estrategia de evasión, mientras que la multiplicidad de los ESs potenciales permite el cambio coordinado de la transcripción desde el telómero activo hacia otros de reserva. Hay, además, ~1000 genes VSG silenciosos y pseudogenes esparcidos por los diferentes cromosomas, y el número de copias y la localización puede variar drásticamente entre cepas (Navarro, Penate et al. 2007). La recombinación es, por lo tanto, fundamental en la variación antigénica, ya que le permite al parásito utilizar este archivo de VSGs; generalmente copiando un gen diferente en el ES activo (Horn and McCulloch 2010).

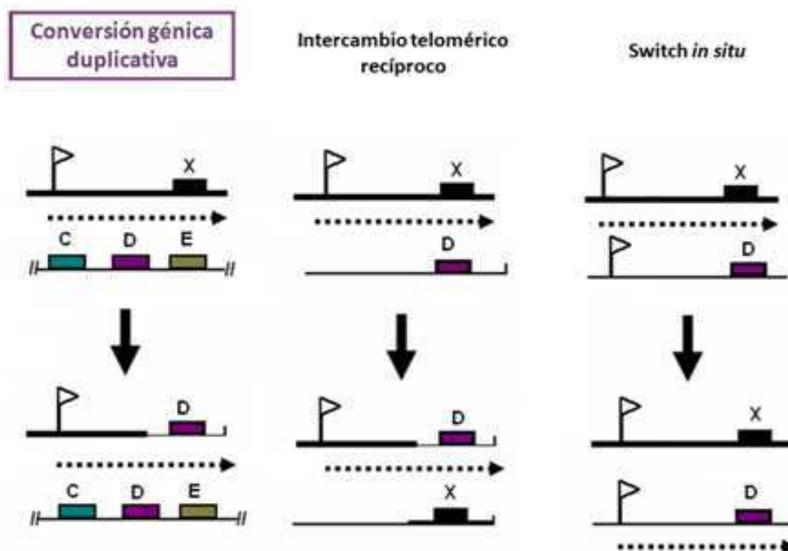


Figura i13: Mecanismos de variación antigénica en *T. brucei*. Se ilustran diferentes mecanismos para cambiar la expresión de una VSG. La conversión génica y el intercambio recíproco implican un reordenamiento de genes, donde la nueva VSG se posiciona en el ES activo. El “cambio *in situ*” implica el silenciamiento de un ES y la activación de otro.

En resumen, la variación antigénica puede ser el resultado de dos mecanismos distintos: del **cambio *in situ***, es decir, del cambio transcripcional desde un ES activo a otro ES que estaba silenciado. O de la **recombinación homóloga** entre el gen VSG activo y otro gen VSG del repertorio (Pays, Vanhollebeke et al. 2006) (Fig. i13). Este último mecanismo parece estar dirigido mayormente mediante la **conversión génica**, en el cual el gen silenciado (o parte de éste) es copiado y duplicado en un ES activo, eliminando al gen que residía allí (Stockdale, Swiderski et al. 2008) (Fig. i14). Alternativamente puede producirse por **recombinación recíproca** a través del cual el gen VSG transcrito se transfiere a un ES silenciado y la VSG de ese ES silenciado se recombina en el ES activo (Fig. i14).

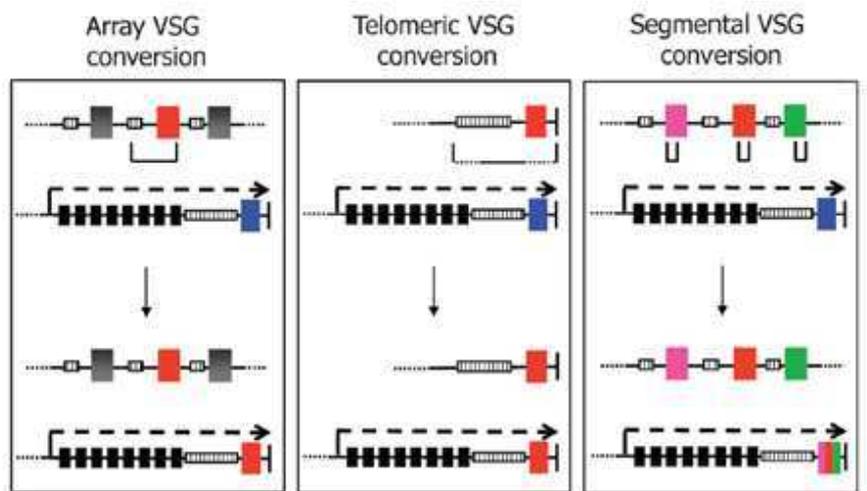


Figura i14: Diferentes mecanismos de conversión génica en *T. brucei*. La VSG (indicado por una caja azul) se transcribe a partir del sitio de expresión (ES) activo (flecha punteada) que se encuentra en el telómero (línea negra vertical) de un cromosoma (línea negra horizontal). También están representados los ESAGs (cajas negras) y las repeticiones de 70 pb (cajas rayadas). **Izquierda.** La conversión génica puede ocurrir mediante la copia de una VSG silenciosa (caja roja) desde una región subteloamérica a un ES activo, sustituyendo a la VSG que residía allí. La región que es copiada normalmente abarca el ORF de la VSG y se extiende río arriba hasta las repeticiones de 70 pb. **Medio.** La VSG silenciada donante también puede ser telomérica (ya sea de un minicromosoma o de un ES inactivo). En este caso, el límite de la conversión se extiende hasta las repeticiones de los telómeros, mientras que el límite río arriba puede estar en las repeticiones de 70-bp o en las ESAGs (si el donante es un ES). **Derecha.** La conversión segmentada de la VSG implica la copia de múltiples secuencias, normalmente de VSGs no funcionales (cajas rosa, roja, y verde) para generar una nueva VSG mosaico en el ES activo (Stockdale, Swiderski et al. 2008).

La homología necesaria para la recombinación de los genes VSGs, los cuales presentan secuencias altamente dispares, es proporcionada por un número variable de repeticiones de 70 pb situadas río arriba del gen donante de la VSG y por secuencias conservadas presentes en el extremo 3' río abajo de este gen. El evento de recombinación puede derivar a menudo en una conversión génica segmentada, generando VSG mosaicos (Fig. i14). Los mismos pueden estar compuestos de diferentes segmentos de hasta 3 ó 4 pseudogenes diferentes (Taylor and Rudenko 2006).

CICLO CELULAR

A diferencia de muchos otros eucariotas, algunas estructuras subcelulares y orgánulos tales como la mitocondria, el RE, el Golgi y el flagelo están presentes en una sola copia en células en la fase G₁, y se replican en momentos definidos durante la división celular (Archer, Inchaustegui et al. 2011). La estricta regulación del posicionamiento de estos orgánulos a lo largo del ciclo celular es entonces una característica inusual de estos tripanosomátidos. De la misma forma, las dimensiones kinetoplasto-núcleo y kinetoplasto-parte posterior están fijas durante el ciclo celular de la forma procíclica; creciendo el extremo posterior mientras se segregan los cuerpos basales a lo largo de las fases S, G₂ y M (Matthews 2005). Durante la división celular, el cuerpo del parásito incrementa su longitud y su diámetro al mismo tiempo que el nuevo flagelo se alarga. La extensión de los microtúbulos subpelliculares en el extremo posterior de la célula es importante en este aumento de la longitud. Sorprendentemente, el incremento en el diámetro se logra mediante la inserción de nuevos microtúbulos entre los microtúbulos viejos (Vaughan and Gull 2008).

Un estudio analizó la ontología de algunos genes que son regulados en el ciclo celular de *T. brucei* (Fig. i15). Durante la fase G₁ temprana, están “up-regulados” los transcritos que codifican para las enzimas involucradas en la generación de energía y para las que conforman la maquinaria de traducción que genera los ARNms; esto estaría relacionado con la necesidad del crecimiento celular que se produce en esta fase. El pico de ARNms en la fase G₁ tardía codifica para un gran número de proteínas implicadas en la replicación del ADN; así como también para dos proteínas del cuerpo basal, el cual madura en la transición de las fases G₁/S a partir de un cuerpo pro-basal. Durante la fase S las histonas y las proteínas motoras de los microtúbulos aumentan su expresión, lo que responde probablemente a la necesidad de empaquetamiento del ADN en la cromatina y al ensamblaje del huso mitótico,

respectivamente. Por último, en la fase G₂/M aumenta la proporción de ARNm de las proteínas flagelares (Archer, Inchaustegui et al. 2011).

La figura i15 representa la progresión del ciclo celular de células procíclicas de *T. brucei*. Se muestra al kinetoplasto (K) compuesto de muchas moléculas de ADNmt circulares. También se observa el núcleo (N), el cuerpo basal (B) (rectángulo azul) y el cuerpo pro-basal (rectángulo rojo). En rosa claro se representa a la mitocondria y en verde al flagelo viejo, que emerge desde el extremo posterior de la célula (a la izquierda) y va atado a lo largo de toda su longitud hasta la cara anterior. Al final de la fase G₁ el cuerpo pro-basal madura en un nuevo cuerpo basal que se localizará en la base del nuevo flagelo, mientras que el kinetoplasto ya se encuentra en la fase S. En la fase S, el nuevo flagelo (naranja) comienza a elongarse, anclado al viejo flagelo por una estructura conectora móvil (círculo naranja); a su vez, los kinetoplastos y los cuerpos basales comienzan a separarse. Tras la replicación del ADN nuclear, se forma un huso mitótico intranuclear (línea rosa) como preludio del comienzo de la mitosis. La mitosis se produce dejando a uno de los dos núcleos posicionado entre ambos kinetoplastos, asegurando de esta manera dos "grupos" de orgánulos citoplasmáticos listos para la escisión (Vaughan and Gull 2008). La envoltura nuclear se mantiene durante la mitosis (Navarro, Penate et al. 2007). Previa a la citocinesis, el Complejo de pasajeros cromosómicos se traslada desde el huso mitótico hacia la cara anterior (círculo rosa, panel inferior), para moverse junto al surco (línea de puntos) durante la citocinesis desde la zona anterior hacia la zona posterior (Archer, Inchaustegui et al. 2011).

Con respecto a los puntos de control del ciclo celular, al parecer existen diferencias fundamentales entre los dos estadios del parásito. Aún cuando la mitosis se ve afectada por una intervención química, la forma procíclica es capaz de completar la citocinesis; dando lugar a la formación de células anucleadas denominadas **zoides**. Esto sugiere que, o bien los tripanosomátidos procíclicos carecen de un "checkpoint" entre la mitosis y la citocinesis, o los parásitos mitóticamente defectuosos son capaces de saltarse este punto de control. Incluso la inhibición de la replicación del ADN nuclear impide la división nuclear, pero todavía se produce la citocinesis (Akiyoshi and Gull 2013). En la forma sanguínea, en cambio, un bloqueo en la mitosis inhibe la citocinesis, pero no las sucesivas rondas de síntesis del ADN nuclear o la replicación y segregación del kinetoplasto (Jones, Thomas et al. 2014), lo que genera células gigantes de ADN poliploide que no son capaces de separarse. Esto está a favor

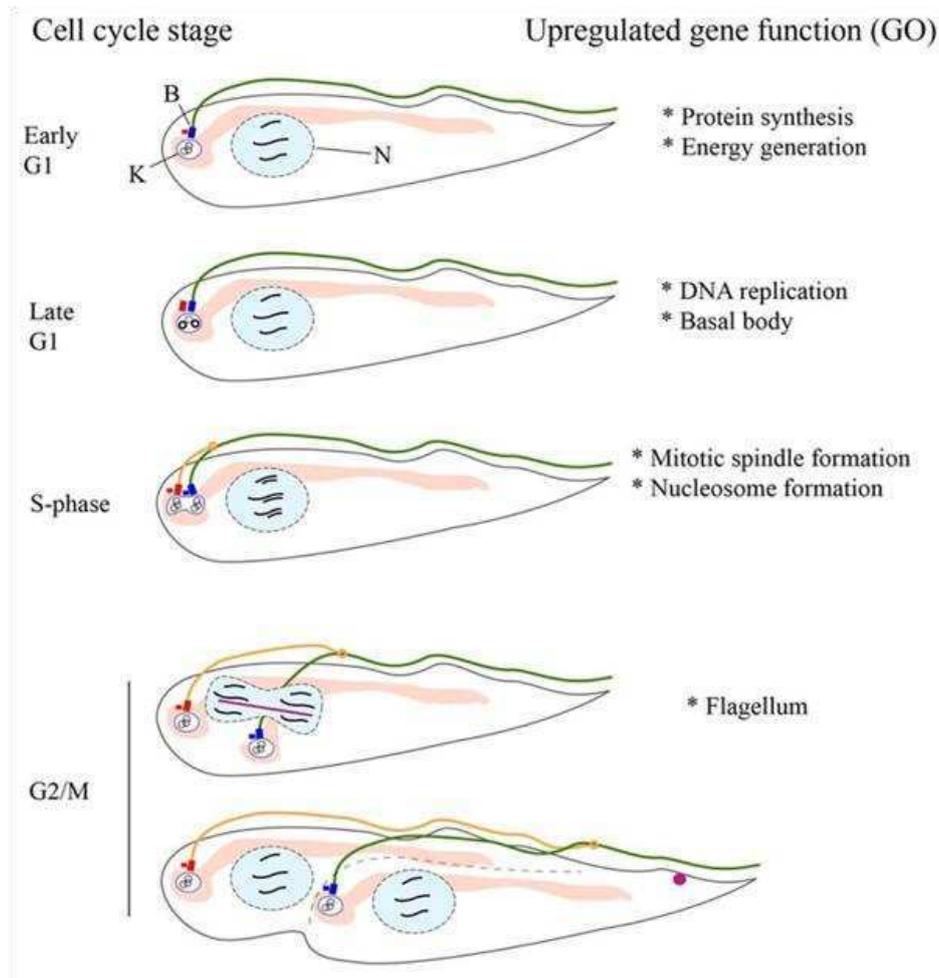


Figura i15: Relación entre la formación de los componentes celulares del ciclo celular y la regulación de la expresión génica (Archer, Inchaustegui et al. 2011).

de aquellos que argumentan que los tripanosomátidos sanguíneos carecerían de un punto de control al inicio de la siguiente fase G₁ del ciclo celular en ausencia de la citocinesis.

Si bien en los parásitos procíclicos la citocinesis no se detiene por problemas en la mitosis, la inhibición de la duplicación del cuerpo basal o de su segregación sí parece arrestar completamente la citocinesis. Esto sugiere que la migración posterior del cuerpo basal probablemente funcione como la fuerza motriz principal.

En los tripanosomátidos fueron identificados al menos 10 ciclinas (Cyc2-CYC11) y 11 quinasas relacionadas con Cdc2 (CRK1-CRK4 y CRK6-CRK12) (Hamarton, Kramer et al. 2007). Este gran número de ciclinas y CRKs encontradas en su genoma parece sugerir un sistema ciclina-CRK bastante más complejo de lo que cabría esperar para un eucariota unicelular (Tabla i1). La función de algunas de estas ciclinas y CRKs ha sido caracterizada y se ha demostrado que están implicadas en el control

Tabla i1: Proteínas regulatorias del ciclo celular en *T. brucei*; tomada de “Regulation of the Cell Division Cycle in *T. brucei*; Li et. al., 2012”.

Cell cycle stage regulated	Gene product(s)	Human homolog(s)	Function
G ₁ /S transition	CYC2	None	G ₁ cyclin
	CRK1	Not known	G ₁ CDK
	CRK2	Not known	G ₁ CDK
DNA replication and S-phase progression	Orc1/Cdc6	ORC1	Origin recognition complex
	Orc1b	None	Origin recognition complex
	Orc4	ORC4	Origin recognition complex
	Tb3120	None	Origin recognition complex
	Tb7980	None	Origin recognition complex
	Mcm2-7	Mcm2-7	CMG component
	Cdc45	Cdc45	CMG component
	GIN5 (Sld5, Psf1, Psf2, Psf3)	GIN5 (Sld5, Psf1, Psf2, Psf3)	CMG component
	TLK1	TLK1, TLK2	Tou1sed-like kinase
	Asf1A, Asf1B	Asf1A, Asf1B	Histone H3 chaperone
G ₂ /M transition	CYC6	Cyclin B	Mitotic cyclin
	CYC8	Cyclin B	Mitotic cyclin
	CRK3	Cdk1	Mitotic CDK
	CRK9	None	Mitotic CDK
Mitosis	AUK1, CPC1, CPC2	Aurora B, none, none	Chromosomal passengers
	TLK1	TLK1, TLK2	Tou1sed-like kinase
	KIN-A	None	Divergent kinesin
	KIN-B	None	Divergent kinesin
	Kif13-1	MCAK	Kinesin-13
	APC1, Cdc27	APC1, Cdc27	Anaphase-promoting complex
	SMC3, SCC1	SMC3, SCC1	Cohesin
	Separase	Separase	Protease
	NOP86	None	Nucleolar protein
	Cytokinesis	AUK1, CPC1, CPC2	AUK1, none, none
PLK		PLK1	Polo-like kinase
MOB1		MOB1	Unknown
PK50, PK53		NDR1	Nuclear DBF-2-related kinase
TRACK		RACK1	Rho kinase
RHP		RhoA	RhoA-like GTPase
CFB2		None	F-box protein
ARL2		Arl2	Small GTPase
AIR9		None	Microtubule-associated protein
KAT80, KAT60		p80 katanin, p60 katanin	Katanin
SPA		Spastin	Spastin

del ciclo celular. No se ha encontrado que ninguna ciclina y CRK desempeñe un papel en la fase S; aunque algunas sí lo hacen en las transiciones G₁/S y G₂/M.

Una herramienta para el estudio del ciclo celular es la sincronización de los cultivos. Esto se puede llevar a cabo mediante el agregado de Hidroxiurea (HU), un método que ya había sido utilizado para otros organismos que incluyen a los kinetoplastidos *Crithidia fasciculata* (2,5 mM), *Leishmania tarentolae* (2,5 mM), *Leishmania major* (5 mM), *Leishmania infantum* (5 mM) Y *Trypanosoma cruzi* (20 mM) (Chowdhury, Zhao et al. 2008) . La HU inhibe a la ribonucleótido reductasa, una enzima implicada en la síntesis de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP). El fundamento de la sincronización mediada por HU radica en el agotamiento de los dNTPs, previniendo la replicación del ADN y deteniendo al ciclo celular al inicio de la fase S o,

en caso de que ya haya comenzado la replicación, o en caso de que ya haya comenzado la replicación, dentro de esta fase.

En el caso de los parásitos procíclicos de *T. brucei* se debe utilizar una concentración baja de HU (0,2 mM), ya que dosis mayores de este compuesto pueden resultar tóxicas. Por esta razón, la incubación con HU solo inhibe parcialmente la síntesis de ADN, lo que provoca un efecto imprevisto en el mecanismo de sincronización. En este organismo las células no se arrestan en la frontera de las fases G₁/S, sino que concretan lentamente la ronda de replicación y, transcurridas las 12 horas de incubación, se arrestan al final de la fase S. La remoción del inhibidor desarresta al cultivo, el cual reanuda su progresión a lo largo del ciclo celular. Durante las primeras 4 horas, los parásitos atraviesan las fases S y G₂/M. Entre las 4 y 6 horas comienza a aparecer una subpoblación en la fase G₁, iniciándose así un nuevo ciclo. Entre las 8 y 10 horas, las células transitan nuevamente la fase S, y a las 12 horas vuelven a acumularse en la fase G₂/M por segunda vez. En las últimas etapas se observa una pérdida gradual de la sincronía (Chowdhury, Zhao et al. 2008). El ciclo de vida de la forma procíclica del parásito dura alrededor de 8 horas.

Respecto al kinetoplasto, luego de 12 horas de incubación con HU el ADNk también ha atravesado una ronda de síntesis y división, aunque la mayoría de las aberturas de los minicírculos aún no han sido reparadas. Las mismas son rellenadas recién a las 2 horas de desarrestado el cultivo.

Por otro lado, el alto grado de organización estructural de *T. brucei* ha facilitado considerablemente el análisis de cómo se regula su ciclo celular; representando una herramienta alternativa a la sincronización. Por ejemplo, el genoma del kinetoplasto tiene una fase S periódica discreta y la fase G₂ se coordina con la replicación y segregación del genoma nuclear. Esto quiere decir que el simple análisis de las células teñidas con DAPI permite predecir la posición de los parásitos individuales dentro del ciclo celular (Matthews 2005).

REPLICACIÓN DE LOS GENOMAS

El ADN del kinetoplasto contiene varios miles de minicírculos y unas cuantas docenas de maxicírculos concatenados en una red gigante que está condensada en una estructura con forma de disco (Liu, Molina et al. 2006). Como se muestra en la Figura i16, los minicírculos se extienden en paralelo al eje del disco; una configuración que es estabilizada por proteínas del tipo de las histonas (Liu, Liu et al. 2005).

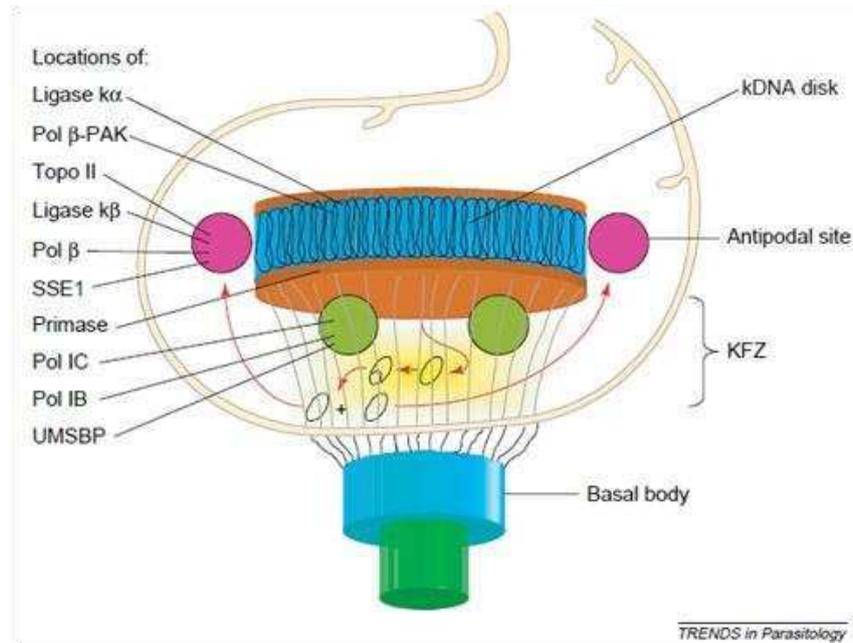


Figura i16. Modelo de replicación del ADNk basado en estudios de *Crithidia fasciculata* y *Trypanosoma brucei* (Liu, Liu et al. 2005).

La replicación del ADNk implica la duplicación del número de minicírculos y maxicírculos, y la distribución de la progenie en dos redes hijas idénticas a la red parental (Liu, Liu et al. 2005). Hay cuatro características claves en la replicación del ADNk. Primero, la replicación se produce durante un período inequívoco del ciclo celular, cerca de la fase S nuclear. Esto contrasta con el ADNmt de los mamíferos, que se replica en un momento indefinido. En segundo lugar, el disco de ADNk está rodeado por múltiples proteínas que catalizan varias etapas de la replicación. La Figura i16 muestra la ubicación de algunas de estas proteínas. En algunos casos, dicho posicionamiento es dependiente del ciclo celular; ensamblándose alrededor del disco cuando se inicia la replicación y desmontándose cuando ésta se completa. En tercer lugar, los minicírculos no se replican mientras están vinculados a la red. En lugar de ello, son liberados de forma individual por una topoisomerasa II, para ser replicados como minicírculos libres. La progenie de los minicírculos libres luego se vuelve a conectar a la red, una reacción que también es mediada por la topoisomerasa II. En cuarto lugar, los minicírculos están cerrados covalentemente antes de la replicación, pero tras la replicación contienen al menos una o dos rupturas que persisten hasta que todos los minicírculos han sido replicados. Se cree que estas aberturas sirven como marca para indicar que se ha completado la replicación, lo que garantiza que cada minicírculo se replique una única vez (Liu, Liu et al. 2005).

Al comienzo de la replicación, una topoisomerasa libera individualmente a los minicírculos desde la red hacia una región de la matriz mitocondrial entre el disco de ADNk y la membrana mitocondrial, cerca del cuerpo basal flagelar. Dentro de esta región, llamada zona kinetoflagelar (KFZ), los minicírculos se encuentran con proteínas como la Proteína de reconocimiento del origen (Proteína de unión a la secuencia universal de minicírculos (UMSBP)), la primasa, y dos polimerasas de ADN. La interacción del minicírculo con estas y otras proteínas promueve la replicación unidireccional como estructuras Θ (Fig. i17). Los minicírculos de la progenie segregan dentro de esta zona y luego migran hacia los puntos antipodales, formados por un conjunto de proteínas que flanquean al disco de ADNk y que se posicionan a 180° de distancia (Liu, Molina et al. 2006). Sorprendentemente, existe una disposición completamente diferente en *Trypanosoma cruzi*, *C. fasciculata*, o *Leishmania tarentolae* (Liu, Liu et al. 2005).

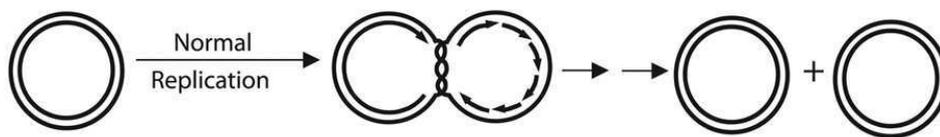


Figura i17. Iniciación de la replicación de un minicírculo. El minicírculo covalentemente cerrado es parcialmente desenrollado por una helicasa/topoisomerasa que permite la síntesis de las cadenas líder y rezagadas (Liu, Molina et al. 2006).

En los sitios antipodales se continúa con el proceso de replicación. Esto incluye la remoción de cebadores de ARN por una endonucleasa-1, el rellenado de la mayoría (aunque no todos) los espacios entre los fragmentos de Okazaki por la ADN polimerasa β y el sellado de las mellas por la ADN ligasa $k\beta$. Luego la topoisomerasa II vuelve a unir los minicírculos de la progenie (los cuales todavía contienen al menos una ruptura) a la periferia de la red en lugares adyacentes a las antípodas. Una vez que todos los minicírculos han sido replicados, la ADN polimerasa β -PAK y la ligasa $k\alpha$ reparan las mellas restantes. La red que ha duplicado su tamaño luego se divide en dos, y las redes hijas se segregan hacia las células hijas durante la citocinesis (Liu, Molina et al. 2006). La figura i18 muestra al sistema de filamentos que une el ADNk con el cuerpo basal del flagelo (Liu, Liu et al. 2005).

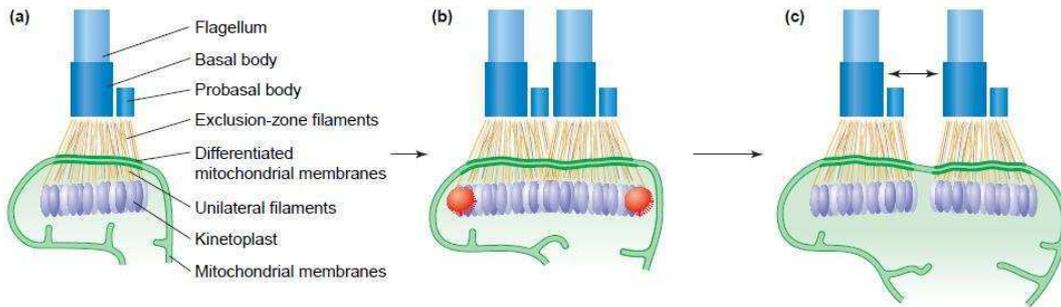


Figura i18. Sistema de filamentos que conecta al ADNk con el cuerpo basal del flagelo. 1. Kinetoplasto previo a la replicación. **2.** Kinetoplasto, flanqueado por dos sitios en las antípodas, sometido al proceso de replicación; el sistema flagelar y el complejo tripartita se han duplicado durante este periodo. **3.** Segregación de los kinetoplastos hijos junto a los cuerpos basales flagelares (Liu, Liu et al. 2005).

Mucho menos se sabe acerca de la replicación de los maxicírculos. De manera similar a lo que ocurre en los minicírculos, los maxicírculos inician la replicación unidireccional a partir de un origen discreto (ubicado en la región no codificante), formando estructuras Θ . Pero, a diferencia de los minicírculos, los maxicírculos no se desprenden de la red durante la replicación (Liu, Liu et al. 2005).

Mientras que los estudios sobre la replicación de la red de ADNk están más avanzados, hay muy poca información disponible acerca de los mecanismos de replicación del ADN nuclear en tripanosomátidos o de la maquinaria involucrada en el inicio de la replicación. Sorprendentemente, en contraste con las seis subunidades (Orc1-6) del Complejo de Reconocimiento del Origen (ORC) que se encuentran en todos los eucariotas modelo, parecería existir una sola subunidad ORC, ORC1, en el genoma de los tripanosomátidos.

Li et al. (2012) propusieron un modelo de replicación del ADN en tripanosomátidos. Durante la fase G_1 , los orígenes de replicación están unidos a un ORC (Complejo de reconocimiento del origen) muy divergente. Actualmente, al menos cinco proteínas ORC han sido identificadas en la forma procíclica del parásito (TbOrc1/Cdc6, TbOrc1b, TbOrc4, Tb3120 y Tb7980), pero aún queda por examinar si éstas forman un complejo. Posteriormente, el complejo Mcm2-7 es reclutado en los orígenes, probablemente a través de la unión a TbOrc1/Cdc6 y TbOrc1b, lo que conduce a la formación del complejo pre-replicativo mediado por Mcm3. Este complejo, sin embargo, no posee actividad helicasa. Cuando las células ingresan en la fase S, el complejo GINS y Cdc45 se cargan en los orígenes de replicación a través de las interacciones con Mcm2-7, lo que lleva a la formación del complejo CMG, el cual posee actividad helicasa y se traslada a lo largo de las horquillas de replicación para

relajar al ADN doble cadena. Cuando se adiciona la Polimerasa de ADN la replicación se inicia y el complejo CMG se traslada como parte del **replisoma**. Finalmente, luego de que la replicación del ADN se haya completado, la Cdc45 es exportada fuera del núcleo para evitar la re-replicación del ADN. A diferencia de las levaduras, en los tripanosomátidos Mcm 2-7 permanecen en el núcleo a lo largo de todo el ciclo celular.

Los tripanosomátidos, al igual que otros protistas y hongos, no desmontan su envoltura nuclear durante la mitosis (mitosis cerrada), y el huso mitótico se forma dentro del núcleo. Aunque en *T. brucei* no se detecta ninguna estructura parecida a un centrosoma o a un cuerpo polar del huso mitótico, la microscopía electrónica ha visualizado estructuras en forma de anillo en el interior del núcleo y cerca de la membrana nuclear, las cuales parecen nuclear a los microtúbulos del huso durante la mitosis. Además, en los tripanosomátidos no parece existir una variante de la histona H3 centromérica. El centrómero es el locus cromosómico donde los cinetocoros se ensamblan para mediar en la interacción con los microtúbulos. A pesar de su importancia, las estructuras del centrómero son muy divergentes y se limitan a un solo sitio en cada cromosoma de megabases (Akiyoshi and Gull 2013).

La segregación cromosómica eucariota es impulsada por el cinetocoro, que reúne al ADN centromérico con los microtúbulos del huso y rigen el movimiento de los cromosomas. Ningún componente canónico del cinetocoro ha sido identificado en *T. brucei*. Además, estos organismos no parecen poseer un “checkpoint” funcional que monitoree la unión cinetocoro-microtúbulos (Akiyoshi and Gull 2013).

MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

El sistema de reparación es responsable de la preservación de la estabilidad genómica, corrigiendo las lesiones en el ADN causadas por agentes averiantes provenientes del medio ambiente y de procesos metabólicos endógenos. Este sistema abarca varias vías distintas: (1) la sanidad de la reserva de nucleótidos, (2) la reversión directa de las bases modificadas mediante procesos de desmetilación, por acción de fotoliasas o de dioxigenasas, o (3) por escisión de: (i) bases oxidadas, metiladas o mal incorporadas a través de la reparación por escisión de bases (BER), (ii) daños voluminosos a través de la reparación por escisión de nucleótidos (NER), y (iii) bases mal incorporadas en la cadena de ADN recién replicada a través de la reparación de bases mal apareadas (MMR). El ADN también es susceptible de sufrir rupturas en una sola de sus cadenas (SSB) o rupturas en ambas cadenas (DSBs), que pueden ser reparadas bien por recombinación homóloga (HR) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ). A pesar de que estos mecanismos reparan a la

mayoría de los daños en el ADN, algunas de estas lesiones permanecen, dando lugar a mutaciones o al bloqueo de la replicación. Polimerasas de ADN alternativas pueden evadir estas lesiones cometiendo o no errores, mediante un proceso de tolerancia conocido como síntesis de trans-lesión (TLS) (Passos-Silva, Rajao et al. 2010). *T. cruzi*; *T. brucei* y *L. major* parecen ser capaces de catalizar la mayoría de las estas vías de reparación (Passos-Silva, Rajao et al. 2010) (Tabla i2).

Reparación directa: Dos mecanismos de reparación directa están presentes en los Trypanosomas: la reversión de la alquilación y la reparación del daño oxidativo. Estas vías realizan reversiones químicas inmediatas de formas específicas de daño en el ADN. Homólogos individuales de la O⁶-metil-guanina alquiltransferasa (MGMT) se pueden encontrar en los tres genomas. Esta enzima cataliza la reparación de O⁶-meG, una lesión mutagénica crítica que produce transiciones de G:C a A:T. También está presente en los Trypanosomas la AlkB, una dioxigenasa dependiente de hierro que revierte las lesiones (1-meA y 3-meC) en una sola cadena de ADN (ssDNA) o de ARN. El tercer mecanismo de reparación directa utiliza fotoliasas que catalizan la escisión de dímeros de pirimidina en los monómeros constituyentes, un proceso llamado fotorreactivación. Se cree que *T. brucei* y *L. major* podrían realizar fotorreactivación porque presentan un gen que contiene un dominio N-terminal de fotoliasa (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Reparación por escisión de bases (BER): es la vía predominante para hacer frente a una amplia gama de lesiones que modifican bases individuales sin grandes efectos sobre la estructura de la doble hélice. Tales modificaciones en las bases del ADN pueden surgir como resultado de la oxidación, alquilación y / o desaminación. La vía BER consiste en el reconocimiento y la eliminación de la base modificada mediante una glicosilasa de ADN, el clivaje del esqueleto de azúcar-fosfato y la escisión del sitio sin base (apurínicas-apirimidínicas, AP) por una endonucleasa AP de ADN; seguido por la síntesis de ADN y por pasos de ligación (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

El llenado de las rupturas y la unión puede ocurrir por uno de dos caminos: la vía BER de parche corto o la vía BER de parche largo. En la sub-vía BER de parche corto, sólo un nucleótido es reemplazado por la ADN Pol β y el "nick" es sellado por la Ligasa 3 (LIG3); estando coordinados todos los pasos por XRCC1. En la vía BER de parche largo se reemplazan entre 2-13 nucleótidos con la participación de las polimerasas replicativas δ (Pol δ) o ϵ (Pol ϵ). Esta polimerización da lugar a una estructura de "aleta" que se elimina por FEN1 a través de una ruptura en esa sola cadena; luego ocurre la ligación de la mella por la Ligasa 1 (LIG1). **El mecanismo**

BER de parche largo también involucra a PCNA, el cual interactúa y coordina a las enzimas que intervienen, y a la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), que se une al ADN con SSBs previniendo DSBs y facilitando el acceso de la maquinaria BER de parche largo.

Los *Trypanosoma* poseen todas las enzimas necesarias para llevar a cabo efectivamente el mecanismo BER ante diferentes lesiones en las bases del ADN. Sin embargo, no está claro si pueden realizar BER de parche corto y de parche largo, ya que los homólogos de LIG3 y XRCC1, esenciales para el mecanismo de parche corto, aún no han sido identificados en los tres organismos. No obstante esto, ambos componentes BER también están ausentes en las plantas. Teóricamente el genoma de *L. major* no codifica para la enzima PARP, la cual desempeñaría un papel en la sub-ruta BER de parche larga (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Tabla i2: Mecanismos de reparación en tripanosomátidos (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Gene	Function	Organism (Gene ID)	Experimental data
BER Genes			
Uracyl-DNA glycosylase (UNG)	Excision of uracil in DNA	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053511277.330)	(i) <i>In vitro</i> activity (enhanced by AP endonuclease) (ii) Heterologous complementation of <i>E. coli</i>
AP endonuclease1	Cleavage of the phosphodiester bond at the 5' side of AP site	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053507083.30) <i>L. major</i> (LmjF16.0680)	(i) Heterologous complementation of <i>E. coli</i> (ii) Heterologous complementation of <i>E. coli</i> (iii) Inducement of H ₂ O ₂ and methotrexate resistance
POI β	Polymerization of DNA Strand displacement (long patch) Cleavage of the 5' - dRP	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053503955.20) <i>T. brucei</i> (Tb927.5.3780)	(i) <i>In vitro</i> activity (ii) Kinetoplast localization
PARP	Binding to ssDNA Stimulation of DNA synthesis and strand displacement	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053509721.60)	(i) <i>In vitro</i> activity (enhanced by SSB)
NER Genes			
TFIIH-TFB1 TFIIH-TFB2 TFIIH-TFB4 TFIIH-TFB5	Component of TFIIH	<i>T. brucei</i> (Tb11.01.1200) <i>T. brucei</i> (Tb927.10.5210) <i>T. brucei</i> (Tb11.01.7730) <i>T. brucei</i> (Tb10.61.2600)	(i) Essential for initiating synthesis of spliced leader RNA
TFIIH-XPB TFIIH-XPD	Component of TFIIH (helicase)	<i>T. brucei</i> (Tb11.01.7950/13927.3.5100) <i>T. brucei</i> (Tb927.8.5980)	(i) Interaction with TSP1 and TSP2 (ii) Nuclear localization
TFIIH-TSP1	Trypanosomatid-specific component of TFIIH	<i>T. brucei</i> (Tb927.1.1080)	(i) Essential for initiating synthesis of spliced leader RNA (ii) Nuclear localization
TFIIH-TSP2		<i>T. brucei</i> (Tb11.01.5700)	(i) Nuclear localization (ii) Essential for initiating synthesis of spliced leader RNA
XAB2*	May function as a scaffold for protein complex formation	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053509767.60) <i>T. brucei</i> (Tb927.5.1340) <i>L. major</i> (LmjF23.1350)	(i) Putative (ii) Putative (iii) Putative
MMR Genes			
MSH2	Repair of single base-base and IDL mismatches Heterodimers with MSH3 or MSH5	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053507711.320) <i>T. brucei</i> (Tb927.10.11020)	(i) Three isoforms with different efficiencies (ii) Involvement in oxidative stress response (Independently from MLH1) (iii) Involvement in oxidative stress response (Independently from MLH1) (iv) Microsatellite instability and MNNG tolerance in <i>MSH2/MLH1</i> double mutants (v) Regulatory role in HR
MLH1	Heterodimers with MutL homologs Matchmaker for coordinating events from mismatch binding to DNA synthesis	<i>T. brucei</i> (Tb927.8.6840)	(i) Microsatellite instability and MNNG tolerance in <i>MSH2/MLH1</i> double mutants (ii) Regulatory role in HR

Tabla i2 (continuación): Mecanismos de reparación en tripanosomátidos (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Gene	Function	Organism (Gene ID)	Experimental data
NHEJ Genes			
Ku70	DSB recognition DSB bridging nucleolytic processing of the ends	<i>T. brucei</i> (Tb927.3.5030)	(i) Telomere maintenance
Ku80	Telomere maintenance	<i>T. brucei</i> (Tb927.6.1760)	
HR Genes			
Mre11	DSB end resection Nuclease activities	<i>T. brucei</i> (Tb927.2.4390) <i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053503801.30)	(i) Mre11 mutations cause impairment of HR and increased DNA damage sensitivity (i) Gene expression induced by DNA damaging agents (ii) Involved in DSBs and oxidative lesions repair
Rad51	Recombinases	<i>T. brucei</i> (Tb11.01.0360) <i>L. major</i> (LmjF28.0550)	(i) Null mutants led to impairments in VSG switch and DNA transformation, besides a higher sensitivity to genotoxic agents (i) Gene expression induced by DNA damaging agents
Dmc1	Recombinases	<i>T. brucei</i> (Tb09.211.1210)	(i) DMC1 mutation does not affect HR or VSG switching
BRCA2	ssDNA binding Recombination mediator	<i>T. brucei</i> (Tb927.1.640)	(i) Expansion in the number of BRG repeats (ii) BRCA2 mutants display antigenic variation impairment and genome instability
Rad51-3	ssDNA binding Recombination mediator activity	<i>T. brucei</i> (Tb11.02.0150)	(i) Rad51-3 mutations resulted in reduced levels of VSG switching, altered RAD51 localization following DNA damage and DNA damage sensitized parasites (i) Rad51-5 mutations caused altered RAD51 localization following DNA damage and DNA damage sensitized parasites
Rad51-5		<i>T. brucei</i> (Tb10.389.1770)	
TLS Genes			
Poly	Error-free bypass of cis-syn cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)	<i>T. cruzi</i> (Tc00.104705351191.1.120)	(i) Heterologous complementation of <i>S. cerevisiae</i> (ii) <i>In vitro</i> bypass of 8-oxoG (iii) Overexpression increases H ₂ O ₂ resistance
Pola	Bypass of N1-adducted dG lesions Extension of mismatched primer termini	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053503755.30)	(i) Mitochondrial localization (ii) <i>In vitro</i> bypass of 8-oxoG (iii) DNA synthesis with recombination intermediates (iv) Overexpression increases azoxin, gamma radiation, and H ₂ O ₂ resistance

La PARP de *T. cruzi* ha sido caracterizada en nuestro laboratorio. La actividad de esta enzima ha demostrado ser dependiente de la presencia de ADN, incrementándose de manera proporcional a la concentración de SSB. Además se demostró que agentes dañinos como el H₂O₂ y la β-lapachona inducen la síntesis de PAR en el núcleo del parásito, lo que indica que esta enzima podría estar implicada en la señalización de este fenómeno (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008).

Entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño en el ADN, 8-oxoG (también conocida como 8-oxoguanine o 7,8-dihidro-8-oxoguanina) presenta un interés excepcional por su alto potencial mutagénico y su abundancia. La 8-oxoG-ADN glicosilasa (OGG1) también fue encontrada en los Trypanosoma. Esta enzima elimina la lesión oxidativa 8-oxoG cuando está emparejada con la citosina. Esta lesión tiene la

capacidad de imitar funcionalmente a la timina, formando el par de base 8-oxoG:A estable. Esta conformación permite que las polimerasas replicativas del ADN no detecten eficazmente a la base dañada. La localización intracelular de OGG1 en *T. cruzi* es nuclear y mitocondrial, y su sobre-expresión disminuye los niveles de 8-oxoG dentro de ambas organelas tras el tratamiento con H₂O₂. La localización inusual de OGG1 en la mitocondria podría indicar la importancia del mantenimiento de la integridad del ADNk en este parásito. La caracterización de la TbPolβ también mostró tener una localización mitocondrial y tener actividad de ADN polimerasa y de liasa (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

La glucosilasa OGG1, junto a MutT y MutY, constituye el llamado sistema-GO que contribuye a contrarrestar los efectos mutagénicos del 8-oxoG. Los genomas de los Trityps revelaron que homólogos MutT están presentes en *T. brucei*, *L. major*, y posiblemente en *T. cruzi*. Esto no es inesperado dado que estos parásitos también tienen homólogos putativos de MutY (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Reparación por escisión de nucleótidos (NER): es uno de los mecanismos de reparación más versátiles, responsable de reparar las lesiones que alteran la conformación tridimensional del ADN, tales como aductos de cisplatino y lesiones inducidas por UV (dímeros de pirimidina y fotoproductos de pirimidina). Este mecanismo se puede dividir en dos grandes vías de reparación: la reparación global del genoma (GGR), que opera en las partes no codificantes del genoma y en la cadena no transcrita de los genes activos; y la reparación acoplada a la transcripción (TCR), que se activa cuando la lesión aparece en un gen que está siendo transcrito, asegurando que la hebra de los genes activos tenga prioridad en la reparación frente al resto del genoma (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Los genomas de los Trityps contienen la mayoría de los componentes de la NER, aunque los mecanismos bioquímicos de esta vía pueden presentar algunas diferencias menores respecto a la de eucariotas superiores.

Reparación de bases mal apareadas (MMR): promueve la estabilidad genética mediante la reparación de errores de replicación en el ADN (par de base individual mal apareada y bucles de inserción o delección, IDL), inhibiendo la recombinación entre secuencias de ADN no idénticas y participando en la respuesta frente a daños en el ADN inducidos por agentes genotóxicos como el H₂O₂, cisplatino, y N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Los aspectos fundamentales de esta vía están muy conservados durante la evolución. En esencia, MMR post-replicación opera a través de (i) el reconocimiento del ADN mal apareado por MutSα (MSH2-MSH6) o MutSβ (MSH2-MSH3), (ii) la

escisión de la sección del ADN dañado principalmente por Exo1, y (iii) la resíntesis del ADN por la ADN Pol δ y la ligación. Los pasos tras el reconocimiento del ADN no apareado son coordinados por el heterodímero MLH que se une a las proteínas MSH y probablemente reclutan y ensamblan los complejos río abajo. Las hebras discontinuas en la replicación del ADN pueden servir como puntos de entrada para la escisión de la cadena, confiriendo la especificidad de la hebra MMR (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Cada tripanosomátido codifica para un conjunto de proteínas MMR, lo que sugiere que los tres parásitos son plenamente competentes para el reconocimiento y la reparación de bases desapareadas.

En *T. brucei*, MSH2 se ha estudiado junto con MLH1. Las mutaciones en ambos genes dan lugar a un aumento de la inestabilidad de los microsatélites y a una mayor resistencia al agente alquilante MNNG. Ambos fenotipos son consistentes con un deterioro de la actividad MMR nuclear. Estos resultados indican que en tripanosomátidos esta vía es activa en la reparación de errores que surgen durante la replicación y en respuesta al daño químico. MMR también juega un papel regulatorio en la recombinación homóloga de *T. brucei*, ya que los mutantes dobles de MSH2 y MLH1 muestran una mayor frecuencia de recombinación, tanto entre moléculas de ADN perfectamente apareadas como entre moléculas de ADN con secuencias divergentes. Sin embargo, MMR tiene poca influencia sobre la variación antigénica de este parásito. Por otro lado, mutantes nulos MSH2- son más sensibles al H₂O₂ que las células controles; no así los mutantes nulos de MLH1. Por esta razón se cree que TbMSH2 cumpliría un papel adicional en respuesta al daño oxidativo, independiente al mecanismo de MMR (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Reparación de daños en el ADN de doble cadena (DSB)

Los daños en la doble cadena del ADN son un tipo particularmente peligroso de lesión. Los DSBs pueden surgir cuando en las horquillas de replicación se encuentran lesiones bloqueantes, las cuales conducen al colapso de las horquillas; o bien por inducción de radiaciones ionizantes y químicos radiomiméticos. El fracaso para reparar dichos daños puede causar la muerte celular o cambios cromosómicos en gran escala, incluyendo deleciones, translocaciones o fusiones cromosómicas que aumentan la inestabilidad genómica. Existen dos vías distintas y conservadas evolutivamente para la reparación de DSB: unión de extremos no homólogos (NHEJ) o recombinación homóloga (HR) (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

Unión de extremos no homólogos (NHEJ): es frecuentemente imprecisa. Los dos extremos de la DSB se mantienen juntos y se vuelven a ligar; a menudo seguido de la

pérdida de algunas secuencias por degradación nucleotídica o seguido de la adición por polimerización. NHEJ parece estar ausente en los tripanosomátidos. A excepción de Mre11, Rad50, KU70 y KU80, no han podido ser identificados otros factores implicados en NHEJ.

Recombinación homóloga (HR): proporciona una gran ayuda durante la replicación del ADN mediante la recuperación de las horquillas de replicación bloqueadas o rotas. El esquema general de reacción se puede resumir en tres pasos: en la iniciación (o pre-sinapsis) se produce la resección nucleolítica de DSBs, generando extremos 3'-OH en una de las hebras; intercambio de hebras (sinapsis), cuando el extremo(s) del DSB invade la molécula de ADN intacta mediante regiones con homología de secuencia; y resolución (post-sinapsis), cuando las hebras intercambiadas se separan y se repara el DSB. La HR es la principal vía de reparación de DSB en eucariotas inferiores.

El paso básico de HR es la búsqueda de homología, el apareamiento del ADN homólogo, y la reacción de intercambio de hebras mediada por las recombinasas RAD51 y DMC1. Ambas enzimas están presentes en los *Trypanosoma*. DMC1 es una putativa recombinasa específica de meiosis, y sólo se ha estudiado en *T. brucei*. La falta de DMC1 no afecta la reparación por HR o la variación antigénica de VSGs en este parásito. RAD51 ha sido caracterizada en los tres tripanosomátidos, y la expresión de RAD51 en *T. cruzi* y *L. major* es inducida por agentes que dañan el ADN como el H₂O₂. Su sobre-expresión les confiere una mayor resistencia, mientras que la eliminación de uno de sus alelos una mayor sensibilidad.

En *T. brucei* RAD51, y consecuentemente la HR, está directamente involucrada en la variación antigénica. La HR inter cromosómica es la principal vía utilizada por *T. brucei* para reparar DSBs. Después de la generación de un solo DSB a través de la endonucleasa Scel, RAD51 se acumula en los focos y se activa el punto de control G₂M. La carga de las recombinasas en la hebra del ADN es el paso limitante de todo el proceso, y se facilita por medio de la intervención de mediadores. Dentro de los mediadores de recombinación en estos tripanosomátidos se encuentran BRCA2, RAD51 y RAD54. RAD52, sin embargo, parece estar ausente en estos organismos.

Los estudios en *T. brucei* han mostrado que la HR está regulada por MMR en este organismo, mediante el rechazo de la HR entre secuencias de ADN que son insuficientemente homólogas.

Síntesis de trans-lesiones (TLS)

Las lesiones en el ADN pueden bloquear las polimerasas replicativas del ADN (Pol δ y Pol ϵ), provocando un alto en la horquilla de replicación. Esta detención

conduce a la monoubiquitinación de la PCNA por el complejo RAD6 / RAD18, promoviendo el reemplazo de la polimerasa replicativa por una polimerasa de ADN TLS, la cual cataliza la inserción de nucleótidos en el lado opuesto a la lesión. Luego, la extensión de nucleótidos es realizada mayormente por la polimerasa de ADN zeta (Pol ξ). Después de la etapa de extensión, las polimerasas replicativas reanudan la síntesis del ADN. Los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* codifican para una amplia variedad de proteínas de síntesis trans-lesión (Passos-Silva, Rajao et al. 2010).

MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN TRIPANOSOMÁTIDOS

Los tres tipos de muerte celular son: apoptosis, autofagia y necrosis. Todos ellos fueron observados en parásitos protozoarios (van Zandbergen, Luder et al. 2010).

La necrosis no es más considerada una desorganización caótica de la célula, sino un tipo de muerte caracterizado por una serie de respuestas definidas previas a la disolución final. Es la más fácil de reconocer ya que es un evento rápido (usualmente de minutos) que involucra la tumefacción de la célula y la ruptura de la membrana plasmática (van Zandbergen, Luder et al. 2010).

La apoptosis es un tipo de muerte que es dependiente de energía y requiere de la biosíntesis de proteínas. Durante la apoptosis, las células se programan para morir a partir de una señal externa que es reconocida por un “receptor de muerte”; desencadenándose una cascada de respuestas que incluyen la activación de nucleasas y cisteín-proteasas (caspasas) (Duszenko, Figarella et al. 2006). Esta es la vía extrínseca y la unión de citoquinas al receptor conduce a la activación de la caspasa 8 (CASP 8). Una segunda vía, la intrínseca, implica el sensado de un estado no saludable de la célula, conduciendo a la despolarización de la membrana mitocondrial interna, a la liberación de citocromo c y a la activación de CASP9. Ambas caspasas (CASP8 y CASP9) parecen ser las iniciadoras y activan a las caspasas efectoras (CASP3 y CASP7) mediante una escisión proteolítica limitada. Las caspasas efectoras luego activan a proteasas y nucleasas. Como consecuencia del proceso de apoptosis se produce la condensación de la cromatina y la degradación del ADN, la degradación de proteínas importantes para la integridad estructural del citoplasma, la perturbación de la membrana plasmática, la externalización de la fosfatidil-serina (PS) y, finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos; los cuales son tomados por los macrófagos para evitar la inflamación (Duszenko, Figarella et al. 2006).

Las características apoptóticas que manifiestan los parásitos incluyen la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo c, la activación de proteasas, la permeabilización de la membrana, la exposición de

residuos fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Duszenko, Figarella et al. 2006).

No todos los criterios clásicos de apoptosis descritos para las células de organismos multicelulares son observados en organismos unicelulares. Por ejemplo, hasta la fecha no han sido detectados en bacterias o protozoos ortólogos de las caspasas, consideradas vitales para la apoptosis en metazoos. Por otro lado, células carentes o con un funcionamiento reducido de la mitocondria como bacterias, eritrocitos o formas sanguíneas de *T. brucei* no pueden liberar al citocromo c durante la apoptosis (Duszenko, Figarella et al. 2006).

La carencia de caspasas permite especular que serían las metacaspasas (MCAs) (parálogas de las caspasas que contienen la diada catalítica His-Cys) y las paracaspasas (homólogos evolutivamente distantes de las caspasas metazoarias) las responsables de la apoptosis en las células tripanosomátidas. La existencia de cinco MCAs en *T. brucei* apoya esta teoría (van Zandbergen, Luder et al. 2010). Sin embargo, hasta el momento no ha habido evidencia que las mismas estén involucradas en el proceso de apoptosis, y su principal función estaría relacionada con el tráfico vesicular (Duszenko, Figarella et al. 2006).

Por otro lado, las dos endonucleasas involucradas en la fragmentación del ADN por la vía de activación independiente de caspasas son el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (EndoG) (van Zandbergen, Luder et al. 2010). AIF reside en el espacio intermembrana de la mitocondria y se libera para migrar hacia el núcleo en respuesta a estímulos de muerte apoptótica (Duszenko, Figarella et al. 2006). Sin embargo, aún no ha sido identificado un análogo de la AIF en tripanosomátidos. La translocación de EndoG desde la mitocondria hacia el núcleo fue evidenciada en *L. infantum* y la pérdida de la expresión de esta endonucleasa le confirió a *T. brucei* una robusta resistencia frente a la muerte celular dependiente de ROS (van Zandbergen, Luder et al. 2010).

Se demostró que lectinas como la Concanavalina A (ConA) inducen la expresión de marcadores apoptóticos en *T. brucei*. Las prostaglandinas de la serie J y la alta densidad de los cultivos también desencadenan un proceso apoptótico. Además, el estrés persistente en el RE sobre el estadio procíclico y un péptido de la defensa del hospedador bovino modificado (BMAP-18) conducen a un fenotipo similar (Jimenez-Ruiz, Alzate et al. 2010). Curiosamente, varios hallazgos sugieren que el mantenimiento de un equilibrio redox intracelular tiene un rol crucial en las decisiones de vida/muerte en ambas formas de *T. brucei*, y sugieren que las ROS actuarían como

mediadores en la vía de señalización de la muerte celular programada (Duszenko, Figarella et al. 2006). En resumen, se cree que los protozoarios poseen un mecanismo más bien primitivo de apoptosis que no depende de proteasas como las caspasas, sino más bien de la formación de ROS (Duszenko, Figarella et al. 2006).

El término “fenotipo apoptótico” todavía no es universalmente aceptado como descripción de este tipo de muerte celular en eucariotas inferiores (Jimenez-Ruiz, Alzate et al. 2010). Sin embargo hay que tener presente que los protozoarios se organizan en poblaciones y establecen comunicaciones intercelulares, lejos de ser individualidades aisladas. Además, en la última década ha habido un creciente número de informes que proporcionan evidencia de apoptosis en bacterias y protozoos (Duszenko, Figarella et al. 2006). Por otra parte, la fluctuante parasitemia en mamíferos característica de la infección por parte del estadio sanguíneo de *T. brucei* bien puede reflejar no sólo los esfuerzos del sistema inmunitario para destruir a estos parásitos, sino también una forma de regulación de estos microorganismos para mantener el tamaño de la población por esta vía (Welburn, Barcinski et al. 1997).

Los gráficos Bi-paramétricos (FSC y SSC) son muy útiles para detectar cambios en el volumen celular y han sido empleados con éxito para revelar el encogimiento celular relacionado con la muerte en parásitos como *Leishmania*. La pérdida de asimetría de la membrana plasmática y la externalización de la fosfatidil-serina (PS) puede ser detectada con Anexina V marcada (en general se utiliza FITC). Debido a que esto también puede ocurrir durante la necrosis la evaluación del tipo de muerte celular debe hacerse con una doble tinción PS/ ioduro de propidio (PI) y a varios tiempos distintos (Jimenez-Ruiz, Alzate et al. 2010). En los primeros estadios de la apoptosis la membrana plasmática permanece intacta, mientras que en la necrosis la membrana plasmática pierde su integridad rápidamente, evento que se puede medir mediante la incorporación de IP.

Por otro lado, mientras que la detección de la escalera de oligonucleótidos en geles de agarosa ha sido ampliamente utilizada en células apoptóticas de metazoarios, esta técnica no pudo ser adaptada con éxito a los tripanosomátidos. Una alternativa para corroborar la fragmentación de ADN característica de la apoptosis en estos microorganismos es la técnica de TUNEL, la cual consiste en el etiquetado *in situ* de los extremos 3'-OH terminales con un fluorocromo mediante el uso de una desoxinucleotidil- transferasa terminal (TdT) exógena. (Jimenez-Ruiz, Alzate et al. 2010).

LA PROTEÍNA PARP

ASPECTOS GENERALES

La enzima Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), también denominada ADP-ribosiltransferasa (ADPRT) o Poli (ADP-ribosa) sintetasa (PARS), cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa a partir de NAD^+ ; generando polímeros lineales o ramificados (PAR) (Fig. i19). Esta modificación covalente puede cambiar las propiedades bioquímicas y la localización subcelular de las proteínas diana (Langelier, Ruhl et al. 2010). Además, el propio polímero puede interactuar con diversas proteínas blanco, las cuales cuentan con un motivo consenso de unión a PAR que se suele superponer con el dominio funcional (Schreiber, Dantzer et al. 2006).

La síntesis de ADP-ribosa se cataliza a partir de la forma oxidada del NAD, por escisión del enlace glicosídico entre la nicotinamida y la ribosa. La modificación covalente de las proteínasceptoras se realiza mediante la formación de un enlace éster entre la subunidad de ADP-ribosa y los residuos de glutamato o aspartato, o del carboxilo terminal de la lisina. A continuación, PARP cataliza una reacción de elongación y ramificación utilizando unidades de ADP-ribosa adicionales. Esto genera nuevas uniones ribosil-ribosilo y polímeros de una longitud de aproximadamente 200 subunidades con varios puntos de ramificación (Diefenbach and Burkle 2005). Las bifurcaciones también son de carácter glicosídico, encontrándose nacimientos de nuevas ramas cada 20-50 unidades lineales, dispuestas sin un patrón evidente (Miwa, Ishihara et al. 1981) (Kanai, Miwa et al. 1982). PAR es entonces un homopolímero polianiónico constituido por unidades de ADP-ribosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos $1'' \rightarrow 2'$. Tanto la naturaleza de los monómeros que lo conforman como las uniones entre ellos le confieren a este polímero una estructura helicoidal (D'Amours, Desnoyers et al. 1999).

La Poli (ADP-ribosil)ación se produce en casi todas las células nucleadas de mamíferos, plantas y eucariotas inferiores; pero está ausente en levaduras (Diefenbach and Burkle 2005).

La familia de la PARP humana (hPARP) está compuesta por 17 miembros con actividad mono (ADP-ribosil) o poli (ADP-ribosil) transferasa, confirmada o putativa, y todos comparten el "motivo PARP" presente en el dominio catalítico (Fig. i20) (Luo and Kraus 2012). Hasta el momento, solo 6 proteínas han probado tener capacidad de sintetizar PAR (hPARP1, 2 y 3, vPARP, tankirasas 1 y 2), mientras que el resto parecería transferir un único residuo de ADP-ribosa a las proteínasceptoras (Burkle and Virag 2013).

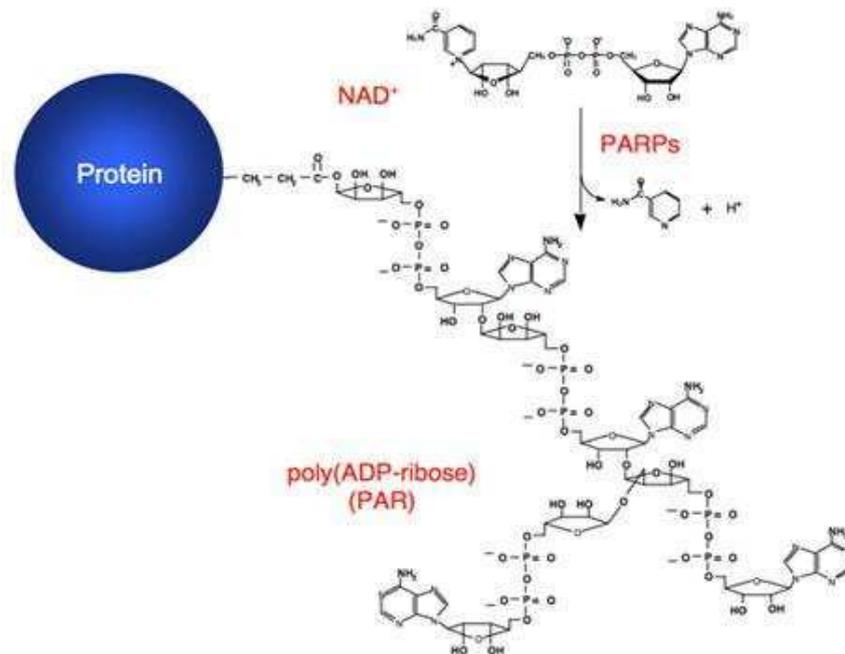


Figura i19. La Poli (ADP-ribose) polimerasa (PARP) cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribose a una proteína aceptora a partir de NAD⁺, formando un polímero de ADP-ribose (PAR) sobre la misma.

Recientemente, una nomenclatura unificadora fue propuesta para esta familia génica (ARTD1-18) (Hottiger, Hassa et al. 2010).

La función más ampliamente estudiada de las PARPs ha sido el papel fundamental de la PARP-1 humana (hPARP-1) en la señalización y en la reparación del daño genómico. La unión de la hPARP-1 nuclear a rupturas en el ADN de doble cadena (DSB) o de cadena simple (SSB) desencadena la síntesis de PAR (Huambachano, Herrera et al. 2011). También se comprobó que hPARP-1 es catalíticamente activa como dímero (Diefenbach and Burkle 2005) y, al igual que muchas enzimas que participan en el metabolismo de ácidos nucleicos, hPARP-1 requiere de Mg²⁺ como co-factor (Ushiro, Yokoyama et al. 1987).

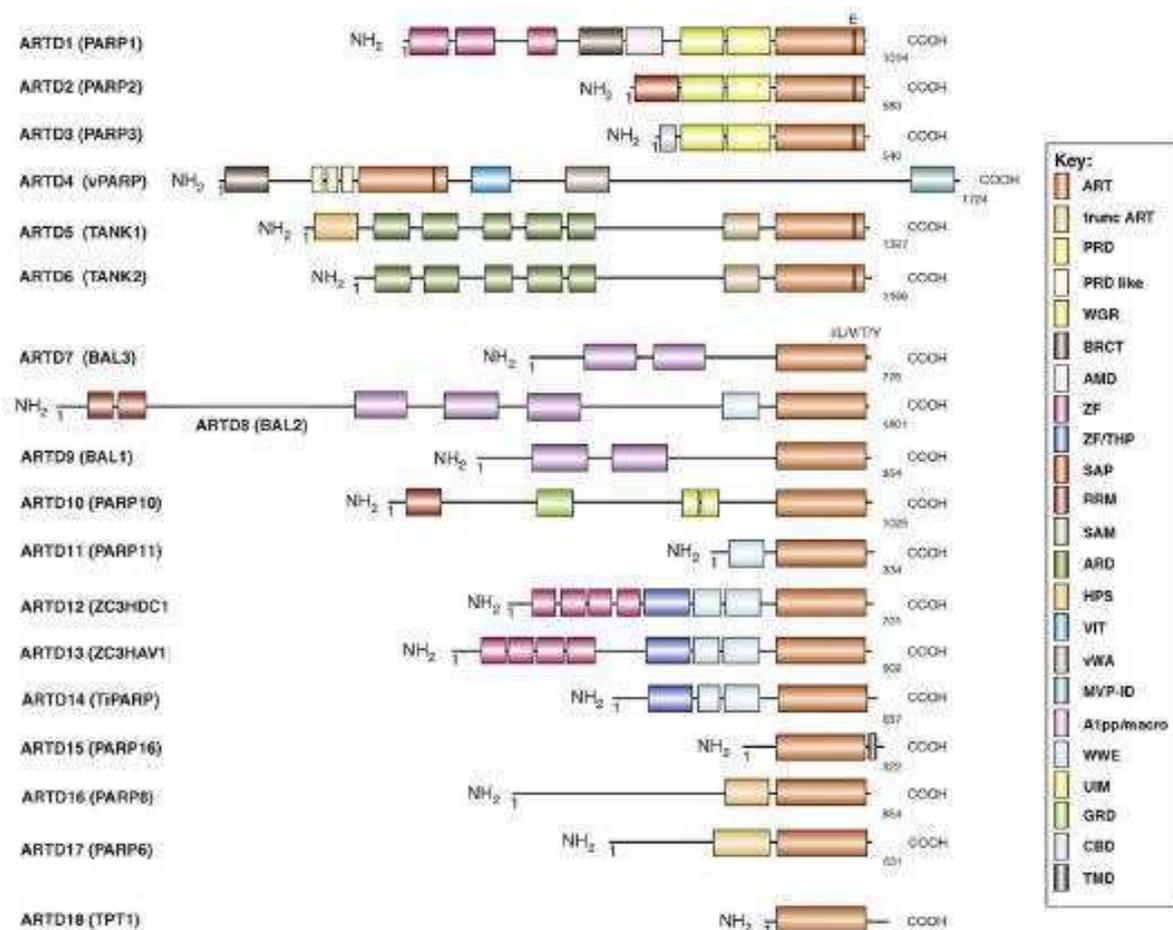


Figura i20. Arquitectura de los dominios de la superfamilia PARP humana. Todos los miembros presentan un dominio catalítico unido a otros motivos adicionales, los cuales les confieren diferentes funcionalidades y localizaciones subcelulares (Hottiger, Hassa et al. 2010).

La proteína diana más prominente de la reacción de poli (ADP-ribosil)ación es la propia hPARP-1, aunque también han sido descritas muchas otras proteínas aceptoras como histonas, proteínas de reparación del ADN, factores de transcripción y moduladores de la cromatina (Luo and Kraus 2012). Debido a la alta carga negativa del polímero, esta modificación post-traducciona altera significativamente las propiedades físicas y bioquímicas de las proteínas aceptoras, tales como su afinidad de unión al ADN, y es probable que dicha transformación tenga una función regulatoria en la interacción con otras proteínas (Diefenbach and Burkle 2005).

Recientemente se ha probado que la unión a rupturas en el ADN no es el único mecanismo de activación de PARP. hPARP-1 también se une y activa frente a ciertas estructuras diferentes al ADN-B; como ADN curvado, ADN cruciforme o regiones

estables de ADN desapareado. Más aún, la fosforilación de hPARP-1 por ciertas quinasas como la proteína quinasa II δ (CaMKII δ) dependiente de calcio y calmodulina, JNK1 y AMPK; o la interacción física entre hPARP-1 y una quinasa fosforilada activa (Erk1/2) también activarían a la enzima en ausencia de lesiones en el ADN. Además, modificaciones post-traduccionales como las de acetilación o de ADP-ribosilación estimularían la función de la enzima (Fig. i21) (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

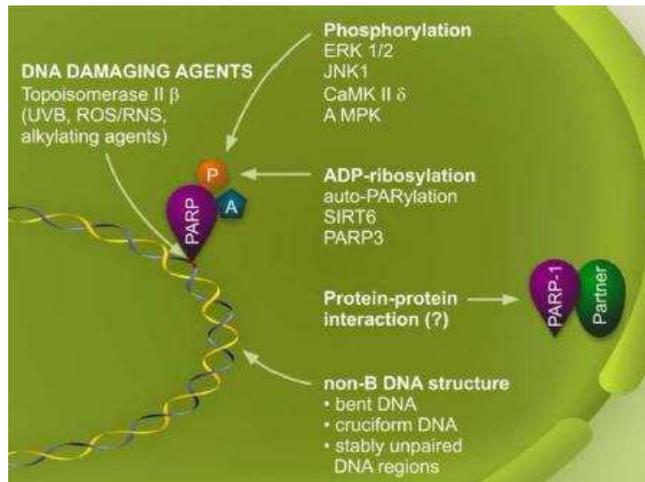


Figura i21. Vías de activación de PARP. La vía clásica de activación es desencadenada por rupturas en el ADN causadas por especies ROS/RNS, UVB o radiaciones ionizantes. Sin embargo, hPARP-1 también puede ser activada por medio de vías alternativas.

La enzima hPARP-2 también es activada por la presencia de rupturas en el ADN (Diefenbach and Burkle 2005) y fue descubierta por la presencia de una actividad PARP residual en fibroblastos embrionarios derivados de ratones deficientes de hPARP-1 (Ame, Spenlehauer et al. 2004). La estructura de esta enzima nuclear se asemeja a una versión truncada en el fragmento N-terminal de la hPARP-1 (Diefenbach and Burkle 2005), presentando la mayor similitud con el dominio catalítico de esta proteína (69%) (Ame, Spenlehauer et al. 2004). El dominio de unión al ADN, en cambio, es diferente. Éste está compuesto de sólo 64 aminoácidos y no contiene ningún motivo canónico de unión al ácido nucleico; sin embargo, es rico en aminoácidos básicos, lo que podría ser relevante para la interacción con la macromolécula (Diefenbach and Burkle 2005). Tanto hPARP-1 como hPARP-2 pueden homo- y heterodimerizar. Además, hPARP-2 interactúa con hPARP-1, con quien comparte socios en común implicados en las vías de reparación de cadena simple y por escisión de bases (BER): XRCC1, ADN polimerasa- β , y la ADN ligasa III (Ame, Spenlehauer et al. 2004). Ambas enzimas poseen funciones solapadas y no redundantes en el mantenimiento de la estabilidad genómica y durante el desarrollo embrionario (Diefenbach and Burkle 2005).

La enzima hPARP-3 ha sido identificada como un componente central del centrosoma, y está preferentemente situada en el centríolo hijo a lo largo de todo el ciclo celular (Ame, Spenlehauer et al. 2004). Se ha demostrado que esta enzima influye negativamente en la progresión del ciclo celular, en la frontera de la transición G₁/S, sin interferir con la duplicación del centrosoma (Diefenbach and Burkle 2005). De todas las PARPs, es la que contiene el dominio N-terminal más pequeño, con sólo 54 residuos, siendo éste el responsable de la localización centrosomal (Ame, Spenlehauer et al. 2004). La estructura de sus dominios es muy parecida al de la hPARP-2 (Diefenbach and Burkle 2005). La actividad de hPARP-3 es muy difícil de detectar; no obstante puede ser inhibida por el inhibidor de PARP 3-aminobenzamida (Ame, Spenlehauer et al. 2004).

hPARP-4 (VPARP), la de mayor tamaño de la familia (192,6 kDa), fue descubierta asociada a partículas "Vault"; complejos ribonucleoproteicos citoplasmáticos. La función de estas partículas inusuales es desconocida, pero se cree que podrían desempeñar un papel en el transporte celular. La organización de sus dominios es bastante diferente a la del resto, ya que el dominio catalítico se encuentra en la región N-terminal de la proteína. VPARP, al igual que las partículas "Vault" purificadas, es capaz de catalizar la poli(ADP ribosil)ación de MVP, la principal proteína de la partícula "Vault" (Ame, Spenlehauer et al. 2004).

La hPARP-5a o Tankirasa 1 fue identificada como la compañera de la proteína telomérica humana TRF1. La sobreexpresión de la Tankirasa 1 promueve la ADP-ribosilación de TRF1, que conduce a su liberación de los telómeros y al alargamiento de éstos (Ame, Spenlehauer et al. 2004). Además, parece ser un importante blanco en la vía de señalización de la insulina (Diefenbach and Burkle 2005). La Tankirasa 1 contiene al dominio homólogo de la hPARP-1 más pequeño que aún muestra actividad enzimática PARP. Este sitio catalítico se extiende por sólo 240 aa en comparación con los 353 aa de la hPARP-1. También contiene un dominio SAM (Motivo Alfa Estéril) el cual actúa como un módulo para interactuar con proteínas mediante su capacidad para homo-y hetero-oligomerizarse con otros dominios SAM, incluyendo el de la Tankirasa 2. La mayor parte de la proteína, que abarca 843 aa, está compuesta por repeticiones de Ankyrina organizadas en cinco grupos que le permiten interactuar con otras proteínas. Además, el dominio N-terminal acarrea homopolímeros de His, Pro y Ser (HPS) que albergan un motivo consenso de MAP quinasa (PXSP) (Ame, Spenlehauer et al. 2004). La Tankirasa 1 parece ser regulada por su estado de fosforilación (Diefenbach and Burkle 2005).

También fue descubierta una segunda tankirasa hPARP-5b o Tankirasa 2, la cual es codificada por un gen distinto. La secuencia de esta proteína exhibe una identidad > 85% con la Tankirasa-1, pero carece del motivo HPS. Las Tankirasas 1 y 2 interactúan con el mismo grupo de proteínas y probablemente median funciones solapadas involucradas en la homeostasis de los telómeros y el tráfico vesicular (Ame, Spenlehauer et al. 2004). Además, ambas tankirasas pueden auto-asociarse a través del dominio SAM para formar complejos de alto peso molecular, lo que afirma su función como moléculas de andamiaje para la organización de complejos proteicos (Diefenbach and Burkle 2005). La Tankirasa 2, sin embargo, muestra propiedades distintas a las de la Tankirasa 1 ya que cuando se sobre-expresa, induce la muerte celular independiente de caspasas a través de la pérdida del potencial mitocondrial; un proceso que es inhibido por el inhibidor de PARP 3-aminobenzamida (Ame, Spenlehauer et al. 2004).

hPARP-7 (TiPARP) fue identificada de otra manera, mediante la inducción de su ARNm. La función exacta de la TiPARP sigue siendo poco clara, aunque parece estar implicada en la función de las células T. La proteína transcripta/ traducida *in vitro* parece catalizar la poli (ADP-ribosil)ación de histonas, a pesar de la ausencia de un residuo Glu catalítico equivalente al Glu 988 de la hPARP-1 (Ame, Spenlehauer et al. 2004).

Al igual que las PARPs descritas anteriormente, el resto de los miembros de esta familia proteica también combinan sus dominios catalíticos con una variedad de dominios adaptadores. WWE es uno de los más frecuentes y está presente en proteínas asociadas a la ubiquitinación (hPARP-7, hPARP-11 a hPARP-14). Presenta un motivo putativo para la interacción proteína-proteína que contiene dos residuos de Trp conservados y uno de Glu. Este vínculo de algunas PARPs con la ubiquitinación también se manifiesta a través del motivo de interacción con de ubiquitina (UIM) presente en la hPARP-10. Algunas PARPs también poseen motivos específicos para la unión al ARN (hPARP-10 y hPARP-15), el cual también aparece en ciertas proteínas de unión al ADN de una sola hebra (Ame, Spenlehauer et al. 2004).

PARP-9 / BAL 1, PARP-14 / BAL2 / CoaSt6 y PARP-15 / BAL3 pertenecen a la subfamilia de macro-PARPs, las cuales acoplan el dominio PARP a 1-3 dominios macro, cuyo prototipo está presente en la variante de la histona macroH2A. Algunos dominios macro pueden unirse a derivados de ADP- ribosa. Se cree que las macro-PARPs serían cofactores de transcripción (Schreiber, Dantzer et al. 2006).

COMPOSICIÓN DE LOS DOMINIOS

hPARP-1 es una enzima de 116 kDa que posee una estructura modular compuesta por tres dominios principales (Fig. i22) (Luo and Kraus 2012). i) Un dominio N-terminal de unión al ADN, el cual contiene tres dominios dedos de Zn (Zn1, Zn2 y Zn3) y una señal de localización nuclear (NSL). ii) Un dominio central de auto-modificación, el cual contiene varios residuos de glutamato, aspartato y lisina que son putativos aceptores de auto- (ADP-ribosil)ación. Además contiene un motivo de cremallera de leucinas que media la homo-dimerización o la hetero-dimerización, y un dominio BRCA1 C-terminal (BRCT) que se une a fosfopéptidos. iii) Y un dominio catalítico C-terminal, el cual comprende al dominio WGR, rico en triptófano, glicina y arginina; y al “dominio PARP” requerido para la catálisis de la síntesis de PAR (Luo and Kraus 2012).

Los dominios dedos de zinc Zn1 y Zn2 son homólogos y forman el módulo de unión al ADN. El tercer dominio Zn3 es esencial para la actividad dependiente de ADN (Langelier, Ruhl et al. 2010) (Fig i23). El dominio BRCT está involucrado en las interacciones entre la hPARP-1 con otras enzimas. La función precisa del dominio WGR no se conoce, aunque informes recientes sugieren que jugaría un papel en la regulación de la actividad catalítica. Entre los dominios BRCT y WGR se encuentra un péptido de 60-residuos francamente básicos, dentro del cual los residuos de lisina y ácido glutámico son conocidos por su capacidad de unirse al polímero de PAR. Debido a que este péptido no forma ninguna estructura terciaria particular, el mismo es susceptible de ser digerido por proteasas. Además, esta secuencia ha sido identificada como el sitio de unión al ADN de doble cadena. La forma libre de este dominio inhibe la elongación del polímero de PAR, mientras que la unión al ADN doble cadena rescata a la proteína de esta inhibición, permitiendo la formación de un largo polímero. Por último, el dominio catalítico C-terminal (CAT) realiza la síntesis del polímero (Huambachano, Herrera et al. 2011). La estructura cristalina de este fragmento reveló una notable homología con las toxinas bacterianas que actúan como mono (ADP-ribosil) transferasas (Diefenbach and Burkle 2005).

Estudios en los que se utilizó un fragmento del dominio Zn1-Zn2 indicaron que hPARP-1 se une al ADN como dímero, siendo esta dimerización un paso crítico en la activación de la proteína (Langelier, Ruhl et al. 2010). Las isoenzimas hPARP-2 y hPARP-3 también son activadas por ADN mellado y, notablemente, hPARP-2 contiene pero hPARP-3 carece de dominios dedos de zinc (Johansson 1999).

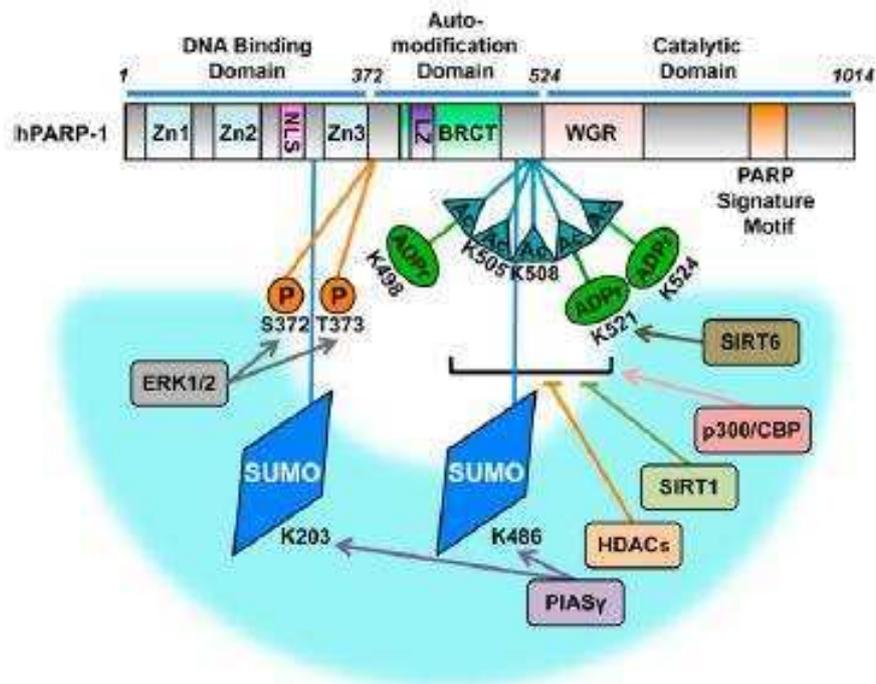


Figura i22. Organización estructural y funcional de hPARP-1, y las cuatro modificaciones post-traduccionales que puede sufrir. LZ: cremallera de leucinas. P: fosforilación; SUMO: SUMOilación; Ac: acetilación; ADPr: mono o poli (ADP-ribosil)ación. Se indican los residuos S, K y T que son sitios específicos de modificaciones covalentes. Dentro del arco celeste se nombran a las enzimas que agregan (flechas) o remueven (líneas) modificaciones específicas (Luo and Kraus 2012).

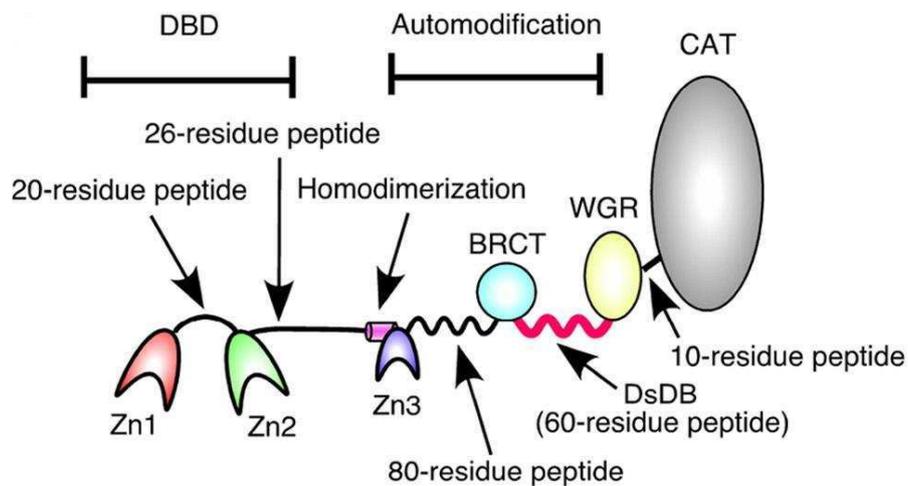


Figura i23. Ilustración de los dominios funcionales de hPARP-1 (Huambachano, Herrera et al. 2011).

Tabla i3. Grupos de la superfamilia PARP humana. El número de aminoácidos y el pI corresponden a la proteína entera. El % de identidad corresponde al dominio catalítico, y es respecto a la hPARP-1 (Otto, Reche et al. 2005).

pART ¹	Símbolo del gen	Otros nombres	Número de aminoácidos	Punto isoeléctrico	% Identidad ²
1	PARP1	PARP	1014	9,3	100
2	PARP2	PARP-2	583	8,6	52
3	PARP3	PARP-3	540	6,7	36
4	PARP4	Vault PARP	1724	5,3	35
5	TNKS	Tanquirasa	1327	7,0	33
6	TNKS2	Tanquirasa II	1166	7,2	30
7	PARP15		444	8,0	22
8	PARP14		1518	8,4	18
9	PARP9	BAL	854	7,9	21
10	PARP10	PARP-10	1025	4,6	19
11	PARP11		331	7,8	21
12	ZC3HDC1		701	8,6	23
13	ZC3HAV1	ZAP	902	8,7	22
14	TIPARP	TIPARP	657	8,4	20
15	PARP16		322	9,4	22
16	PARP8		854	9,5	20
17	PARP6		630	8,4	19

El dominio catalítico comprende un plegamiento de unión a NAD⁺ y está compuesto por 6 cadenas β y una hélice α. Además, la triada catalítica H (histidina)-Y (tirosina) -E (ácido glutámico) está conservada en hPARP-1, hPARP-2, hPARP-3, VPARP y tankirasas 1 y 2 (Otto, Reche et al. 2005). De acuerdo a la similitud de secuencia de este dominio, Otto et al (2005) dividió a la familia PARP humana en 5 grupos diferentes (Tabla i3).

ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA PROTEÍNA TbPARP DE *Trypanosoma brucei*

La primera proteína con actividad poli (ADP-ribosa) polimerasa en un tripanosomátido fue reportada por Villamil y colaboradores en 2001 en *Crithidia fasciculata* (Villamil, Podesta et al. 2001) (Podesta, Garcia-Herreros et al. 2004). La enzima de 55 kDa fue caracterizada en profundidad y se determinó que la misma requería de ADN activado (mellado) para llevar a cabo su actividad, la cual aumentaba por la presencia de histonas. Además, esta proteína de localización nuclear se encontraba dimerizada, aunque no requería de Mg²⁺ ni de algún otro co-factor

metálico. Su actividad pudo ser inhibida con 3-AB, nicotinamida, teofilina, timidina, xantina, hipoxantina y β -lapachona; pero no por adenosina ni α -lapachona. También se pudo determinar que la auto-modificación de la PARP de *C. fasciculata* conducía a la pérdida de su actividad.

Más tarde, nuestro grupo de trabajo identificó a ortólogos de PARPs en otros tripanosomátidos. A partir de la secuencia génica de la PARP de *Dictyostelium discoideum* (N° de acceso XP629373) se realizó una búsqueda en la base de datos de *T. cruzi* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1/>) utilizando el algoritmo WU-Blast2 (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008). La detección de genes putativos de PARP arrojó un marco abierto de lectura (ORF) codificante para una proteína de 592 aminoácidos. El peso molecular predicho era de 65 kDa y el *PI* estimado 9,5 (ProtParam Software). La secuenciación de este fragmento génico confirmó la presencia de un gen de 1779 pb de longitud al que se denominó “Poli (ADP-ribosa) polimerasa de *Trypanosoma cruzi*” (TcPARP). El mismo fue anotado con el N° de acceso DQ061295 en GenBank.

Tabla i4. Identidad de los dominios catalíticos de las PARPs humanas, TbPARP y TcPARP. (Extraído del trabajo de tesis de Rodrigo Baltanas, FCEN-UBA). pART es otra denominación de PARP (ver tabla i3).

pART	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	PARPtc	PARPtb
1	*	52	36	35	33	30	22	18	21	19	21	23	22	20	22	20	19	47	51
2		*	35	33	31	30	20	20	19	24	23	19	23	25	22	24	23	45	47
3			*	26	30	28	25	29	24	21	23	26	31	22	20	21	23	32	36
4				*	29	30	25	20	21	21	20	18	23	23	21	22	22	33	32
5					*	89	28	22	25	23	28	31	25	28	20	20	17	28	29
6						*	32	26	32	24	27	32	25	31	22	23	19	28	29
7							*	65	28	36	36	41	33	41	21	17	18	19	19
8								*	31	38	38	38	31	38	21	18	22	22	21
9									*	28	24	26	29	27	15	17	16	18	22
10										*	38	35	26	35	18	15	16	20	19
11											*	46	39	44	20	22	20	23	21
12												*	40	46	20	19	19	22	26
13													*	37	21	20	19	26	20
14														*	19	21	23	23	20
15															*	33	34	23	20
16																*	76	22	24
17																	*	22	25
PARPtc																		*	65
PARPtb																			*

A su vez, la secuencia de la proteína TcPARP fue utilizada para la búsqueda de ortólogos en las bases de datos de *Trypanosoma brucei* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1/>) y *Leishmania major* (GeneDB). Mientras que el genoma de *L. major* no parecía codificar para ninguna enzima PARP, en *T. brucei* se identificó un único ORF (Tb05.26K5.30) ubicado en el cromosoma 5. Esta secuencia génica, denominada “Poli (ADP-ribosa) polimerasa de *Trypanosoma brucei*” (TbPARP), fue confirmada por secuenciación y depositada en GenBank con el N° de acceso DQ679800 (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008). El gen codificante de TbPARP consta de 1722 pb de longitud y codifica para una proteína de 573 aa. La predicción del peso molecular de esta enzima indicó que la misma tendría un tamaño de 65,26 kDa y un *PI* estimado de 9,5 (ProtParam Software). Las enzimas TbPARP y TcPARP resultaron ser llamativamente parecidas.

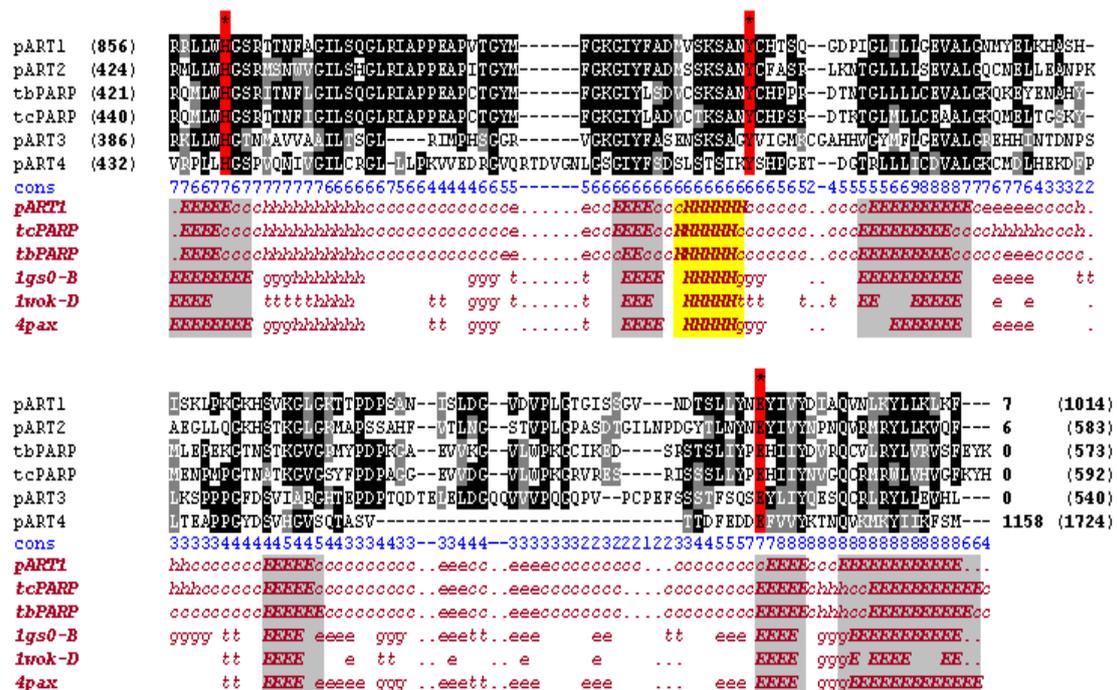


Figura i24. Alineamiento múltiple del dominio catalítico de TbPARP, TcPARP y del grupo 1 de las hPARPs utilizando la herramienta 3DCoffee. pART 1-4 son las hPARPs 1-4; 1wok-D, 1gs0-B y 4pax son los dominios catalíticos cristalizados de hPARP-1, PARP-2 murina y PARP-1 de gallina, respectivamente. La confianza en la predicción (conf) se indica en números azules (9 es la máxima confianza). La estructura secundaria se indica debajo del alineamiento: e y E: es lámina β extendida (gris); h y H: hélice α (amarillo); t: giro; g: hélice pi y c: no asignado. En rojo se señalan los 3 aminoácidos que conforman la triada catalítica. Las estructuras secundarias de las proteínas cristalizadas fueron tomadas de PDB, las predicciones de TcPARP y TbPARP fueron generadas con DomPred y PSIPRED y la estructura secundaria de hPARP-1 fue tomada de Otto et al. (2005). Los números en paréntesis indican los fragmentos del dominio catalítico utilizados en el alineamiento. (Extraído del trabajo de tesis de Rodrigo Baltanás, FCEN-UBA).

El análisis de las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas reveló algunos puntos interesantes. Un alineamiento múltiple con las secuencias del dominio catalítico de TbPARP, TcPARP y de los 17 miembros de la familia PARP humana mostraron que las dos proteínas de los tripanosomátidos comparten una mayor identidad con las PARPs humanas del grupo 1 de Otto (Otto, Reche et al. 2005), el cual incluye a las proteínas hPARP-1,2,3 y 4 (vPARP). Además, entre ellas, TbPARP y TcPARP exhiben un 65% de identidad entre sí (Tabla i4) (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008). Un segundo alineamiento múltiple basado en la estructura se realizó con las secuencias de TbPARP, TcPARP y hPARPs del grupo 1. Tanto la predicción de los motivos de la estructura secundaria de TbPARP, TcPARP y hPARP-1 como los dominios catalíticos cristalizados de varias PARPs (hPARP-1, PARP-2 murina y PARP-1 de gallina) mostraron una conformación conservada del dominio catalítico, el cual comprende 6 láminas β y una hélice α (Fig. i24). El alineamiento también destacó la conservación de la triada catalítica H-Y-E, que sólo está presente en los grupos 1 y 2 de las hPARPs (este último incluye a las tanquirasas 1 y 2). Dentro de esta triada, el ácido glutámico ha demostrado ser crítico para la actividad catalítica de muchas PARPs (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008).

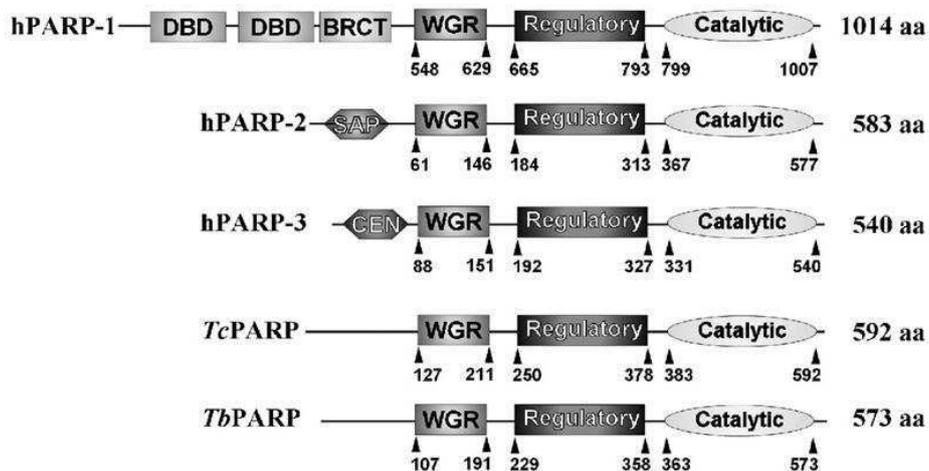


Figura i25. Arquitectura de los dominios de las PARPs humanas y tripanosomátidas. Dominios de interacción con proteínas: BRCT (proteína C-terminal supresora del cáncer de mama), WGR (dominio WGR); dominios de unión al ácido nucleico: DBD (dominio de unión al ADN), SAP (dominio putativo de unión al ADN), CEN (localización centriolar) (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008).

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio comparativo abarcando la arquitectura global de los dominios (Fig. i25). Las proteínas TbPARP (573 aa) y TcPARP (592 aa) son considerablemente más cortas que la hPARP-1 (1014 aa), y similares en longitud a la hPARP-2 (583 aa) y a la hPARP-3 (540 aa). Estos polipéptidos contienen los dominios canónicos WGR y catalítico (CAT); dentro del cual también se encuentra un motivo regulatorio (REG). Sin embargo, todos los dominios dedos de Zn y el dominio BRCT característicos de la hPARP-1 están ausentes (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008).

ANTECEDENTES DE TcPARP EN *Trypanosoma cruzi*

La proteína TcPARP fue estudiada exhaustivamente por nuestro grupo de trabajo. La expresión de esta enzima fue confirmada en los tres estadios de *T. cruzi* (amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes). En epimastigotes, el tratamiento con H₂O₂ o β-lapachona estimuló su aparición en el núcleo, con la concomitante formación de PAR en esta organela; en células no tratadas, en cambio, TcPARP presentaba una localización citoplasmática. Lo mismo fue observado ante la exposición con radiación UV-C. Además, existió una clara correlación entre la generación del polímero nuclear y la dosis del agente de daño (H₂O₂ y radiación UV-C); manteniéndose invariable la concentración de TcPARP en la célula. Llamativamente, los mecanismos de reparación del ADN y de muerte celular difirieron de acuerdo al agente causal de daño, así como también las proteínas modificadas por poli (ADP-ribosil)ación. A dosis letales, la radiación UV-C desencadenó un proceso necrótico mientras que el H₂O₂ condujo a una muerte celular apoptótica. Llamativamente, solo los parásitos con la función de TcPARP inhibida presentaron un aumento en la resistencia frente a la radiación UV-C, no así frente al tratamiento con H₂O₂; corroborando la teoría que TcPARP juega un papel diferencial frente a la respuesta desencadenada por distintas noxas (Vilchez Larrea, Alonso et al. 2011).

Si bien la sobre-expresión de TcPARP no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de los epimastigotes transgénicos en condiciones no estresantes, la inhibición de la actividad de esta enzima con el compuesto 3-AB produjo una disminución en el crecimiento de los parásitos *wild-type* del 60%. El impacto negativo de la ausencia de una TcPARP funcional sobre el cultivo dio el puntapié inicial para la búsqueda de nuevos inhibidores, la mayoría de los cuales se adhieren al sitio altamente conservado de unión a la nicotinamida. Veliparib, Olaparib y Rucaparib reprimieron efectivamente la formación de PAR *in vivo*; mientras que EB-47 no produjo inhibición alguna y 4-ANI

solo lo hizo marginalmente. De todos ellos, Olaparib fue el compuesto más efectivo para inhibir la actividad catalítica de TcPARP (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación también demostró que TcPARP podría participar en el proceso de infección y proliferación de *T. cruzi*. La presencia de Olaparib en células Vero infectadas *in vitro* con tripomastigotes resultó en una disminución en el número de amastigotes intracelulares a los 4 y 6 días post-infección, viéndose afectadas las etapas posteriores a la infección primaria o inicial. En contraposición, el número de tripomastigotes en el sobrenadante permaneció invariable (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012).

Debido a que el Olaparib puede inhibir tanto a TcPARP como a hPARP-1, se realizó un experimento similar utilizando células cancerígenas A549 en las cuales la hPARP-1 había sido silenciada (sh-PARP). Aún en ausencia de Olaparib se obtuvo el mismo efecto que el observado con las células Vero, indicando que sería la PARP del huésped y no la TcPARP la que participaría en el proceso de infección. En este punto (día 6) el número de tripomastigotes en el sobrenadante se mantuvo invariable en ambos cultivos celulares, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor. Sorprendentemente, a los 9 días post-infección la presencia de Olaparib provocó un aumento de la cantidad de tripomastigotes en el sobrenadante en ambos tipos celulares, incluso en las células A549. Este hallazgo confirmó que, además de la PARP del hospedador, TcPARP también juega un papel en el proceso de re-infección del parásito (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012).

La posibilidad de obtener a la proteína TcPARP recombinante también permitió su caracterización *in vitro*. Se demostró que el ADN mellado fue capaz de activar la proteína y aumentar su actividad catalítica considerablemente, de una manera dependiente de la concentración. Además, la adición de histonas de *T. cruzi* o de histonas comerciales II-A bovinas incrementaron dicha actividad hasta 10 veces; habiendo sido ambas proteínas ADP-ribosiladas. Llamativamente, no se observó un aumento de su actividad en la misma magnitud ante la presencia de daños en una sola hebra o en ambas cadenas del ADN. TcPARP tampoco requirió de co-factores como Mg^{2+} para llevar a cabo su función, y los cationes divalentes Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} resultaron incluso inhibitorios de la poli (ADP-ribosil)ación. La actividad enzimática también fue inhibida por 3-AB, nicotinamida, teofilina y timidina; coincidiendo con los resultados obtenidos previamente con su ortólogo en *C. fasciculata*. Sin embargo, la función de la enzima TcPARP no se vio afectada por menadiona, un conocido inhibidor de mono (ADP-ribosa)transferasas, y el ATP sólo lo hizo parcialmente; éste ha sido implicado en la regulación de la actividad de PARP, particularmente al nivel de la

reacción de auto-modificación. Con respecto a este último punto, nuestro grupo también demostró que TcPARP es blanco de su propia actividad y que la remoción de la cadena de ADP-ribosa unida a ella resulta en un aumento de la poli (ADP-ribosil)ación. Una posible explicación de la inhibición de la actividad de la PARP auto-modificada radica en el aumento de la repulsión entre la proteína modificada y el ADN mellado producto de la incorporación de grupos cargados negativamente; siendo estos polímeros de longitud variable (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008).

LA PROTEÍNA PARG

ASPECTOS GENERALES

La cadena de poli (ADP-ribosa) tiene un carácter transiente, existiendo un equilibrio dinámico entre su síntesis y degradación. La rotación de PAR en la célula es muy rápida, y su vida media está en el orden de minutos (Luo and Kraus 2012). La Poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) es la principal responsable del catabolismo de PAR y lleva a cabo la hidrólisis del polímero (Fig. i26). La otra enzima encargada de la degradación de PAR es la ARH3 (Illuzzi, Fouquerel et al. 2014).

PARG exhibe actividad endo- y exo-glicosídica. El producto de reacción son poli (ADP-ribosa)s libres y monómeros de ADP-ribosa; siendo este último un azúcar que puede glicosilar proteínas, causándoles graves daños. La pirofosfatasa de ADP-ribosa convierte las moléculas de ADP-ribosa libres en AMP y ribosa 5-fosfato, compuestos que son mucho menos propensos de inducir glicosilación. Finalmente, PARG tiene la capacidad de escindir al grupo ADP-ribosilo unido directamente a la proteína aceptora, lo que indica un solapamiento funcional con la enzima ADP-ribosil liasa, cuya función es la de liberar una forma deshidratada (5'-ADP-3''-deoxipenta-2''-enofuranosa) de la ADP-ribosa unida a la proteína aceptora (Diefenbach and Burkle 2005).

La presencia de PARG ha sido descrita en todos aquellos eucariotas en los cuales se reportó una actividad de PARP, resaltando su importancia en el establecimiento de un balance entre la síntesis y degradación de los polímeros de ADP-ribosa.

PARG está codificada por un único gen en células humanas (hPARG), que da lugar a múltiples isoformas localizadas en diferentes compartimentos subcelulares (Illuzzi, Fouquerel et al. 2014). Las diferentes variantes se generan por *splicing alternativo* a partir de dicho gen, el cual se compone de 18 exones. Las isoformas predominantes son la proteína PARG nuclear (110 kDa), muy activa, y la isoforma

mitocondrial corta (65 kDa). Otras variantes carecen del exón 1 (102 kDa) o de los exones 1 y 2 (99 kDa); y su papel en el citoplasma todavía no se comprende completamente (Schreiber, Dantzer et al. 2006). Estas isoformas, sin embargo, pueden relocalizar en condiciones de estrés; siendo la mitocondrial la única que no migra hacia el núcleo (Burkle and Virag 2013).

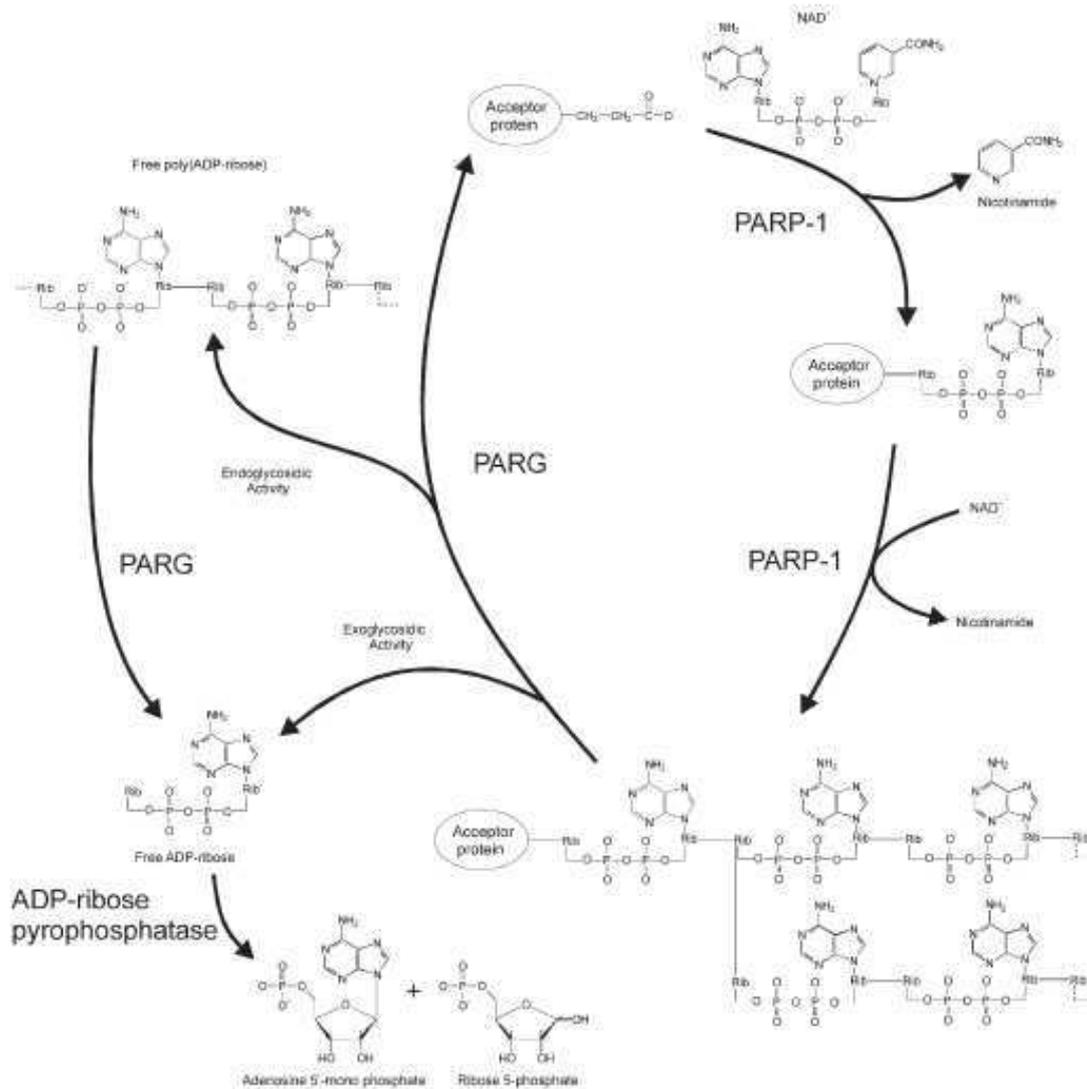


Figura i26. Metabolismo de poli (ADP-ribosa). hPARP-1 escinde el enlace glicosídico de NAD⁺ entre la nicotinamida y la ribosa, formando un enlace éster entre los residuos de glutamato de las proteínas aceptoras y la ADP-ribosa. hPARP-1 también cataliza la reacción de elongación y ramificación, dando lugar a cadenas de polímeros de hasta 200 unidades de longitud y varios puntos de ramificación. PARG es la principal proteína que cataliza la hidrólisis de los polímeros de (ADP-ribosa) y presenta actividad endo- y exo-glicosídica. Incluso es capaz de eliminar el primer grupo ADP-ribosilo unido a la proteína aceptora (Diefenbach and Burkle 2005).

El análisis *in silico* de la secuencia completa de hPARG indica la existencia de una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo amino-terminal; río abajo de la misma también se encuentra una señal putativa de exportación nuclear (Diefenbach and Burkle 2005). Cerca de la zona media del gen se puede identificar una segunda señal de direccionamiento, en este caso correspondiente a la mitocondria (MTS). El dominio principal para la actividad se conoce como “dominio PARG”. Característica de este dominio es la existencia de un motivo secuencial GGG-X6-8-QEE, ubicado en un lazo estructural (Hassler, Jankevicius et al. 2011). Adicionalmente a esta secuencia rica en glicina, en los diferentes ortólogos de PARG se encuentra conservada la triada catalítica D-E-E. Estudios de mutagénesis dirigida y generación de proteínas truncadas han demostrado que tanto este dominio como el MTS son fundamentales para la actividad de PARG (Botta and Jacobson 2010) (Patel, Koh et al. 2005). En la secuencia de hPARG también es posible identificar dos sitios de clivaje por acción de la caspasa-3, proteasa estrechamente vinculada con la vía de muerte apoptótica (Gagne, Moreel et al. 2009) (Affar, Germain et al. 2001).

La existencia de modificaciones post-traduccionales sobre PARG, relacionadas con la regulación de su actividad, se encuentra aún sub-explorada. Análisis *in silico* permitieron identificar sitios putativos de fosforilación, los cuales se agrupan en la región N-terminal de la proteína (Gagne, Moreel et al. 2009).

En embriones de ratones, la interrupción de todas las isoformas de PARG es letal. En contraste, en los modelos basados en células la eliminación de todas las isoformas no afecta necesariamente la viabilidad celular en condiciones no estresantes. Sin embargo, ante lesiones genotóxicas, las células deficientes en PARG revelaron un aumento de la muerte celular y una alteración en las vías de reparación ante rupturas en el ADN simple y doble cadena, así como también de bases oxidadas. Este fenómeno destaca la participación clave de PARG en la respuesta al daño genómico.

Tanto células murinas *Parg*^{-/-} hipomórficas (generadas por la disrupción del exón 1) como la línea celular de cáncer pancreático humano, deficiente en PARG, mostraron un incremento del arresto en la fase S y de la formación de DSB, asociada a la acumulación de PAR luego del tratamiento con un agente alquilante. Esto sugiere un estrés replicativo realizado en estas células.

ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA PROTEÍNA TbPARG EN *Trypanosoma brucei*

Recurriendo a un procedimiento similar al utilizado para identificar a las PARPs kinetoplastídicas, nuestro grupo de trabajo también investigó la existencia de ortólogos de PARG en estos microorganismos. Basándose en la secuencia de la proteína PARG humana (hPARG), se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos de *T. cruzi* que permitió identificar un ORF codificante para una PARG putativa (TcPARG); esta secuencia fue anotada en GenBank con el número de acceso DQ679799. De la misma manera se detectó una secuencia putativa en la base de datos genómica de *T. brucei* (Tb09.211.3760) (TbPARG), la cual también fue anotada en GenBank con el número de acceso Q38DD3. Previsiblemente, y en concordancia con la ausencia de un gen codificante para PARG, no se encontraron coincidencias posibles en la base de datos de *L. major*.

Tabla i5. Porcentaje de identidad/similitud de los dominios catalíticos de TcPARG y TbPARG. Se alinearon las secuencias aminoacídicas de los dominios catalíticos de PARG de *T. cruzi* y *T. brucei* con la región catalítica de PARGs de diferentes organismos. Los alineamientos óptimos fueron generados utilizando el programa EMBOSS.

	<i>T. cruzi</i> _PARG	<i>T. brucei</i> _PARG
<i>T. cruzi</i> _PARG	-----	51.5/65.1
<i>T. brucei</i> _PARG	51.5/65.1	-----
<i>A. thaliana</i> _1_PARG	26.8/39.1	26.4/38.0
<i>A. thaliana</i> _2_PARG	27.9/39.5	27.5/38.8
<i>C. elegans</i> _1_PARG	24.4/38.6	25.7/41.3
<i>C. elegans</i> _2_PARG	28.2/40.3	26.4/39.8
<i>B. taurus</i> _PARG	32.6/47.7	33.9/47.3
<i>H. sapiens</i> _PARG	32.9/48.8	34.2/47.8
<i>D. melanogaster</i> _PARG	33.9/46.0	33.7/46.6
<i>R. norvegicus</i> _PARG	32.9/48.8	33.7/47.3
<i>M. musculus</i> _PARG	32.9/48.8	33.9/47.6
<i>G. gallus</i> _PARG	32.3/46.5	35.0/47.9
<i>C. quinquefasciatus</i> _PARG	34.3/46.9	34.5/46.2
<i>D. discoideum</i> _PARG	33.6/49.4	30.9/46.2
<i>A. aegypti</i> _PARG	34.0/44.2	34.3/46.9
<i>D. rerio</i> _PARG	29.4/47.2	30.1/46.1
<i>P. abelii</i> _PARG	32.9/48.8	34.2/47.8
<i>X. laevis</i> _PARG	32.0/45.2	35.0/47.7
<i>T. thermophila</i> _PARG	28.7/45.9	26.4/43.6
<i>P. troglodytes</i> _PARG	32.7/48.5	33.2/46.2

A partir de las secuencias identificadas, el análisis *in silico* determinó que TcPARG y TbPARG correspondían a dos proteínas de 540 aa y 531 aa, respectivamente. De acuerdo a las predicciones, esta última presentaría un tamaño de 60,12 kDa con un *PI* 6,54 (ProtParam). El alineamiento global de las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas (que cubre la totalidad del polipéptido) mostró que las mismas presentan un 46,5% de identidad y un 60% de similitud entre sí. Por otro lado, el alineamiento de la secuencia correspondiente al dominio catalítico, conocido



Figura i27. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del “dominio PARG” de diferentes organismos. El alineamiento múltiple fue generado con el programa ClustalW2 y editado con la aplicación BOXSHADE. Los colores tienen el siguiente código: blanco: residuos diferentes; negro: residuos idénticos; gris: residuos conservados o similares. Asterisco: residuos ácidos esenciales D-E-E; subrayado: residuos claves G y dos E consecutivos; diamante negro: residuo importante Y.

como el “dominio PARG”, exhibió una mayor conservación aún, presentando una identidad del 51,5% entre ambas enzimas; mientras que éstas solo comparten alrededor de un 30% de identidad con otros organismos (Tabla i5). Además, los tres residuos ácidos esenciales (D-E-E) del motivo catalítico están presentes en TbPARG y TcPARG (Fig. i27, asteriscos). Ha sido reportado que dichos residuos consecutivos de glutamato, junto al de glicina, son claves (Fig. i27, subrayados) (Slade, Dunstan et al. 2011). Asimismo, en las enzimas de los parásitos también está presente un residuo de tirosina, implicado en la unión de PARG al inhibidor ADP-HPD (Fig. i27, diamante).

Por último, las búsquedas por homología que se llevaron a cabo con las regiones río arriba y río abajo del dominio catalítico de TcPARG no reportaron ninguna identidad con algún dominio conocido ni con las PARGs de los organismos anteriormente mencionados.

ANTECEDENTES DE TcPARG EN *Trypanosoma cruzi*

Trabajos previos de nuestro laboratorio también se enfocaron en el estudio de la proteína PARG de *T. cruzi*. Esta enzima está codificada por un único gen, el cual da lugar a un solo transcrito de ARNm. Se demostró que TcPARG se expresa en todos

los estadios del ciclo de vida de parásito, aunque su abundancia relativa varía; reportándose una mayor expresión en epimastigotes, una expresión media en amastigotes y una expresión reducida en tripomastigotes. A su vez, su expresión también fue evidenciada en todas las fases del ciclo celular en cultivos de epimastigotes sincronizados, sufriendo un incremento a las 8 horas del desarresto, la cual se corresponde con la fase S (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013).

También se pudo comprobar que TcPARG se localiza en el núcleo de epimastigotes, independientemente de la presencia o ausencia de lesiones en el ADN. Lo mismo fue observado en amastigotes. Una reducida señal asociada al kinetoplasto se evidenció, además, por microscopía electrónica de transmisión en el estadio infectivo del insecto (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013).

La sobre-expresión de TcPARG en cultivos de epimastigotes transgénicos provocó un aumento del 40% en el número de parásitos, en condiciones no estresantes (Vilchez Larrea, Alonso et al. 2011). La inhibición de la actividad de TcPARG con ADP-HPD y DEA, por el contrario, disminuyó el crecimiento en un 35,7% y 37,5% al cuarto día de la curva de crecimiento, respectivamente. Ambos compuestos produjeron un aumento de la acumulación del polímero tanto en condiciones normales como tras el tratamiento con H_2O_2 , seguramente debido a una reducción del catabolismo de PAR. ADP-HPD es un análogo del producto ADP-ribosa y, a pesar de la falta de permeabilidad de la célula frente a este compuesto, es uno de los inhibidores más potentes de PARG y por consiguiente más extensamente utilizado. La presencia del inhibidor ADP-HPD durante la progresión del ciclo celular presentó diferencias en el porcentaje de epimastigotes en las fases S y G_2/M a las 8, 10 y 12 horas de desarrestados los cultivos sincronizados con HU. Mientras que los cultivos controles mostraron un incremento constante del número de parásitos en este periodo, en los cultivos de epimastigotes cuya TcPARG estaba inhibida éste se mantuvo constante; indicando que la carencia de una TcPARG funcional arresta a los parásitos en la fase S y G_2/M del ciclo celular (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013).

Nuestro grupo también demostró que la PARG de la célula huésped es crucial en la infección del parásito, ya que células carentes de la enzima funcional presentaron una significativa disminución en el número de células infectadas y en la cantidad de amastigotes intracelulares. Adicionalmente a la PARG de la célula hospedadora, TcPARG también participaría en la replicación intracelular de amastigotes o en el proceso de diferenciación de amastigotes a tripomastigotes; ya que el número de tripomastigotes en el sobrenadante de células infectadas durante nueve días en presencia de DEA fue notoriamente más reducido que el de los cultivos controles (sin

DEA en el medio); tanto en células VERO como en células A549, cuya PARG se encontraba silenciada (shPARG) (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013).

EL METABOLISMO DE PAR

SUPERVIVENCIA VERSUS MUERTE CELULAR

Muchas son las funciones celulares en las que se encuentra involucrado el metabolismo de los polímeros de ADP-ribosa, tales como la reparación del ADN y el mantenimiento de la integridad genómica, la regulación de la transcripción, la regulación de la función centromérica, la modulación de la longitud telomérica, la regulación de la degradación proteica, la regulación del tráfico de vesículas endosómicas, la regulación de la función del centrosoma, e implicaciones en la muerte celular por apoptosis y necrosis. Sin embargo, solo se describirán aquellas funciones relacionadas con el tema de la presente tesis; es decir, el papel que juega el metabolismo de PAR en los mecanismos de señalización y reparación del ADN, y en el tipo de muerte celular.

El rol específico de hPARP-1 en decidir el destino celular (supervivencia o muerte) depende del tipo, duración e intensidad del estrés; así como también del estado metabólico y proliferativo de la célula (Fig. i28) (Luo and Kraus 2012).

La activación de hPARP-1 por un estrés leve o moderado favorece la supervivencia celular y conduce a respuestas de transcripción y reparación del ADN que ayudan a mantener la integridad genómica. Por el contrario, una lesión moderada,

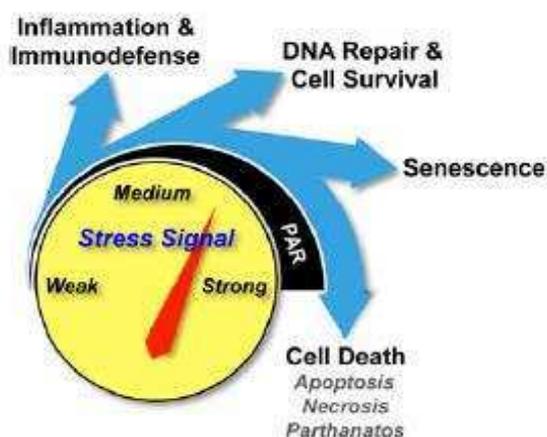


Figura i28. hPARP-1 conduce a diferentes respuestas celulares de acuerdo a distintos tipos y niveles de estrés (Luo and Kraus 2012).

severa o sustancial causa la hiperactivación de hPARP-1; y la graduación de la respuesta se correlaciona con la magnitud de la activación de esta proteína. Esto incluye senescencia (respuesta moderada) o distintos programas de muerte celular (respuesta severa) tales como apoptosis, necrosis o PARthanatos. Ha sido demostrado que hPARP-1 está involucrada en estos tres últimos casos (Luo and Kraus 2012).

La señalización de hPARP-1 conduce a una variedad de efectos moleculares río abajo que delinear distintas respuestas biológicas. Ellas incluyen: 1) modulación de la estructura de la cromatina, transcripción y reparación del ADN; 2) alteración de los perfiles metabólicos celulares a través del consumo de NAD⁺ y la producción de PAR y nicotinamida; y 3) alteración del “PARiloma” celular, ya sea a través de la modificación covalente de proteínas diana o a través del cambio en los niveles de PAR libre (Luo and Kraus 2012). Una observación importante fue la unión no covalente de algunas proteínas a las cadenas de ADP-ribosa, demostrando el papel de PAR como una molécula de señalización intracelular importante (Burkle and Virag 2013). Hasta el momento han sido identificados cuatro dominios de unión a PAR: el motivo de unión a PAR (PBM), el motivo dedos de Zinc de unión a PAR (PBZ), el macrodominio de histonas y el dominio WWE, recientemente descubierto (Robert, Karicheva et al. 2013).

Inicialmente se pensó que hPARP-1 solo era activada por daños en el ADN. Es decir, por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) que causan lesiones en las hebras de ADN de forma directa; y por agentes alquilantes como MNNG y MNU que metilan a las bases del ADN. Llamativamente, las rupturas en el ADN generadas por la topoisomerasa II β también son activadores de hPARP-1 y manifiestan el rol de la parilación en la regulación de la transcripción. Por otro lado, existe evidencia de una vía “alternativa” de mecanismos de activación en ausencia de lesiones en el genoma, la cual está implicada en la regulación transcripcional y en la muerte celular. La misma comprende estructuras de ADN distintas a la B, mecanismos de señalización a través de una cascada de kinasas o la interacción directa proteína-proteína (por ejemplo con la Erk fosforilada). Como se describió anteriormente, las modificaciones post-traduccionales también pueden activar a hPARP-1 o modular su interacción con otras proteínas (por ejemplo hPARP-1 debe estar acetilada para coactivar al factor de transcripción NF- κ B, pero su actividad no es necesaria).

Aunque el calcio y el magnesio podrían impactar directamente sobre la actividad de PARP, el efecto del calcio también involucra eventos de señalización río abajo, a través de las kinasas dependientes de calmodulina. En efecto CamKII δ activa a

hPARP-1 por fosforilación. En un modelo de citotoxicidad inducido por estrés oxidativo se demostró que la señal de calcio era requerida para la activación de hPARP-1. Adicionalmente, esta proteína actuaría río arriba de la elevación sustancial y tardía de la señal de calcio citosólico, indicando que hPARP-1 regularía además la redistribución de calcio que le sigue a un estrés oxidativo intenso. TRPM2 sería el paso que regula hPARP-1 y PARG en el flujo de calcio desde el compartimento extracelular hacia el citoplasma (Burkle and Virag 2013).

MECANISMOS DE REPARACIÓN

Hasta la fecha, solo las proteínas hPARP-1, hPARP-2 y hPARP-3 han sido relacionadas con la respuesta al daño genotóxico (Robert, Karicheva et al. 2013). Se sabe que hPARP-1 y hPARP-2 son activadas por rupturas en el ADN provocadas por ROS y RNS, o introducidas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) en el sitio de alquilación (Burkle and Virag 2013). También se ha observado que hPARP-1 cumple un rol en la reparación por escisión de nucleótidos (NER), ya que los procesos NER se redujeron con la inhibición de esta proteína (Morales, Li et al. 2014).

Frente a lesiones en el ADN, PAR actúa como una plataforma de acoplamiento para el ensamblaje de una lista creciente de factores de reparación. El reclutamiento de hPARP-1 está regulado por retroalimentación y en un primer momento se lleva a cabo a través de su dominio de unión al ADN. Esto es seguido por una segunda etapa de reclutamiento mediante el cual su dominio BRCT reconoce al polímero de PAR producido localmente. Ambas olas de reclutamiento conducen a la acumulación de moléculas de hPARP-1 y, consecuentemente, a la carga de la plataforma XRCC1. La PARilación adicional de hPARP-1 provoca su liberación, permitiendo más tarde el reclutamiento de la hPARP-2 en ese sitio. hPARP-2 permanece aquí durante más tiempo, probablemente debido a su participación en fases más tardías del proceso de reparación. También fue observado un eficiente reclutamiento en el sitio de daño del ADN de todas las isoformas de PARG, excepto la que tiene localización mitocondrial (Robert, Karicheva et al. 2013).

Resultados más recientes apoyan un modelo alternativo en el que hPARP-1 protegería al ADN con rupturas en una sola hebra hasta que éste pueda ser reparado por la maquinaria de reparación por escisión de bases; evitando que se conviertan en rupturas de doble hebra, mucho más deletéreas. Mas importante aún, el polímero sintetizado por la proteína hPARP-1 en la reacción de auto-modificación serviría también como ligando para reclutar factores de unión a PAR, como variantes de histonas y enzimas de remodelación de la cromatina (Langelier, Ruhl et al. 2010).

Las propiedades de las cadenas de PAR para atraer y construir redes multiproteicas en el sitio de daño del ADN revelan la importancia crítica de esta modificación post-traducciona en la orquestación temprana de diferentes eventos celulares en respuesta a lesiones en el ADN (Fig. i29) (Robert, Karicheva et al. 2013). Los polímeros de PAR libres o unidos covalentemente a otras proteínas funcionan como transductores de señales, siendo éstos reconocidos por proteínas que portan módulos de reconocimiento de PAR conservados (Luo and Kraus 2012) (Virag, Robaszekiewicz et al. 2013). La PARilación también puede controlar el desensamblaje proteico mediante la modificación a gran escala de proteínas aceptoras (Robert, Karicheva et al. 2013).

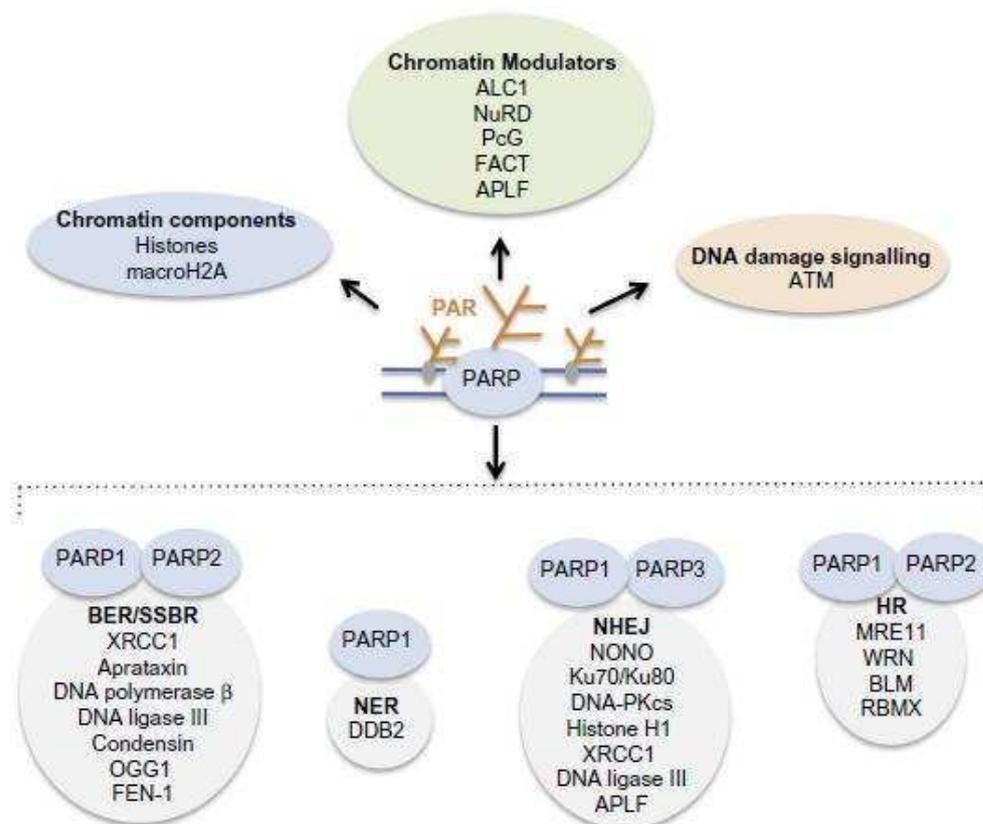


Figura i29. Perfil de las funciones principales de PARilación en el núcleo en respuesta a lesiones en el ADN. En respuesta a lesiones en el ADN hPARP-1, hPARP-2 o hPARP-3 actúan como sensores y transductores; catalizando la parilación localizada de proteínas efectoras (Robert, Karicheva et al. 2013).

Para una reparación eficiente PAR debe modelar la cromatina. Un ejemplo de esto es la enzima ALC1 (también conocida como CHD1L), que es reclutada mediante su macro-dominio de reconocimiento de PAR, cuya actividad reposiciona al nucleosoma. En un principio se creía que el polímero solo estaba involucrado en la relajación del ADN, ya que hPARP-1 modifica covalentemente la lisina de la cola N-terminal de las histonas que conforman el núcleo de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), relajando la zona de daño para facilitar el acceso de la maquinaria de reparación. Sin embargo, descubrimientos recientes evidenciaron el rol de hPARP-1 en el estímulo de la condensación de la cromatina. Esto se correlaciona con su función en el reclutamiento de complejos represores de la transcripción. Estos hallazgos indican que el metabolismo de PAR cumple con funciones antagonistas que están reguladas temporalmente (Robert, Karicheva et al. 2013).

Las vías de reparación por escisión de bases (BER) y de reparación de daño de simple cadena (SSBR) involucran a glicosilasas específicas de ADN y endonucleasas AP (apurínicas/apiridimínicas) que procesan el daño en rupturas simple cadena, el cual es reparado mediante un camino corto que involucra a la ADN polimerasa β , XRCC1, y ADN ligasa III; o por un camino largo que incluye a la ADN polimerasa $\delta\epsilon$, la endonucleasa-1 (FEN-1), el factor de replicación PCNA y la ADN ligasa I. hPARP-1 interactúa físicamente y funcionalmente con muchos actores del proceso BER/SSBR corriente abajo del reconocimiento del daño promoviendo su reclutamiento al sitio de la lesión (XRCC1, Aprataxina) y/o modulando su actividad (ADN polimerasa β , FEN-1, OGG1, condensina, ADN ligasa III). Aún está debatido si hPARP-1 tiene funciones precisas en las vías de reparación BER/SSBR *per se* en adición al rol que cumple en la detección de SSB y en el reclutamiento dependiente de PAR de la proteína de andamiaje XRCC1 (Robert, Karicheva et al. 2013).

Respecto a la reparación de las lesiones en la doble hebra del ADN, mucho más detrimentales que las anteriores, la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) es la que prevalece en eucariotas superiores y, si bien funciona a lo largo de todo el ciclo celular, a veces es propensa a generar errores en la etapa de religación. La vía de reparación por recombinación homóloga (HR), en cambio, está restringida a las fases S-G₂ del ciclo celular y utiliza a la cromátida hermana como templado para la reparación. Se cree que hPARP-1 intervendría en el reclutamiento inicial del complejo MRN/ATM, facilitando de este modo la fosforilación de los sustratos de ATM incluyendo a γ H2AX para estabilizar el ensamblaje de los factores de reparación en los sitios de ADN dañado (Robert, Karicheva et al. 2013).

Luego de la formación de DSB, el heterodímero Ku70/Ku80 es cargado en los extremos de ADN dañados, facilitando el reclutamiento y la actividad kinasa de la subunidad catalítica ADN-PK. Además, Ku70/Ku80 también sirve como factor de alineamiento que estimula la actividad de unión de los extremos de ADN yuxtapuestos por el complejo de la ligasa IV XRCC4/ADN. Estas proteínas son los componentes principales de la vía clásica de NHEJ (C-NHEJ). Muchos estudios independientes avalan el rol de hPARP-1 en este proceso mediante la interacción física y funcional con ADN-PK o sus componentes Ku70/Ku80. También hay evidencia que hPARP-3 sensa, señala y responde a DSBs. Aunque aún requiere tener más validación experimental, la hipótesis actual propone que la actividad de esta proteína sirve para ensamblar rápidamente las chaperonas de las histonas y al modificador de la cromatina APLF, el cual facilitaría las reacciones de reparación del ADN respaldando la reposición y/o el intercambio de las variantes de histonas (Robert, Karicheva et al. 2013).

En los últimos años emergió un mecanismo alternativo mecanísticamente diferente a la vía C-NHEJ (A-NHEJ). El mismo funciona de manera independiente a Ku y XRCC4. Además, al igual que en la HR, requiere de un paso inicial de remoción de ADNss que involucra a MRE11. Aunque la función exacta de hPARP-1 necesita ser esclarecida aún, un modelo actual indica que esta enzima competiría con Ku por la unión al ADN. Debido a su gran afinidad de unión a los extremos de ADN, Ku inhibiría la activación de hPARP-1 y favorecería la vía C-NHEJ. Si este proceso fallara el complejo de ADN ligasa III/XRCC1 sería el encargado de la unión de los extremos, en coordinación con la hPARP-1 y facilitado por la histona H1. Otra función probable de hPARP-1 sería la de decidir entre las vías C-NHEJ o A-NHEJ y HR en respuesta a diferentes estímulos. Por medio del reclutamiento dependiente de PAR de la nucleasa MRE11, hPARP-1 podría modular la primera actividad de escisión, clave en la decisión de reparación (Robert, Karicheva et al. 2013).

Está bien documentado que la recombinación homóloga (HR), además del papel que cumple en la reparación de DSB, también funciona estabilizando y reiniciando las horquillas de replicación (Robert, Karicheva et al. 2013). Las vías de respuesta frente al daño genotóxico también se activan por el estrés ocasionado durante el proceso de replicación del ADN. Esto lleva a un estancamiento en las horquillas de replicación, con la concomitante activación del punto de control de la fase S. Si el estancamiento es de carácter transitorio, la horquilla de replicación estancada es estabilizada, y la replicación se reanuda una vez que la señal inhibitoria desaparece. Si el estancamiento persiste, en cambio, puede conducir a un colapso en la horquilla de

replicación, lo que implica la disociación de la maquinaria de replicación y la generación de un daño de doble cadena en el ADN (DSB). En este caso, la replicación se restablece mediante la apertura de nuevos orígenes y la reparación del DSB se lleva a cabo mediante recombinación homóloga (HR), utilizando como templatado secuencias de ADN homólogas con el fin de re-sintetizar la zona nucleotídica que contiene la ruptura (Illuzzi, Fouquerel et al. 2014).

Durante este proceso, la horquilla de replicación detenida primero se re-hibrida por medio de la actividad de diferentes helicasas dependientes de ATP, dejando un extremo rezagado 3' que sobresale. El mismo es generado por la actividad de la nucleasa MRE11, un componente clave del complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) requerido para la carga de la recombinasa RAD51. Si bien hPARP-1 no es esencial para la HR *per se*, hay evidencia que apoya que esta proteína jugaría un rol central en el reinicio de las horquillas de replicación detenidas. La función de hPARP-1 parecería ser antagonista de acuerdo a si la detención de la replicación es transiente o sostenida en el tiempo. En respuesta a una suspensión severa asociada con la formación de DSB y colapso de las horquillas de replicación, hPARP-1 promueve el reclutamiento y la regulación de MRE11 y RAD51 (Robert, Karicheva et al. 2013). Por el contrario, cuando el estancamiento es temporal, la actividad de PARP no es requerida para relocalizar la MRE11 en las horquillas de replicación; en cambio, junto a BRCA2 protege a las horquillas de una amplia disección dependiente de MRE11 (Illuzzi, Fouquerel et al. 2014).

Un trabajo publicado recientemente en células HeLa reveló que PARG es dispensable para la recuperación de células que sufren un estrés replicativo transitorio, pero imprescindible en aquellas células que están expuestas a un estrés replicativo prolongado. La producción masiva del polímero y la acumulación de PAR impide el reclutamiento de la proteína RPA en los focos de replicación de la cromatina. La proteína RPA forma un trímero que recubre los extremos 5' de ADNsc que quedan desprotegidos tras el proceso de escisión durante la recombinación homóloga (HR). Las tres proteínas RPA son susceptibles de ser modificadas covalentemente por PAR, siendo RPA1 el blanco principal de parilación. Además, RPA1 puede unirse a PAR de forma no covalente. Mientras que la presencia de bajas cantidades de PAR favorecen la unión de RPA al ADN libre, altas concentraciones tienen el efecto opuesto, lo que aumenta la presencia de ADN simple cadena (ADNsc). Además, las células deficientes en PARG no presentaban la RPA2 hiperfosforilada en los puntos donde ha transcurrido la escisión eficientemente. Por otro lado, los autores demostraron que PARG no es esencial para la HR, aunque sí la facilita. Nuevamente, una desregulación

en las cantidades del polímero altera el reclutamiento de MRE11 a los focos de daño (Illuzzi, Fouquerel et al. 2014).

Por último, la reparación por escisión de nucleótidos (NER) reconoce y remueve una variedad de lesiones por distorsión de la hélice, como los dímeros de pirimidina inducidos por la luz UV. Por esta razón, NER es reconocido como la mayor defensa celular frente al efecto cancerígeno del sol. Este sistema consiste de dos vías: una de reparación global del genoma (GGR) y otra de reparación acoplada a la transcripción (TCR). Ambos caminos difieren en los factores de reconocimiento del ADN dañado. El paso de detección en la vía GGR está mediado por el complejo XPC-Rad 23 junto con el heterodímero UV-DDB que consiste en las subunidades DDB1 y DDB2; mientras que en la vía TCR se cree que la detección es iniciada por la ARN polimerasa II detenida en la lesión. Un estudio mostró que DDB2 media el desenrollamiento de la cromatina en los sitios dañados por UV de una forma dependiente de ATP y PAR, facilitando el reconocimiento de la lesión por parte de XPC. Además, hPARP-1 fue identificada como un nuevo compañero de DDB2 y la parilación de éste promueve dos eventos: i) impide la ubiquitinación de DDB2 inducida por UV en la misma región N-terminal (parilación vs ubiquitilación), incrementando su estabilidad y tiempo de retención en la lesión, y ii) recluta al remodelador de la cromatina ALC1 donde están las lesiones por UV, el cual induce la apertura continua de la cromatina mediante el deslizamiento por los nucleosomas, facilitando el ensamblaje del complejo de precisión que contiene a XPC. Adicionalmente, la formación de mellas de ADNss a través del proceso NER desencadena una segunda oleada de síntesis de PAR y el reclutamiento de ALC1, pero a través de un mecanismo independiente de DDB2 (Robert, Karicheva et al. 2013).

MUERTE CELULAR

El Comité de la Nomenclatura de muerte celular reconoce 11 subrutas de muerte diferentes. Cinco de ellas están bien caracterizadas (apoptosis extrínseca, apoptosis intrínseca, necrosis regulada o necroptosis, muerte autofágica y catástrofe mitótica), pero para las 6 restantes solo han sido sugeridas definiciones tentativas (anoikis, entosis, PARthanatos, piroptosis, netosis, y cornificación). Algunas de estas rutas pueden ser, a su vez, subdivididas aún más (por ejemplo, por la dependencia de caspasas: apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas). Además, diferentes vías pueden producirse en paralelo ya que no son mutuamente excluyentes. (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

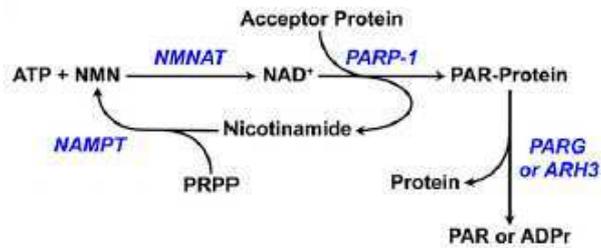


Figura i30. Ciclo metabólico de NAD⁺ dependiente de hPARP-1 (Luo and Kraus 2012).

Necrosis regulada o necroptosis: la hiperactivación de hPARP-1, inducida por un daño extenso en el ADN, puede consumir al NAD⁺ celular, que es sustrato de esta enzima (Fig. i30). El consumo de ATP como consecuencia de la re-síntesis de NAD⁺ (se requieren 4 ATPs para la síntesis de 1 molécula de NAD⁺) puede llevar a la catástrofe metabólica (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013). Esta crisis energética conduce a la muerte celular mediante un proceso necrótico a juzgar por la morfología celular y la permeabilización de la membrana plasmática. Se ha observado que inhibidores de PARP o fenotipos knock-out de hPARP-1 suprimieron la necrosis e incrementaron la apoptosis, sugiriendo que esta proteína actuaría como un interruptor molecular entre ambos tipos de muerte celular (Burkle and Virag 2013).

La necroptosis es considerada una forma de muerte potencialmente peligrosa debido a que está acompañada de la liberación del contenido celular, causando un proceso inflamatorio. Una de las moléculas que se libera en la necrosis es la proteína nuclear HMGB1, la cual estimula a su vez la liberación de citoquinas inflamatorias y otros mediadores. La señal de PAR regula la liberación de HMGB1 desde el núcleo mediante la PARilación de su cola C-terminal, desestabilizando su asociación con la cromatina. Además, la HMGB1 PARilada inhibe la esferocitosis mediante su unión a la fosfatidilserina. De esta manera, la PARilación promueve la inflamación en condiciones asociadas a la muerte celular por tres vías: i) desplazando la apoptosis por la necrosis con la liberación de componentes citosólicos, ii) mejorando el transporte desde el núcleo hacia el citoplasma de la molécula inflamatoria HMGB1 e iii) inhibiendo el *clearance* de las células muertas mediado por interacciones entre receptores de *clearance* y el PAR asociado a HMGB1 (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

PARthanatos: La hiper-activación de hPARP-1 también puede conducir a otra vía específica de muerte celular programada que se caracteriza por el agotamiento de NAD^+ / ATP, el desequilibrio del calcio, la activación de mu-calpaína, la pérdida del potencial en la membrana mitocondrial, la rápida disfunción mitocondrial y la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) (Morales, Li et al. 2014). Este mecanismo surge como alternativa a la catástrofe energética celular inducida por la PARilación. Se cree que en esta subruta PAR abandona el núcleo y desencadena la liberación del AIF desde la mitocondria. Luego, éste transloca hacia el núcleo donde estimula la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en grandes segmentos, mediando la muerte celular por un mecanismo independiente de caspasas (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013) (Fig. i31).

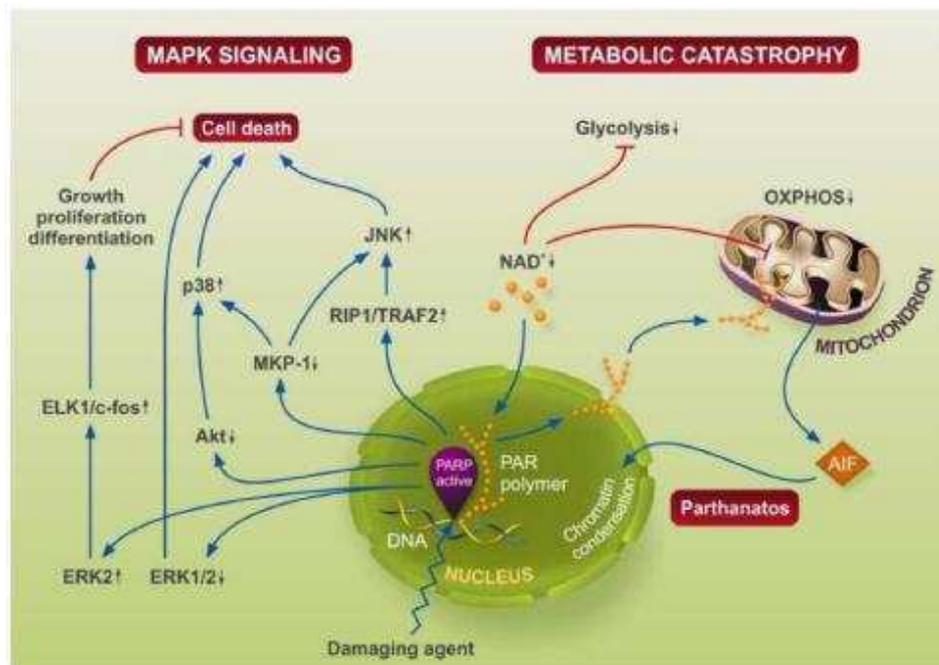


Figura i31. Mecanismos de muerte celular mediados por hPARP-1. La activación de hPARP-1 podría causar la muerte por necroptosis mediante tres vías principales interconectadas. La eliminación de NAD^+ podría impedir el correcto metabolismo celular (glucólisis y fosforilación oxidativa); culminando en la crisis energética (eliminación de ATP). Esto también podría conducir al otro camino de la necrosis regulada denominada PARthanato. hPARP-1 también mediaría el camino de necroptosis clásico mediante la señalización de RIP-1/TRAF2 que conduce a la activación de la MAP quinasa JNK, inductor de la muerte celular. La activación de JNK y p38 también es exacerbada por hPARP-1, la cual disminuye la expresión de MPK-1 y la inhibición de la quinasa de supervivencia Akt (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

En contraste con su nombre, cada vez es más aceptado que AIF es un mediador de necrosis y no de apoptosis (Burkle and Virag 2013). Las células sometidas a PARthanatos y las que manifiestan un mecanismo de apoptosis comparten características comunes como la externalización de fosfatidilserina, la disipación del potencial de membrana mitocondrial, la condensación de la cromatina y el encogimiento. Sin embargo, en contraste con el proceso de muerte apoptótica, PARthanatos está acompañada por una pérdida de la integridad de la membrana celular (pero sin hinchamiento de la célula), fragmentación del ADN a gran escala (~50 kb) y falta de dependencia energética o de activación de caspasas. Estas características están en línea con la categorización actual de PARthanatos como un proceso de necroptosis (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

En condiciones fisiológicas, la proteína AIF se localiza en la mitocondria, donde cumple una función como NADH oxidasa en la fosforilación oxidativa. Estudios recientes demostraron que se trata de una proteína transmembrana de 62 kDa anclada a la membrana mitocondrial interna por una corta región hidrofóbica. La misma es procesada en una forma soluble de 57 kDa por calpaínas previo a su liberación al citoplasma. Sin embargo, aproximadamente el 30% del AIF mitocondrial total está asociado de manera laxa a la membrana mitocondrial externa de cara al citosol y no requiere de clivaje para su liberación. Ha sido sugerido que este pool de AIF sería suficiente para el inicio de PARthanatos (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013). Se piensa que esta vía, en contraposición con lo que se creía previamente, no sería dependiente de la activación por calpaína (Morales, Li et al. 2014).

También hay evidencia de que PAR podría actuar directamente sobre las mitocondrias, independientemente del agotamiento de NAD⁺ (Morales, Li et al. 2014). La concentración, tamaño y complejidad del polímero afecta la liberación de AIF; aumentando su potencia como inductor mientras más grande y complejo (con más ramificaciones) es el polímero. Información reciente identificó a AIF como una proteína con una gran afinidad de unión a PAR, presentando tres motivos putativos. La unión directa al polímero libre o unido a proteínas es necesaria para la translocación de AIF (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

La existencia de una PARP no canónica en la mitocondria (la α -ketoglutarato deshidrogenasa con actividad PARP-like) podría explicar la parilación observada en esta organela. Además, tanto la isoforma de PARG mitocondrial como la ARH3 están presentes en la mitocondria, siendo esta última responsable de la degradación del polímero asociado a la matriz. La degradación de PAR podría comprometer a las funciones mitocondriales, resultando en una falla energética (Burkle and Virag 2013).

Apoptosis: la activación de hPARP-1 ayuda a iniciar la muerte apoptótica estabilizando a la proteína supresora de tumores p53 y facilitando su función. En los pasos subsiguientes, las caspasas activadas clivan a hPARP-1 en dos fragmentos, previniendo la depleción de NAD⁺ (y, por ende, la depleción de su precursor, ATP) lo que permite eludir a la muerte celular por un proceso necrótico o por PARthanatos (Luo and Kraus 2012). Además, durante las primeras etapas de la apoptosis se puede observar una formación masiva del polímero, lo que indica que la PARP también estaría involucrada en este proceso de muerte (Diefenbach and Burkle 2005).

La decisión de la célula para comprometerse con la vía apoptótica luego de un estrés genotóxico tiene lugar río abajo de la activación de p53, pero aún no se entienden completamente qué determinantes moleculares deciden cambiar la reparación del ADN por la detención del ciclo celular o la apoptosis (Huber, Bai et al. 2004). En metazoos, la escisión específica de hPARP-1 por las caspasas-3/7 dentro de la señal de localización nuclear (²¹¹DEVD ↓ G²¹⁵) genera dos fragmentos de 24 y 89 kDa; este fenómeno ha sido ampliamente utilizado como marcador bioquímico de apoptosis (Jimenez-Ruiz, Alzate et al. 2010). Se cree que esta proteólisis impide la estimulación de la actividad catalítica de hPARP-1 frente a rupturas en el ADN (Diefenbach and Burkle 2005).

Autofagia: es un camino homeostático de auto-alimentación. Es un proceso asociado a los lisosomas, en el cual los componentes intracelulares están envueltos en vesículas de doble membrana, llamados autofagosomas, para ser degradados por hidrolasas lisosomales. La autofagia puede ser estimulada por diferentes tipos de estrés celular como hipoxia, ROS, pH, daño en el ADN, patógenos intracelulares y estrés en el RE. En todos los casos el objetivo es la adaptación de la célula al cambio del ambiente para permitir la supervivencia celular (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

La ausencia de nutrientes (inanición) o la deficiencia de oxígeno (hipoxia) pueden inducir estrés metabólico, lesiones en el ADN y activación de hPARP-1. La acción coordinada de hPARP-1 y diferentes kinasas que sensan la energía (AMPK) y el estado nutricional (mTOR) es crucial para la iniciación de esta vía. Mientras AMPK es activa en condiciones pobres de nutrientes e inactiva en condiciones ricas de nutrientes, la activación de mTOR ocurre a la inversa. mTOR requiere de señales de ambos nutrientes (glucosa, aminoácidos) y factores de crecimiento. Muchos estudios demostraron una interacción funcional entre hPARP-1 y mTOR (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

Tras la privación de nutrientes, las células se someten a la autofagia a través de un mecanismo de activación de AMPK e inhibición de mTOR, permitiendo la formación del autofagosoma. Los eventos corriente arriba de AMPK involucran la depleción de energía, la producción de ROS y el daño en el ADN. En este escenario, la hiperactivación de hPARP-1 conduce a la depleción de ATP, reactivando la autofagia por retroalimentación. Si esta señal de estrés se mantiene, eventualmente conduce a la muerte celular por autofagia. En ausencia de hPARP-1 o luego de la inactivación de PARP, los niveles de ROS disminuyen y se reduce la caída en los niveles de ATP. Como consecuencia, la retroalimentación para reactivar la autofagia se interrumpe y se dispara la apoptosis. En resumen, la inactivación de PARP demora la autofagia y favorece la apoptosis (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013) (Fig. i32).

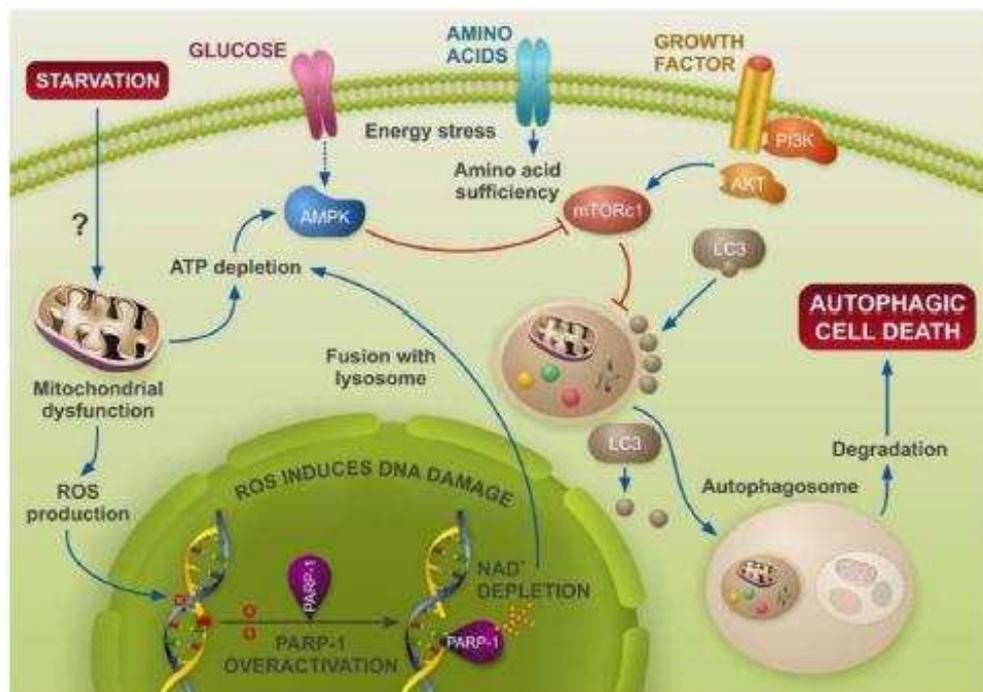


Figura i32. hPARP-1 modula la autofagia inducida por inanición (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013).

HIPÓTESIS

- Existe en *T. brucei* una ruta metabólica de síntesis y degradación de polímeros de ADP-ribosa.
- Dicha vía metabólica está involucrada en el ciclo celular y la respuesta al daño genotóxico.
- La ruta metabólica de PAR está relacionada y determina el tipo de muerte celular.

OBJETIVOS

- Caracterizar las enzimas involucradas en el metabolismo de PAR en *T. brucei*.
- Demostrar la funcionalidad y localización de las enzimas involucradas en esta vía metabólica en ambas formas del parásito.
- Demostrar la importancia de PAR en el ciclo celular del parásito mediante el uso de parásitos transgénicos con el metabolismo de PAR alterado (sobre-expresión de PARP y ARNi de PARG) y de inhibidores de PARP.
- Demostrar la respuesta de PAR frente al daño genotóxico.
- Determinar la importancia de PAR frente al daño genotóxico y demostrar su influencia en el tipo de muerte inducida mediante la utilización de parásitos con el metabolismo de PAR alterado (parásitos sobre-expresantes de PARP, parásitos ARNi de PARP y parásitos ARNi de PARG) y de inhibidores de PARP.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVOS DE BACTERIAS

CEPAS DE *Escherichia coli*

- *Eschechia coli* DH5 α F': F'/endA1 hdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ (lacZYAargF)U169 (m80lacZ Δ M15).
- *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3)endA Hte [argU ileY leuW] (Cam^R).
- *Escherichia coli* Rosetta2(DE3)pLysS: F⁻ ompT hdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam^R).

MEDIOS DE CULTIVO

- **LB y LB Agar:** Bacto-triptona 1% p/v; Extracto de levaduras 0,5% p/v; NaCl 1% p/v. Para LB-Agar, se añade 1,2% p/v de Agar-agar.
- **TB:** Bacto-triptona 1,2% p/v; Extracto de levadura 2,4% p/v; Glicerol 0,4% v/v; KH₂PO₄ 0,017 M; K₂HPO₄ 0,072 M; pH 7,5.
- **TB - Medio de Autoinducción con Elementos traza (Formedium):** Triptona 1% p/v; Extracto de levaduras 0,5% p/v; (NH₄)₂SO₄ 0,33% p/v; KH₂PO₄ 0,68% p/v; Na₂HPO₄ 0,71% p/v; Glucosa 0,05% p/v; α -Lactosa 0,2% p/v; Mg₂SO₄ 0,015% p/v; elementos traza 0,003% p/v; Glicerol 0,8% v/v.
- **SOB:** triptona 2% p/v; extracto de levadura 0,5% p/v; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM. Se autoclava y se agrega MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM.

ANTIBIÓTICOS

- **Ampicilina:** Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 100 mg/ml en H₂O. La concentración final utilizada en el cultivo fue de 100 μ g/ml.
- **Cloranfenicol:** Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 35 mg/ml en etanol absoluto. La concentración final utilizada en el cultivo fue de 140 μ g/ml.

OTRAS SOLUCIONES

- **IPTG:** Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 0,1 M en H₂O. La concentración final utilizada en el cultivo en placa fue de 0,3 mM. Para la inducción de cultivos de bacterias recombinantes se utilizaron concentraciones finales de IPTG de 0,1 mM - 0,5 mM.

- **X-Gal:** Preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 50 mg/ml en Dimetilformamida. La concentración final utilizada en el cultivo en placa fue de 25 µg/ml.
- **PBS 10X:** NaCl 8% p/v; KCl 0,2% p/v; Na₂HPO₄ 0,766% p/v; KH₂PO₄ 0,2% p/v. pH 7,3.
- **TBS 10X:** Tris-HCl 0,25 M pH 7,4; NaCl 9%.

CULTIVOS DE *Trypanosoma brucei*

CEPAS DE *Trypanosoma brucei*

- *Trypanosoma brucei* cepa 29-13 (Wirtz, Leal et al. 1999): Estadio Procíclico.
- *Trypanosoma brucei* cepa 427 90-13 (Wirtz, Leal et al. 1999): Estadio Sanguíneo.

MEDIOS DE CULTIVO

- **Medio SDM-79** (para parásitos procíclicos) (Bioscience): suplementado con FCS 10% v/v y Hemina 0,002%.
- **Medio HMI-11** (para parásitos sanguíneos): Iscore's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen) (Piruvato de sodio 100 mg/L; Hipoxantine 136,1 mg/L; Timidina 38,7 mg/L; Ácido bathocuproine sulfónico 28,22 mg/L; L-cisteína 181,8 mg/L; Carbonato de sodio 3,024 mg/L; β-mercaptoetanol 196 µM) suplementado con 10% v/v de FCS.

INHIBIDORES DE PARP

- 3-AB (Sigma): 3-Aminobenzamida. Preparación de stock 1 M en DMSO.
- Olaparib (JS Research Chemicals Trading): Preparación de stock 10 mM en DMSO.
- Veliparib (ABT-888, Alexis Biochemicals): Preparación de stock 10 mM en DMSO.
- 4-ANI (Alexis Biochemicals): Preparación de stock 10 mM en DMSO.
- EB-47 (Alexis Biochemicals): Preparación de stock 10 mM en DMSO.
- AG014699 (Selleck Biochemicals): Preparación de stock 10 mM en DMSO.

INHIBIDORES DE PARG

- ADP-HPD (Sigma): Adenosine 5'-diphosphate (Hydroxymethyl)pyrrolidinediol, NH₄. Preparación de stock 200 µM en dH₂O.

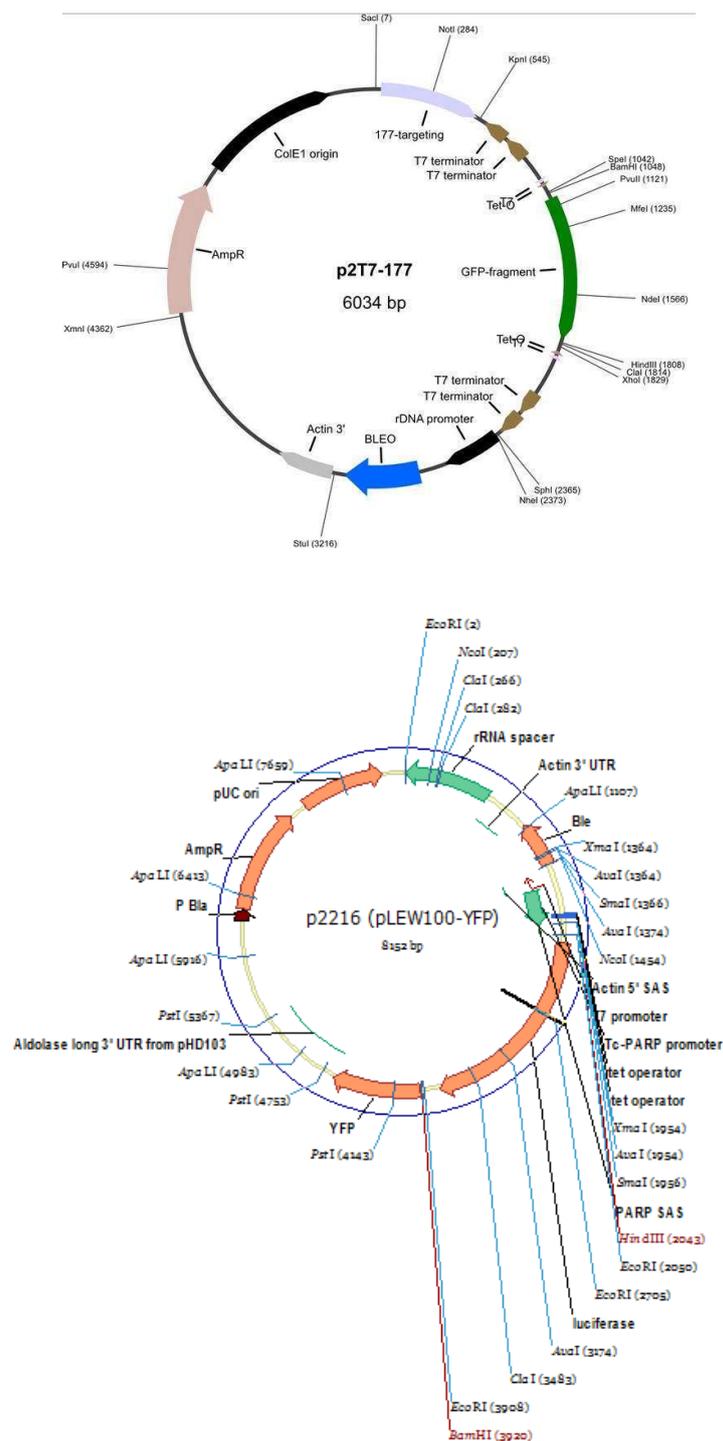
VECTORES

VECTORES PARA BACTERIAS

- **pGEM®-T Easy de Promega:** Clonado de productos de PCR.
- **pET22b(+)[®] de Novagen:** Expresión de proteínas recombinantes fusionadas a una cola de His6X C-terminal, en cultivo bacteriano (*Escherichia coli* BL21).

VECTORES PARA PARÁSITOS

- **p2T7^{TI}-177 (Wickstead et al., 2002):** Vector inducible de silenciamiento de proteínas (RNA de interferencia).
- **p2216 (Kelly et al., 2007):** Vector inducible de sobre-expresión de proteínas recombinantes fusionadas a la proteína eYFP en el extremo C-terminal.



ANÁLISIS *IN SILICO*

BASES DE DATOS

- GeneDB: <http://www.genedb.org/Homepage/> TbruceiLister427
- TriTryps: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>

PROGRAMAS

- ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- Cyflogic: <http://www.cyflogic.com/>
- GraphPad Prism5: <http://www.graphpad.com/>
- ImageJ: <http://imagej.nih.gov/ij/>
- NCBI Batch Web CD: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>
- OligoCalc: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
- ProtParam: <http://web.expasy.org/protparam/>
- TrypanoFAN: <http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/trypanofan/main/>
- TrypanoFAN: <http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/software/RNAit.html>
- TSVIEW
- UniProt: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/>
- Vector NTI8: <http://es-ar.invitrogen.com/site/mx/es/home/Products-and-Services/>
- Webcutter 2.0: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS

Pares de primers	Secuencia	Plásmido
ARNi		
p2T7-TbPARP		
Fwd: BglII/HindIII	ACACAGATCTAAGCTTGACATGAAAGACGATGAGGC	p2T7 ^{T1} -177
Rev: EcoRI/PstI	CGGAATTCTGCAGAGGCCCGTATTAGTGTC	
p2T7-TbPARG		
Fwd: HindIII	AAGCTTGGTAGCAGTCAATGTGCGAAGG	p2T7 ^{T1} -177
Rev	TTCGCATAACCCCTCCGTAAC	
Sobre-expresión		
p2216-TbPARP		
Fwd: HindIII/EcoRI	AAGCT TGG AATTCATGGCGGCTAAAGGAAAGT	p2216
Rev: BamHI/Spel	GGATCCACTAGTTTTATACTCAAAGAAACACGAAC	

Constructos truncados PARP		
p2216-Nterm		
Fwd: HindIII/EcoRI	AAGCT TGG AATTCATGGCGGCTAAAGGAAAGT	p2216
Rev: BamHI/SpeI	GGATCCACTAGTGTCTCTCTCGTACACATGGCA	
p2216-WRC		
Fwd: HindIII/EcoRI	AAGCTTGAATTCATGGAGAGAGACGGCACCGTG	p2216
Rev: BamHI/SpeI	GGATCCACTAGTTTTATACTCAAAGAAACACGAAC	
Etiquetado endógeno		
p22b(+)-TbPARP		
Fwd: BamHI	GGATCCAATGGCGGCTAAAGGAAAGT	p22b(+)
Rev: HindIII	AAGCTTAAAAGAAACACGAACTAGATACCTCAA	
Etiquetado endógeno de constructos truncados		
p22b(+)-REG-CAT		
Fwd: BamHI	GGATCCAGTGAGAGAGTCAAAGTTACCC	p22b(+)
Rev: HindIII	AAGCTTAAAAGAAACACGAACTAGATACCTCAA	
P22B(+)-WGR-REG-CAT		
Fwd: BamHI	GGATCCCAGAGAGACGGCACCGTG	p22b(+)
Rev: HindIII	AAGCTTAAAAGAAACACGAACTAGATACCTCAA	
Para secuenciar		
pGEM-Teasy TbPARG		
Fwd: BamHI	GGATCCGATGACTTCTCACAAAC	pGEM-Teasy
Rev: XhoI	CCTCGAGAATTAACACCAGATGTG	

LISTA DE ANTICUERPOS UTILIZADOS

Descripción	Proveedor
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 594-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Mouse IgG HRP-Labeled	PerkinElmer
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 594-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG HRP-Labeled	PerkinElmer
Mouse monoclonal anti-GFP clone B-2	Santa Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-polyHistidine clone HIS-1	Sigma-Aldrich
Mouse monoclonal anti-β-Tubulin clone KMX-1	Chemicon International®
Mouse polyclonal anti-PAR	Santa Cruz Biotech
Mouse polyclonal anti-TcPARG	Producido en el laboratorio
Rabbit polyclonal anti-PAR	BD Pharmingen™
Rabbit polyclonal anti-TbPARP	Genscript
Rat monoclonal anti-α-Tubulin Tyrosinated (YL 1/2)	Pierce Antibodies

ÁCIDOS NUCLEICOS: METODOLOGÍAS

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

- **Condiciones generales.** A partir de las secuencias identificadas se diseñaron oligonucleótidos específicos. Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando mezclas de reacción estándar que contienen: buffer de reacción (según indicaciones del fabricante); 2 mM de MgCl₂; 0,2 μM de cada primer; 0,2 mM de mezcla de dNTPs y 1,25 U de Taq Polimerasa; en un volumen final de 25 μl. Las reacciones de PCR se realizaron con Polimerasa Taq (Invitrogen) o Polimerasa de ADN Phusion® High-Fidelity (New England BioLabs), en caso de requerir alta fidelidad. La masa utilizada para un templado de ADN plasmídico fue de 10 ng, mientras que para un templado de ADN genómico de 200-500 ng. Para este último caso se adicionó a la reacción 10% de DMSO.

El ciclado de la reacción también se realizó en condiciones estándar e involucró los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial del ADN por calentamiento a 95 °C durante 5 min.
2. Ciclado (por lo general se utilizaron 30 ciclos), que comprende 3 pasos:
 - Desnaturalización a 95 °C durante 1 min.
 - Temperatura de “*annealing*”: varió de acuerdo al par de primers utilizado, ya que la eficiencia de unión de los oligonucleótidos al fragmento a amplificar está relacionada con la longitud y la composición de los primers.
 - Elongación a 72 °C. El tiempo de elongación depende del tamaño del fragmento a amplificar, y se lo calcula a razón de 1 min ó 30 seg por cada kpb para la Taq polimerasa y la High Fidelity Polimerasa, respectivamente.
3. Extensión final a 72 °C durante 10 min para terminar de extender las cadenas incompletas.

Una alícuota del producto de reacción (10%) se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1%, en buffer TAE 1x (Tris 40 mM – Ac. Acético 20 mM – EDTA 1 mM). Para su visualización se colocó en el gel 0,5 μg/ml de Bromuro de etidio, lo que permitió evidenciar las bandas con un transiluminador UV.

- **Adición de –dA a los extremos romos.** El producto de PCR obtenido con la enzima Polimerasa de ADN Phusion® High-Fidelity posee extremos romos. Por esta razón es necesario adicionar una base dA previo al sucblonado en el vector pGEM®-T Easy. Esto se realizó incubando los amplicones con la enzima Polimerasa Taq durante 15 min a 72 °C.

- **Colony PCR.** La técnica de “*Colony PCR*” es un método rápido para la detección de la presencia del inserto en un determinado plásmido, a partir de colonias individuales de bacterias. Primero se picaron las colonias con una punta de pipeta estéril, se estriaron en una placa de LB agar con el antibiótico correspondiente y las bacterias remanentes sobre la punta de la pipeta se resuspendieron directamente en la mezcla de PCR. Se llevó a cabo la reacción de PCR de acuerdo al protocolo antes mencionado.

CLONADO

Subclonado de fragmentos de PCR

Los fragmentos amplificados por PCR fueron subclonados en el vector pGEM®-T Easy, según las indicaciones del fabricante. Las secuencias insertas en estos vectores fueron enviadas a secuenciar para confirmar la fidelidad de la amplificación.

Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción

El ADN (0,5 µg), correspondiente al plásmido con el inserto, fue digerido con enzimas de restricción de la marca New England Biolabs (2,5 unidades). En la mezcla de reacción se incluyó un buffer compatible con la enzima y, en caso de corresponder, BSA a una concentración final de 0,1 mg/ml. El volumen final de reacción fue de 25 µl y la incubación se produjo durante 3 h a 37 °C. En caso de variar la masa de ADN a digerir, las unidades de enzima y el volumen de reacción fueron modificados de manera proporcional. Los fragmentos de interés se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel y PCR Clean-up system (Promega, WI, USA).

Geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon con buffer TAE 1x al 0.7-2 % con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles fueron visualizados y fotografiados mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de interés se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel y PCR Clean-up system (Promega, WI, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Reacciones de ligación

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 50 y 100 ng de vector. Se hicieron diferentes relaciones molares de inserto:vector (1:1, 3:1 y 5:1), manteniendo constante la masa del vector y variando la cantidad del inserto. La masa del inserto se calculó de la siguiente manera:

$$\text{masa del inserto} = \frac{\text{masa del vector} \times \text{tamaño del inserto} \times \text{relación inserto:vector}}{\text{tamaño del vector}}$$

El volumen de reacción utilizado varió entre 10 y 20 μl . Para ligar extremos romos se agregó 1 U de la enzima ADN ligasa del fago T4 (New England Biolabs), mientras que se agregó 0,1 U para ligar extremos cohesivos. Las incubaciones se realizaron a 16 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 h.

Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada a través del servicio de secuenciación de la empresa MacroGen Inc. Los resultados provistos por esta compañía fueron analizados mediante los programas Vector NTI 10.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR SHOCK TÉRMICO

Preparación de células ultracompetentes

A partir de una colonia aislada de bacterias DH5 α de *E. coli* desde la placa de LB-Agar, se inocularon 6,25 ml de LB y se incubó durante 6-8 h a 37 °C en agitación. Transcurrido este tiempo, tres erlenmeyers con 62,5 ml de medio SOB fueron inoculados con tres volúmenes distintos del cultivo crecido durante el día: 0,5 ml, 1 ml y 2 ml. Los tres cultivos se incubaron toda la noche a 20 °C en agitación. A la mañana siguiente se midió la DO₆₀₀ de los tres cultivos y se eligió aquel que poseía un valor de 0,55; descartando los dos restantes. El cultivo seleccionado se centrifugó a 3.900 rpm (rotor Sorval GSA) por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en 20 ml de Buffer de transformación Inoue (HEPES 10 mM pH 6,70; MnCl₂ 55 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 0,25 M) previamente enfriado. La suspensión fue centrifugada a 3.900 rpm (rotor Sorval GSA), el sobrenadante descartado y el precipitado resuspendido en 5 ml de Buffer de Transformación Inoue frío. A la suspensión se le agregó 0,375 ml de DMSO y se dejó reposar 10 min en hielo. Luego, la suspensión fue distribuida en alícuotas de 50 μl en tubos eppendorf de 1,5 ml y

traspasados inmediatamente a N₂ líquido. Los eppendorfs se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Transformación bacteriana por *shock* térmico

Las bacterias competentes (50 µl) se pre-incubaron en baño de hielo durante 20 min con 5 µl de ADN o con el total de la mezcla de ligación, según si el inserto fue ligado al vector pGEM®-T Easy o a otro plásmido, respectivamente. Las bacterias fueron luego sometidas a un shock térmico a 42°C durante 90 segundos en baño seco. Tras el agregado de 1 ml de medio LB, las mismas se incubaron durante 1 h en estufa a 37°C para permitir su recuperación. El cultivo se centrifugó brevemente (5 min a 4.000 rpm) y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 µl de medio, para ser transferido y esparcido con perlas de vidrio a una placa de Petri con medio LB, antibióticos y otros reactivos que pudieran ser necesarios (de acuerdo al vector y la cepa bacteriana utilizada). La placa se incubó durante toda la noche en la estufa de 37°C para obtener colonias que portaran el vector recombinante. Las colonias fueron analizadas por *PCR colony* y aquellas que resultaron positivas se amplificaron con la técnica de miniprep y se re-chequearon mediante la digestión con enzimas de restricción.

Para la amplificación de plásmidos se utilizó la cepa bacteriana DH5α. En cambio, para la expresión de proteínas recombinantes en un sistema bacteriano se utilizó alguna de las distintas variantes de la cepa BL21 de *E. coli*.

Preparación de plásmidos por Miniprep

Una colonia de bacterias DH5α de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés fue aislada de la placa LB-Agar y crecida toda la noche a 37°C en 3 ml de medio líquido fresco (suplementado con el antibiótico correspondiente). Al día siguiente el cultivo se centrifugó por 10 min a 4.000 rpm y el sobrenadante fue descartado. El precipitado bacteriano se resuspendió exhaustivamente en 200 µl de Solución I de Miniprep (Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH8; EDTA 10 mM pH8).. Luego se agregaron 400 µl de Solución II de Miniprep (SDS 1%; NaOH 0,2 N) preparada en el momento y se mezcló por inversión. Tras la incubación durante 5 min en hielo se agregaron 300 µl de Solución III de Miniprep (KAc 3M pH5), y se mezcló vigorosamente por inversión. La mezcla se dejó reposar 5 min en hielo y luego se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf, se agregó RNAsa (50 µg/ml) y se incubó durante 1 hora a 37°C. A continuación se realizaron dos extracciones consecutivas con 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclando y separando las fases por

centrifugación. Finalmente el ADN plasmídico fue precipitado con el agregado de 500 μ l de 2-propanol y por centrifugación durante 30 min a 13.000 rpm. El pellet fue lavado con etanol 70% y resuspendido en 30 μ l de ddH₂O.

SOUTHERN-BLOT

La técnica de Southern blot permitió el análisis de la presencia y número de copias genómicas de los genes *parp* y *parg* en *Trypanosoma brucei*. También permitió confirmar en las cepas transgénicas la incorporación al genoma del gen externo. En cada caso se utilizaron sondas específicas.

Extracción de ADN genómico de parásitos procíclicos

Para la obtención de ADN genómico de procíclicos de *T. brucei*, se recolectaron 10 ml de cultivo a una densidad de 5×10^6 parásitos/ml por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. El pellet de parásitos se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis fresco (Tris-HCl 10 mM pH8; EDTA 100 mM y SDS 1%) y se mezcló suavemente. A continuación se realizaron 2 extracciones con 500 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) a fin de eliminar las proteínas de la muestra, y la fase acuosa recuperada se incubó durante 2 h a 37°C con 40 μ g/ml de ARNasa. Tras otra extracción, el ADN se precipitó por agregado de 1 volumen de isopropanol y por centrifugación a 13.000 rpm durante 30 min. El pellet se lavó con etanol 70% frío y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se resuspendió en ddH₂O. La cuantificación se llevó a cabo con el nanodrop (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a 260 (A_{260}).

Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción

El ADN genómico extraído de procíclicos de *T. brucei* (5 μ g) fue digerido con enzimas de restricción de New England Biolabs (20 U). El volumen final de reacción fue de 100 μ l y, en caso de ser necesario, se complementó con BSA a una concentración final de 0,1 mg/ml. La reacción se llevo a cabo toda la noche a 37°C. El grado de digestión del ADN se evaluó a la mañana siguiente corriendo una fracción de la mezcla de reacción (10 μ l) en un gel de agarosa 0,8%. El ADN completamente digerido fue concentrado por vacío en SpeedVac y separado electroforéticamente.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis del ADN genómico digerido se realizó en gel de agarosa 0,8 % (Invitrogen) con buffer TAE 1X y a una concentración final de bromuro de etidio de 0,5 μ g/ml. Antes de ser sembradas en el gel, las muestras fueron resuspendidas en buffer

de siembra para ADN 6X (que contiene glicerol y Azul de bromofenol, un colorante que permite observar el frente de corrida). La corrida se realizó a 25 V durante 18 h. La resolución del gel fue observada en un transiluminador UV y fotografiada.

Transferencia

El ADN se transfirió a una membrana de nylon (GeneScreen de Perkin Elmer Life Science, Inc.) por el método de transferencia alcalina. Luego de la corrida, el gel fue sumergido primero en HCl 0,25 N durante 10 min en agitación (hasta que el colorante azul de bromofenol viró a amarillo) y luego en una solución de NaOH 0,4 N durante 30 min para desnaturalizar el ADN. En paralelo, la membrana de nylon fue humedecida con agua y equilibrada en la misma solución de NaOH 0,4 N. La transferencia desde el gel se realizó en buffer NaOH 0,4 N por capilaridad durante toda la noche a temperatura ambiente. Una vez transferido el ADN, la membrana se enjuagó en SSC 2X por 2 min y se procedió a la fijación con luz UV mediante un pulso de radiación de 120000 μ J, utilizando el dispositivo UV Stratalinker 1800 de Stratagene.

Sondas

Las sondas fueron obtenidas por digestión enzimática del fragmento de PCR clonado en el vector pGEM®-T Easy. La sonda con la que se detectó al gen *parp* corresponde al fragmento de 1.140 pares de bases comprendido entre las posiciones 583 y 1772 del gen, y fue obtenida con las enzimas de restricción SmaI y XhoI (el sitio de restricción para esta última fue incorporado al primer). La sonda con la que se detectó al gen *parg* corresponde al fragmento de 1.048 pares de bases comprendido entre las posiciones 103 y 1.150 del gen, y fue obtenida con la enzima de restricción NcoI.

Para la detección de los genes recombinantes que codifican para las proteínas fusionadas a la eYFP se utilizó la secuencia de la *eyfp* como sonda. La misma fue obtenida por digestión del vector p2216 con las enzimas de restricción BamHI y EcoRV.

A continuación, las sondas fueron marcadas radioactivamente con el kit Random Primer Extension Labeling System (Perkin Elmer, MA, USA), utilizando 50 ng de ADN y [³²P]-dCTP como nucleótido radioactivo. Una vez finalizada la reacción de marcación, la sonda fue purificada utilizando MicroSpin (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Hibridación y Revelado

La membrana con el ADN fijado fue bloqueada con buffer CHURCH durante 3 h en horno de hibridación a 65°C, con rotación constante. La hibridación con la sonda marcada se realizó durante toda la noche a la misma temperatura. A la mañana siguiente, se retiró la sonda y se llevaron a cabo tres lavados de 15 min con las siguientes soluciones: SSC 2X/SDS 0,1%; SSC 1X/SDS 0,1% y SSC 0,2X/SDS 0,1%. Finalizados los lavados, la señal radioactiva se detectó mediante la exposición a una pantalla amplificadora radiosensible, cuya señal se registró luego mediante Phosphoimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

NORTHERN-BLOT

Extracción de ARN total

Una cantidad de 1×10^8 parásitos procíclicos de *T. brucei* se resuspendieron en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se le añadieron 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclándolo con vortex. Luego de incubar las muestras 5 min en hielo, se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Tras recuperar la fase acuosa, se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló la solución por inversión, dejando precipitar el ARN durante 30 min a temperatura ambiente. El material precipitado se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet de ARN se lavó con etanol 70% frío, y se lo dejó secar a temperatura ambiente para eliminar los residuos de alcohol. El ARN se resuspendió en 50-100 μ l de agua DEPC. Todos los materiales y reactivos utilizados estaban libres de ARNasas. La integridad del ARN extraído se confirmó por electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se distinguieron las tres bandas correspondientes al ARN ribosomal.

Corrida Electroforética en Gel de Agarosa con formaldehído

La separación de 5 μ g de ARN total se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (Invitrogen) - formaldehído 0,6 M en buffer MOPS 1X, utilizando MOPS 1X-formaldehído 0,2 M como buffer de corrida. Las muestras se sembraron con buffer de siembra para ARN 2X fresco y la corrida electroforética se realizó a 80-100 V durante 4-6 h. Los geles fueron observados en un transiluminador UVP y fotografiados.

Transferencia

El ARN total resuelto en el gel de agarosa fue enjuagado en 5 volúmenes de ddH₂O por 15 min con agitación, con el fin de eliminar el formaldehído. La transferencia a la membrana de nylon (GeneScreen de Perkin Elmer Life Science, Inc.) se realizó por capilaridad en buffer SSC 10x durante 16-18 h. La fijación del ARN a la membrana se realizó con luz UV mediante un pulso de radiación de 120000 μ J, utilizando el dispositivo UV Stratalinker 1800 de Stratagene.

Sondas

Las sondas para la detección del ARNm correspondiente a *parp* y *parg* se obtuvieron y marcaron de la misma forma que la descrita en el apartado "Sondas" de la sección "Southern-blot". En el caso de *parp*, sin embargo, se utilizó la misma secuencia que la utilizada para el ARN de interferencia (fragmento de 416 pares de bases, entre las posiciones 1030 y 1445 del gen).

Hibridación y Revelado

Los pasos de hibridación, lavado y exposición de la membrana se realizaron de la misma manera que la descrita en el apartado "Hibridación y Revelado" de la sección "Southern-blot".

PROTEÍNAS: METODOLOGÍAS

EXTRACTOS PROTEICOS

Preparado de extractos de proteínas totales de *T. brucei*

Los parásitos provenientes de un cultivo en fase exponencial fueron recolectados mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. El pellet de parásitos fue lavado con PBS 1x y resuspendido en 100 μ l de Buffer de Lisis (Tris-HCl 50 M pH 8,00; EDTA 5 mM; β -mercaptoetanol 10 mM; Glicerol 10% v/v; NP-40 0,05 % v/v; NaCl 300 mM), suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; E-64 1 μ g/ml; Pepstatina A 1 mM) y 10 mM de 3-aminobenzamida (un inhibidor de PARP). Las muestras fueron sometidas a 6 ciclos de 15 segundos de sonicación y la concentración proteica fue cuantificada por el método de Bradford. Este procedimiento se aplicó para las dos formas del parásito.

Preparado de extractos de proteínas totales de bacterias

Los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 6.000 g durante 10 min a 4 °C y los pellets resuspendidos en buffer de Lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,00; EDTA 5 mM; β -mercaptoetanol 10 mM; Glicerol 10% v/v; NP-40 0,05 % v/v; NaCl 300 mM), suplementados con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; E-64 1 μ g/ml; Pepstatina A 1 mM; TLCK 0,1 mM) y 10 mM de 3-aminobenzamida (un inhibidor de PARP). Alternativamente, para los experimentos de TbPARP y sus versiones truncadas, los cultivos bacterianos fueron resuspendidos en un buffer de Lisis diferente (HEPES 100 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 10 mM; TCEP 0,5 mM; IGEPAL 0,05%) en una relación 1,5 ml de buffer/1 mg de masa húmeda. En este último caso los extractos fueron almacenados a -20 °C. Tras descongelarlos, se les adicionó 0,25 mg de lisozima (Sigma-Aldrich), 250 U de benzonasa (Sigma-Aldrich), una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) y 1 mM de 3-AB (Alexis Biochemicals).

En ambos casos las bacterias fueron sometidas a 6 ciclos de 20 segundos de sonicación (BRANSON 250 Sonifier) y centrifugadas a 35.000 g durante 20 min. El sobrenadante fue trasvasado y, para los experimentos de TbPARP y sus versiones truncadas, filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m. La cuantificación proteica fue realizada mediante el método de Bradford.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las cepas Rosetta2(DE3)pLysS o BL21-CodonPlus(DE3)-RIL de *E.coli* transformadas con el vector de expresión bacteriano pET22b(+) expresaron la proteína de interés fusionada a 6 histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal.

Inducción de cultivos bacterianos

Las bacterias BL21-CodonPlus(DE3)-RIL de *E.coli* transformadas con el vector de expresión pET22b(+) fueron inoculadas en medio LB, suplementado con ampicilina y cloranfenicol. El cultivo fue incubado durante 18 h a 37 °C con agitación para luego incrementar su escala haciendo una dilución 1/20 hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Una vez que el cultivo alcanzó la densidad deseada, se adicionó IPTG a una concentración final de 0,2 mM. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 4 h para la obtención de proteínas solubles. A modo de control, se evitó el agregado del inductor IPTG a uno de los cultivos.

Alternativamente, para obtener a TbPARP y a sus versiones truncadas en la fracción soluble se utilizaron bacterias de la cepa Rosetta2(DE3)pLysS transformadas con el vector de expresión pET22b(+). Para iniciar el cultivo, las bacterias fueron

inoculadas en medio TB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, e incubadas durante toda la noche a 37 °C, con agitación a 180 rpm. El cultivo crecido fue utilizado luego para inocular (dilución 1/100) 750 ml de medio TB de auto-inducción con glicerol 0,8% y antibióticos. La inducción del cultivo se llevó a cabo durante 24 h a 28 °C con agitación.

Una vez concluidas las inducciones, los extractos bacterianos se obtuvieron como se describe en el protocolo de la sección “Extractos proteicos” del apartado “Bacterias”.

La eficiencia de expresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante SDS-PAGE y Western-blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra la cola de histidinas o contra la proteína de interés.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA

Las proteínas recombinantes con el tag de 6xHis fueron purificadas por cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA. La columna HisTrap HP (GE Healthcare) fue equilibrada con buffer de unión (HEPES 20 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM; glicerol 10%, TCEP 0,5 mM) utilizando una bomba peristáltica a 4 °C. El lisado clarificado fue cargado en la columna HisTrap HP de 1 ml con un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó luego con 20 ml de buffer de unión y con 20 ml del mismo buffer conteniendo 25 mM de imidazol. Las proteínas fueron eluidas con el buffer de elución, suplementado con 250 mM de imidazol (HEPES 20 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM; glicerol 10%, TCEP 0,5 mM).

El eluido de la columna Ni-NTA se purificó adicionalmente por filtración en gel o por columna de Heparina. El proceso de purificación se monitoreó por el método de Bradford (Bio-Rad), y la pureza de las proteínas por geles de poliacrilamida SDS-PAGE teñidos con Coomassie Brilliant Blue.

Cromatografía de afinidad e intercambio iónico en columna de Heparina

El eluido (12 ml) de la purificación por cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA se purificó adicionalmente por columna de Heparina HiTrap HP (GE Healthcare). El mismo se diluyó a un volumen final de 30 ml con HEPES 50 mM pH 7,0; TCEP 1 mM; EDTA 1 mM y glicerol 10%, para llevar el NaCl a una concentración final de 200 mM. La solución (30 ml) fue cargada en una columna de Heparina de 5 ml de capacidad, la cual fue lavada con 30 ml de buffer A (HEPES 50 mM pH 7,0; NaCl 200 mM; TCEP 0,5 mM; EDTA 1 mM; glicerol 10 %) a una velocidad de 1 ml/min. Tras

conectar la columna a un equipo de purificación automática (BioRad), la elución se realizó mediante un gradiente de concentración (desde 0 a 100% en 120 ml) con el buffer B (HEPES 50 mM pH 7,0; NaCl 1 M; TCEP 0,5 mM; EDTA 1 mM; glicerol 10 %), a una velocidad de 2 ml/min. El eluido fue recolectado en muestras de 1 ml.

Cromatografía de exclusión molecular

La purificación adicional por filtración en gel se realizó usando una columna Superdex 200 de alta carga 10/30 (GE Healthcare) acoplada a un equipo de purificación automática ÄKTA Purifier (GE Healthcare), con un buffer que constaba de HEPES 20 mM pH 7,5; NaCl 500 mM, glicerol 10% y TCEP 0,5 mM. Las fracciones obtenidas por la cromatografía de exclusión molecular fueron analizadas por SDS-PAGE y evaluadas por ensayos de actividad. Aquellas que presentaron mayor actividad fueron agrupadas y cuantificadas por el método de Bradford (Bio-Rad). Las proteínas fueron congeladas en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos de proteínas totales fueron cuantificados por el método de Bradford. En una placa de poliestireno de 96 pocillos se colocaron 10 µl de la muestra y 200 µl de reactivo de Bradford 1x (BIORAD), y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas VERSAmax® (Molecular Devices Corporation). Para la construcción de una curva de calibración se utilizaron patrones de seroalbúmina bovina (BSA) y, sobre la base de la misma, se determinó la concentración proteica de las muestras.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de proteínas fue realizado en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli. Entre 40-60 µg de proteínas totales fueron mezclados con buffer de siembra 5x (que consta de SDS), calentados en baño seco a 95 °C durante 10 min y sembrados en geles de poli(acrilamida) desnaturalizantes (10%). La corrida electroforética se realizó en buffer Tris-glicina con SDS 0,1%, utilizando una corriente eléctrica constante de 35 mA por gel.

Una vez finalizada la separación electroforética, o bien se continuó con el análisis de Western-blot o se tiñó el gel con la solución de Coomassie Brilliant Blue durante 30 min en agitación suave. El desteñido del gel se produjo con Solución Decolorante. Para verificar el tamaño de las proteínas se utilizó el marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

WESTERN-BLOT

Transferencia de proteínas

Para la electrotransferencia, se utilizaron las membranas de PVDF Amersham Hybond-P (GE Healthcare) o de nitrocelulosa Amersham Hybond ECL (GE Healthcare), las cuales fueron pre-tratadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el sistema de electrotransferencia semi-seca, se utilizaron papeles de transferencia Whatman 3MM embebidos en buffer Tris-glicina 1x - metanol 20%, utilizando el dispositivo FastBlot (Biometra). La transferencia se realizó a 8 mA/cm², durante 45 min. La calidad de la transferencia se evaluó por tinción con Rojo Ponceau.

Inmunodetección

Las membranas se incubaron en solución de bloqueo durante 16 h (TBS 1x-Tween 0,05% - Leche Sancor 0,5%). Una vez finalizado este proceso, se enjuagaron brevemente en TBS 1x-Tween 0,05% y se incubaron durante 60 min con una dilución adecuada del anticuerpo primario. Tras esta incubación, se lavaron 3 veces en TBS 1x-Tween 0,05%; 5 min cada lavado. A continuación se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase HRP). Tras repetir los 3 lavados con TBS 1X-Tween 0,05%, las membranas se revelaron utilizando el kit de quimioluminiscencia Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y las placas AGFA CP-BU New Medical X-Ray Film.

DOT-BLOT

Las membranas de PVDF Amersham Hybond-P (GE Healthcare) o de nitrocelulosa Amersham Hybond ECL (GE Healthcare) fueron tratadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Sobre ellas se sembraron manualmente 3-5 µg de proteínas totales. La calidad de la siembra se evaluó por tinción con Rojo Ponceau. La inmunodetección se realizó como se detalla en la sección “Inmunodetección” del apartado “Western-blot”.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*

Ensayo de fluorescencia en microplaca

La actividad de la enzima TbPARP purificada fue medida utilizando un método fluorométrico que había sido descrito anteriormente para la hPARP-1 (Putt and Hergenrother 2004).

La enzima TbPARP se incubó en presencia de 500 nM de NAD⁺, de ADN activado (Sigma Aldrich) y del buffer correspondiente para su actividad (volumen final 50 µl) en una placa de propileno de 96 pocillos con fondo en U negro (Greiner BioOne) durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación a 300 rpm (Biosan PST-100 HL). La reacción se frenó mediante la adición de 20 µl de KOH 2 M y 20 µl de acetofenona 20% en etanol. Luego de incubar la placa otros 10 min a temperatura ambiente, se adicionó 90 µl de ácido fórmico 88%. Esta reacción convierte al NAD⁺ restante en un derivado fluorescente. Transcurridos los 20 minutos, se midió la fluorescencia en un Varioskan flash 4.00.53 (Thermo Scientific) utilizando una longitud de onda de excitación a 372 nm y una de emisión a 444 nm. El consumo de NAD⁺ se detectó por la disminución de la fluorescencia respecto del control sin enzima. Cada punto experimental se realizó por triplicado. Tanto la concentración de la enzima como el tiempo de incubación se ajustaron de manera que la actividad del control positivo fuera de aproximadamente 25%, rango en el cual se obtiene una señal robusta sin enlentecer la actividad enzimática debido a una disminución en la concentración de sustrato.

Ensayos con NAD⁺ biotinilado

La enzima TbPARP (120 nM) se incubó en presencia de bioNAD⁺ 1 µM y de 25 µg/ml ó de 50 µg/ml de ADN activado (Sigma Aldrich) en buffer NaH₂PO₄ 100 mM pH 7 (volumen final 50 µl) durante 1,5 h a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con el agregado del buffer de siembra con SDS y calentada durante 5 min a 98 °C. A continuación se procedió con la técnica de Western-blot o de Dot-blot, como se describe en los respectivos apartados.

La membrana fue bloqueada con TBS 1x - Caseína 1% (Bio-Rad) durante toda la noche a 4°C y se detectaron las proteínas modificadas por bioNAD⁺ utilizando peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (PerkinElmer).

ENSAYO DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Tras purificar a la enzima TbPARP o a sus versiones truncadas por medio de cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA, cromatografía en columna de Heparina y cromatografía de exclusión molecular (ver en el apartado “Purificación de proteínas recombinantes”), las mismas fueron concentradas por centrifugación con filtros de 30 kDa (Millipore).

A continuación, las proteínas purificadas y concentradas fueron incubadas con ADN doble cadena de diferentes tamaños en buffer (HEPES 20 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; EDTA 1 mM; TCEP 0,5 mM) (volumen final 20 μ l) durante 1,5 h en hielo. La mezcla luego fue corrida en un gel de agarosa 0,7% a 80 V.

SCREENING DE INHIBIDORES DE TbPARP

Ensayo de actividad

Las soluciones madre se prepararon en DMSO y se mantuvieron a -20° C. Una alícuota de éstas (100 mM, 10 mM y 1 M) fue utilizada en la reacción enzimática a una dilución 1/10. Las soluciones con los inhibidores fueron añadidas por triplicado a la placa de 96 pocillos, seguido de la adición de NAD^{+} (500 nM) en el buffer de reacción. La reacción fue iniciada mediante la adición de la TbPARP (10 nM) diluida en el mismo buffer. La placa se incubó a 25° C con agitación (300 rpm, Biosan PST-100 HL) durante 45 min. Esto dio como resultado el consumo del 50% de NAD^{+} y una relación señal/ruido de 2. Para detectar cualquier fluorescencia potencial inherente a los compuestos, se llevaron a cabo por separado reacciones control que solo contenían el compuesto a una concentración final de 10 μ M. Los valores promedio de los pocillos control (con el compuesto NAD^{+} solo) se establecieron como 100% de inhibición, mientras que los valores promedio de los pocillos que contenían NAD^{+} y PARP se establecieron como el 0% de inhibición.

Medida de la potencia de inhibición

Los valores de IC_{50} se determinaron para los inhibidores más potentes de TbPARP que resultaron del screening inicial. Los inhibidores seleccionados fueron Veliparib (ABT-888, Alexis Bioquímicos), 4-ANI (Alexis Bioquímicos), EB-47 (Alexis Bioquímicos), 1,5-isoquinolinediol (Alexis Bioquímicos), NU1025 (Alexis Bioquímicos), PJ-34 (Alexis Bioquímicos), Olaparib (JS Investigación Químicos Trading), RF03876 (Maybridge), y Rucaparib (Selleck Bioquímicos). El valor de IC_{50} para 3-AB (Alexis Biochemicals) también fue determinado para ser utilizado como referencia.

Brevemente, la mezcla de reacción con cada inhibidor fue añadida a una placa de 96 pocillos (10 puntos de datos). La reacción fue iniciada tras la adición de TbPARP 5 nM (volumen final de 50 μ l). Las placas fueron incubadas durante 10 min a 25 °C y el NAD⁺ remanente fue determinado como se describe en la sección “Ensayo de fluorescencia en microplaca” en el apartado “Ensayos de actividad *in vitro*”. El consumo de NAD⁺ en todos los casos se mantuvo por debajo de 15%. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y se ajustaron para cada inhibidor tres curvas dosis-repuesta independientes. La fluorescencia fue utilizada directamente para el ajuste de la curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente variable (Graphpad Prism). Los pocillos control con NAD⁺ solo o NAD⁺ y la enzima se utilizaron para el ajuste de la curva.

MODELADO POR HOMOLOGÍA Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL

La búsqueda de secuencias homólogas a la proteína TbPARP se realizó en una base de datos proteica (Uniprot Identificación: Q0PW89). Estructuras de alta calidad de hPARP-1 (AP código 3GJW (Miyashiro, Woods et al. 2009)), hPARP-2 (código PDB 3KJD (Karlberg, Hammarstrom et al. 2010)) y hPARP-3 (AP código 3C4H (Lehtio, Jemth et al. 2009)) fueron seleccionadas y alineadas junto con la TbPARP usando el programa ClustalW (Larkin, Blackshields et al. 2007). El alineamiento se analizó utilizando el programa Aline (Bond and Schuttelkopf 2009). La TbPARP fue modelada usando la estructura hPARP-1 y el programa de alineamiento múltiple de secuencias Modeller (Sali and Blundell 1993). Las superposiciones del texto y las figuras se hicieron utilizando el algoritmo de superposición SSM en FOCHA (Krissinel and Henrick 2004) y las representaciones estructurales se hicieron utilizando CCP4mg (McNicholas, Potterton et al. 2011).

PARÁSITOS: METODOLOGÍAS

CULTIVOS DE *T. brucei*

Medios de cultivo

Células procíclicas de la cepa 29-13 (Wirtz, Leal et al. 1999) fueron crecidas a 28 °C en medio SDM-79 (Bioscience), suplementado con 10% v/v de FCS y 0,002% de hemina. Células sanguíneas de la cepa 90-13 (Wirtz, Leal et al. 1999) fueron cultivadas a 37 °C con 5% de CO₂ en medio HMI-11 (Iscore's Modificado Dulbecco medio (Invitrogen)) suplementado con 10% v/v de FCS. Para mantener estables las

construcciones génicas que codifican la Polimerasa de ARN T7 y el represor de Tetraciclina, 15 µg/ml de G418 (GIBCO) y 50 µg/ml de Higromycina B (Invitrogen) fueron agregados al medio SDM-79 para la línea celular 29-13, y 2,5 µg/ml de G418 y 5 µg/ml de Higromycina B fueron agregados al medio HMI-11 para la cepa 90-13. Para evitar contaminaciones bacterianas 50 µg/ml de streptomycina y penicilina fueron añadidos a ambos cultivos.

Superada una determinada densidad, las células fueron diluidas con medio fresco. La viabilidad celular se evaluó mediante el examen microscópico.

Determinación de la densidad celular

Tras homogeneizar el cultivo agitando la botella, fueron tomados del mismo 10 µl y colocados bajo el cubreobjetos de una cámara de Neubauer. Se contaron las células de 2 cuadrantes y el promedio fue multiplicado por 1×10^4 , obteniéndose el número de células en 1 ml de cultivo. Mediante diluciones se mantuvieron a los cultivos por debajo de 1×10^6 y de $1-2 \times 10^7$ parásitos/ml para los cultivos del estadio sanguíneo y procíclico, respectivamente.

Almacenamiento de parásitos

Tanto los cultivos de parásitos procíclicos como los de sanguíneos fueron congelados a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, es decir a una concentración de 5×10^6 y 1×10^6 , respectivamente. A los mismos se les agregó 15% de glicerol estéril y la mezcla se depositó en criotubos, los cuales fueron congelados lentamente en un dispositivo con isopropanol a -80°C . A las 72 horas los criotubos fueron depositados en el freezer a -80°C o bien en N_2 líquido, donde permanecen viables durante más tiempo.

Descongelamiento de parásitos

Los cultivos de parásitos procíclicos almacenados en glicerol fueron descongelados rápidamente en la estufa de 28°C . Una vez descongelados, se los colocó en 4 ml de medio de cultivo SDM-79 caliente suplementado con los antibióticos correspondientes, y se lo centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min para deshacerse del glicerol, que es tóxico para los parásitos. El pellet se resuspendió en 500 µl de medio de cultivo y se lo trasvasó a una botella para ser incubado en la estufa. Cuando se trató de cultivos transgénicos, el antibiótico de selección se agregó a las 24 horas, en nuestro caso zeocina (20 µg/ml).

Los cultivos de parásitos sanguíneos almacenados en glicerol fueron descongelados rápidamente colocándolos en la estufa de 37°C . Una vez

descongelados, se los colocó en 5 ml de medio de cultivo HMI-11 sin antibióticos. A las 24 horas se añadieron estreptomina y penicilina, a las 48 horas G418 e Higromicina B, y a las 72 horas el antibiótico de selección, cuando los cultivos eran transgénicos.

TRANSFORMACIÓN DE PARÁSITOS PROCÍCLICOS

Vectores

Para la técnica de ARN de interferencia se utilizó el vector p2T7^{T1}-177 (Wickstead, Ersfeld et al. 2002), el cual consta de 6.034 pb incluyendo al gen *gfp* entre los sitios Hind III y BamHI. En bacterias, tiene resistencia a ampicilina y en *T. brucei* a Zeocina o Fleomicina. Es un vector exclusivo para ARNi ya que presenta dos promotores de T7 enfrentados. Se debe utilizar en las líneas celulares 29-13 de parásitos procíclicos o 90-13 de parásitos sanguíneos, ya que cuentan con la Polimerasa de T7 y con el represor de tetraciclina. Esto permite que el silenciamiento del gen sea inducido en presencia de tetraciclina. El diseño de los primers y la elección de la zona del gen propicia para el silenciamiento se determinaron con la ayuda de la página web <http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/software/RNAit.html>.

Para el etiquetado y la sobre-expresión de proteínas se utilizó el vector p2216 (Kelly, Reed et al. 2007), el cual genera una proteína de fusión con la eYFP en el extremo carboxilo terminal. Al igual que el plásmido anterior, este vector también es inducible con tetraciclina y se utiliza en las mismas líneas celulares. El gen de interés se debe insertar en el marco de lectura correcto con las enzimas de restricción Hind III y BamHI.

Preparación del plásmido

Los vectores p2T7^{T1}-177 y p2216 fueron completamente linealizados con Not I. Para precipitar el constructo se agregaron 0,1 volúmenes de NaAC 3 M y 2,5 volúmenes de Etanol 100%, y la solución se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, se lavó el pellet con Etanol 70% y se secó en esterilidad para ser resuspendido en H₂O estéril.

Previo a la transformación, se esterilizó el plásmido (10 µg) incubándolo en placa seca a 65 °C durante 15 min. Luego se le hizo un spin y se colocó en hielo hasta ser utilizado.

Transformación

Alrededor de 10^9 células fueron cosechadas por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min, lavadas con buffer Cytomix frío (KCl 120 mM; CaCl_2 0,15 mM; K_2HPO_4 10 mM; Hepes 25 mM pH 7,6; EDTA 2 mM; MgCl_2 5 mM) y resuspendidas en 0,5 ml del mismo buffer, el cual contenía 10 μg de la construcción esterilizada. La electroporación se llevó a cabo en una cubeta de 2 mm con el equipo Gene Pulser (Bio-Rad) a un voltaje de 1,5 kV, 25 microfaradios de capacitancia y 2 pulsos. A continuación las células fueron transferidas inmediatamente a 10 ml de medio SDM-79 suplementado con antibióticos e incubadas a 28 ° C durante 24 horas. Los transfectantes fueron luego seleccionados con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Zeocina hasta que fueron obtenidas líneas estables luego de 3 semanas de incubación continua. Para la inducción del ARN doble cadena o para la sobre-expresión de la proteína de fusión, las células fueron cultivadas en el medio anteriormente descrito (ver la sección “Cultivos de *T. brucei*” en el apartado “Parásitos: metodologías”) con la adición diaria de 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina.

La presencia de los transgenes de ARNi fueron confirmados por análisis de Northern-blot y la presencia de los transgenes de sobre-expresión por Southern-blot. La expresión génica se determinó por análisis de Western-blot, cuando se disponía de anticuerpos específicos.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TbPARG *IN VIVO*

Un cultivo de parásitos procíclicos de 5×10^6 parásitos/ml fue centrifugado (3.000 rpm durante 5 min) y resuspendido en medio PBS-Glucosa 2%. El mismo fue incubado con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Digitonina durante 5 minutos y, tras su eliminación por centrifugación, resuspendido en el mismo medio en presencia de 120 nM del inhibidor de PARG ADP-HPD. Transcurridos los 10 minutos, los parásitos fueron tratados con 500 μM de H_2O_2 durante 10 minutos más y centrifugados, para ser resuspendidos en medio de cultivo SDM-79. Las muestras fueron tomadas a diferentes intervalos de tiempo. Los cultivos controles fueron tratados de la misma forma, aunque en éstos se evitó la adición del inhibidor ADP-HPD.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

El cultivo se lavó con PBS 1X y los parásitos fueron fijados durante 20 min a 4 °C en una solución de paraformaldehído 4%. Tras lavar nuevamente la muestra con

PBS 1X, la suspensión de parásitos fijados se dejó reposar sobre un portaobjetos tratado previamente con poli-L-lisina 10 mM (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Los parásitos adheridos se permeabilizaron por inmersión en una solución fresca de PBS-Tritón X-100 0,2% durante 10 min y se bloquearon con solución de bloqueo (PBS-BSA 3%) durante 30 min a TA. La incubación con el anticuerpo primario (en solución PBS-BSA 1% con PBS-Tween 0,05 %) varió desde 2 horas a TA hasta toda la noche a 4 °C. Luego de 2 lavados secuenciales de 5 min cada uno con PBS-Tween 0,1%, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 (Invitrogen) durante 2 horas a TA. Se llevaron a cabo 3 lavados más de 5 minutos cada uno en el siguiente orden: PBS-Tween 0,1%, PBS-Tween 0,05%, y PBS 1X. Finalmente se colocó la solución de montaje DABCO suplementada con 2,5 µl/ml de DAPI, se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se sellaron los bordes con laca sintética. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX41. Como control se incubó la muestra con el anticuerpo 2° solo (FITC) o con el suero pre-inmune.

TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

La exposición de los parásitos al H₂O₂ durante 10 min fue realizada en medio de cultivo o en PBS-Glucosa 2%, según se indique. En caso de haberse realizado el tratamiento en PBS-Glucosa 2% se utilizó una concentración de 500 µM ó 250 µM para los parásitos procíclicos y sanguíneos, respectivamente. En caso de haberse realizado en medio de cultivo se utilizó una concentración de 1 mM para los parásitos procíclicos. Al término del tratamiento las células fueron recogidas y tratadas como se detalla en cada una de las secciones, dependiendo si fueron analizadas por Dot-blot, Western-blot o IFI.

Para el estudio de la cinética de la aparición de PAR en el núcleo, una vez finalizado el tratamiento las células fueron centrifugadas (3.000 rpm durante 5 min) con el fin de eliminar el H₂O₂ en el medio y el pellet con parásitos fue resuspendido en medio de cultivo para reanudar la incubación del cultivo. A partir de este momento, se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo post-tratamiento.

INHIBICIÓN *IN VIVO* DE TbPARP EN CULTIVOS DE PARÁSITOS

Para los ensayos de inhibición *in vivo*, los parásitos de la forma procíclica fueron cultivados en medio SDM-79 durante 48 horas hasta alcanzar una densidad de 5x10⁶

parásitos/ml. Los parásitos de la forma sanguínea fueron cultivados en medio HMI-11 durante 24 horas hasta alcanzar una densidad de 5×10^5 parásitos/ml. En ambos casos, los parásitos fueron cosechados por centrifugación a 900 g durante 3 min y resuspendidos en PBS-Glucosa 2%. A continuación las formas procíclica y sanguínea fueron pre-incubadas en presencia de los inhibidores de PARP durante 30 ó 10 minutos, respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo, los parásitos fueron tratados durante 10 min con 500 μM de H_2O_2 en el caso del estadio procíclico o 250 μM de H_2O_2 en el caso del estadio sanguíneo.

Los extractos fueron obtenidos como se detalla en la sección de “Extractos proteicos” del apartado “Proteínas: metodologías”. El contenido proteico se cuantificó por el método de Bradford y se analizó por Dot-blot utilizando 3 μg de proteínas totales.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

Los parásitos de la forma procíclica fueron cultivados en medio SDM-79 durante 48 horas hasta alcanzar una densidad de 5×10^6 parásitos/ml. El cultivo se colocó en placas de 96 pocillos, en alícuotas de 200 μl a las que se les añadieron inhibidores de PARP a diferentes concentraciones. El Nifurtimox (NFX) se utilizó como control positivo en concentraciones que van desde 0,25 a 25 μM . A las 48 horas se determinó la densidad óptica de los cultivos a 620 nm. Como blanco se utilizó el medio de cultivo solo.

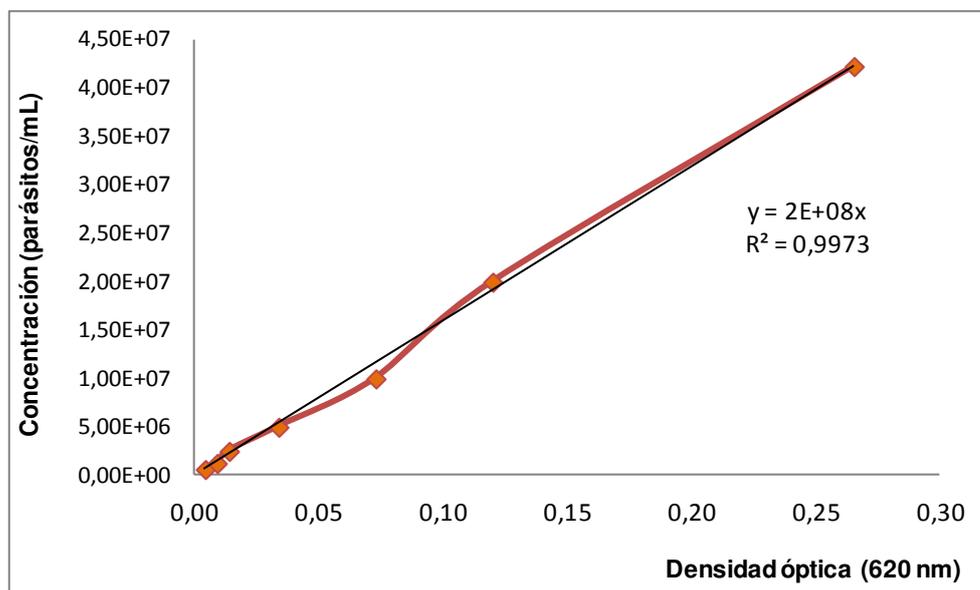
Los parásitos de la forma sanguínea fueron cultivados en medio HMI-11 durante 24 horas hasta alcanzar una densidad de 5×10^5 parásitos/ml y se colocaron alícuotas de 100 μl en placas de 96 pocillos estériles. Los inhibidores de PARP fueron incubados durante 24 horas a las concentraciones indicadas en las figuras. Transcurrido este tiempo, se procedió al recuento de parásitos con cámara de Neubauer.

En todos los experimentos, las condiciones fueron ensayadas por triplicado. La significancia de los resultados fue analizada con el programa GraphPad Prism versión 5.03 para Windows (GraphPad Software).

Determinación de la concentración de parásitos procíclicos por densidad óptica a 620 nm

Para poder analizar un número de muestras grandes, se utilizó como medida de la concentración de parásitos la DO a 620 nm. Se realizó una curva de concentraciones crecientes de parásitos, se contaron en una cámara de Neubauer y

se determinó que existe una correlación lineal entre el número de parásitos y la DO a 620 nm en el rango de 1×10^6 a 4×10^7 parásitos/ml.



EFFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂) EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR DE PARÁSITOS PROCÍCLICOS

La supervivencia celular fue determinada mediante la incubación de 500 μ l de 1×10^6 parásitos/ml del cultivo en placas de 24 pocillos (Cellstar) con diferentes concentraciones de H₂O₂ (30 μ M, 95 μ M, 300 μ M y 950 μ M) durante 6 horas. Finalizado este tiempo, el número de parásitos totales y de parásitos móviles fue determinado filmando las muestras con el programa TSVIEW de la cámara acoplada al microscopio y contándolos con la ayuda del programa ImageJ. En todos los experimentos, las condiciones fueron ensayadas por triplicado y la significancia de los resultados analizados por ANOVA de dos variables seguido del test de Bonferroni, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.03 para Windows (GraphPad Software).

Los cultivos de procíclicos “*wild type*” fueron incubados con 29 nM de Olaparib durante 30 minutos para medir la supervivencia celular respecto al cultivo control, sin el inhibidor de PARP añadido. La adición de DMSO a la misma concentración que está presente en el inhibidor Olaparib no mostró ninguna diferencia en comparación con el cultivo control.

Los cultivos de procíclicos transgénicos ARNi-PARP (p2T7-PARP), ARNi-PARG (p2T7-PARG) y sobre-expresantes de PARP (p2216-PARP) fueron inducidos durante

3 días con tetraciclina (1 µg/ml) y expuestos a distintas concentraciones de H₂O₂. La supervivencia celular fue comparada con la de los cultivos no inducidos.

SÍNTESIS DEL POLÍMERO EN RESPUESTA AL DAÑO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂) EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS

Así como se evaluó la supervivencia celular, también se analizó la síntesis del polímero en respuesta al tratamiento con H₂O₂. Los parásitos fueron expuestos a 1 mM de H₂O₂ durante 10 min en medio de cultivo. Las células se recogieron a diferentes intervalos de tiempo y los extractos proteicos fueron obtenidos como se señala en la sección de “Extractos proteicos” del apartado “Proteínas: metodologías”. El contenido proteico se cuantificó por el método de Bradford y se analizó por Western-blot utilizando 40 µg de proteínas totales.

La inmuno-detección del polímero se llevó a cabo utilizando el anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra PAR (BD) a una dilución de 1:5.000, seguido del anticuerpo anti-conejo conjugado a la peroxidasa de rábano picante 1:5.000 (PerkinElmer). El anticuerpo α-tubulina (Sigma) fue utilizado como control de carga a una dilución 1:10.000.

SINCRONIZACIÓN DE PARÁSITOS PROCÍCLICOS

Sincronización

Para la sincronización se siguió el procedimiento descrito por Chowdhury (Chowdhury, Zhao et al. 2008). Un cultivo de parásitos procíclicos de 10 ml fue incubado durante 12 horas a 28°C (5x10⁶ células/ml) en medio de cultivo con 0,2 mM de Hidroxiurea (HU). Tras la remoción de la HU por centrifugación (1.200 g, 10 min), las células fueron lavadas dos veces con medio de cultivo. Tras su desarresto, el cultivo sincronizado continuó creciendo durante 12 horas. Para evaluar la sincronía del mismo, las células fueron fijadas cada 1 ó 2 horas, teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo (FACS). La estructura del parásito también fue evaluada por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.

MARCADO DE CÉLULAS CON IODURO DE PROPIDIO Y CITOMETRÍA DE FLUJO

El seguimiento de la progresión del ciclo celular en cultivos de parásitos sincronizados fue realizado mediante la tinción con ioduro de propidio (colorante

fluorescente que se intercala en el ADN) seguido por citometría de flujo (FACS). La intensidad de la fluorescencia es proporcional al contenido de ADN de la célula. También se evaluó la proporción de parásitos en cada fase del ciclo celular en cultivos normales (no sincronizados).

Fijación

La muestra de células (1 ml) fue centrifugada a 7.000 rpm durante 5 min, lavada (1 ml) y resuspendida en 200 µl de una solución PBS 1X- 2 mM EDTA. A continuación, la misma fue añadida a un eppendorf que contenía 1 ml de Etanol 70 % frío. Las células fijadas se almacenaron durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron (13.000 rpm, 4°C, 10 min) y resuspendieron en 1 ml de PBS. Se las almacenó luego a 4°C hasta el paso de marcación.

Marcación

La marcación se realizó el mismo día que se pasaron las muestras por el citómetro. Tras centrifugar las células (13.000 rpm, 4°C, 10 min), las mismas fueron resuspendidas en 0,3 ml de solución de tinción (PBS 1X- 2 mM EDTA, RNAsa 200 µg/ml, Ioduro de Propidio 50 µg/ml) e incubadas durante 30 min a 37°C al abrigo de la luz. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de las suspensiones por citometría de flujo (IP) en un cell sorter (FACS Canto II, BD Pharmigen).

Análisis de los resultados

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Cyflogic v 1.2.1. Primero se creó un dot plot de FSC-A vs SSC-A (gate 1) para descartar los restos celulares. Con la población elegida del primer gate, se realizó un segundo dot plot de PI-W vs PI-A (gate 2) para descartar los agregados celulares. A partir de la población seleccionada por el segundo gate se construyó el histograma de PI-A con el fin de analizar el ciclo celular.

ENSAYO DE ANNEXINA V/IODURO DE PROPIDIO

El ensayo de marcación diferencial con Annexina V/Ioduro de propidio permite distinguir entre las células viables de aquellas que entraron en un proceso de apoptosis o necrosis. Las células apoptóticas exponen en la cara externa de su membrana plasmática al fosfolípido fosfatidilseina (PS), el cual en condiciones normales se encuentra en la cara interna de la bicapa lipídica. Dado que este ensayo

se realiza sobre células no fijadas, el ioduro de propidio solo será incorporado en células necróticas, las cuales tienen la integridad de la membrana comprometida.

El tipo de muerte celular se evaluó a diferentes intervalos de tiempo luego del tratamiento con 1 mM de H₂O₂ con el Kit FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I (BD Pharmingen), seguido del análisis por citometría de flujo (FACS Canto II, BD Pharmingen). Como control positivo de apoptosis (Welburn, Barcinski et al. 1997) (Welburn, Dale et al. 1996) los cultivos se incubaron durante 6 y 12 horas con 10 µg/ml de Concanavalina A tipo IV (Sigma-Aldrich). Los resultados se analizaron con el software Cyflogic v 1.2.1.

A NEXO

ANEXO

Tabla 1. Inhibidores de PARP probados.

No.	Nombre del compuesto (IUPAC)	Acronyms	Supplier
1	3-aminobenzamida	3AB	Alexis Biochemicals
2	Benzamida		Alexis Biochemicals
3	2-[(2R)-2-metilpirrolidin-2-yl]-1H-1,3-benzodiazol-4-carboxamida	Veliparib ABT-888	Alexis Biochemicals
4	5-amino-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona	5-aminoisoquinolinona 5-AIQ	Alexis Biochemicals
5	5-amino-3-metil-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona	3-metil-5-aminoisoquinolinona 3-metil-5-AIQ	Alexis Biochemicals
6	8-amino-3-azatriciclo[7.3.1.0 [^] (Abazov, Abbott et al. 2009)]trideca-1(12),5,7,9(13),10-pentaen-2,4-diona	4-amino-1,8-naftalimida 4-ANI	Alexis Biochemicals
7	5-[4-(piperidin-1-il)butoxi]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-ona	DPQ	Alexis Biochemicals
8	2-metil-1H,4H,5H,7H,8H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ona	DR2313	Alexis Biochemicals
9	2-(4-{{(2S,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxiolan-2-yl}carbonil}piperazin-1-yl)-N-(1-oxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-yl)acetamida	EB-47	Alexis Biochemicals
10	1,4-dihidroquinazolin-4-ona	4-Hidroxiquinazolina 4-HQN	Alexis Biochemicals
11	6-amino-5-iodo-2H-cromen-2-ona	INH2BP	Alexis Biochemicals
12	5-hidroxi-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona	1,5-Isoquinolinediol DHQ	Alexis Biochemicals
13	(2,4S,4aS,5aR,12aS)-2-[amino(hidroxi)metiliden]-4,7-bis(dimetilamino)-10,11,12a-trihidroxi-1,2,3,4,4a,5,5a,6,12,12a-decahidrotetracen-1,3,12-triona	Minocina Minociclina	Alexis Biochemicals
14	8-hidroxi-2-metil-1,4-dihidroquinazolin-4-ona	NU1025	Alexis Biochemicals
15	5,6-dihidrofenantridin-6-ona	Fenantridinona	Alexis Biochemicals
16	2-(dimetilamino)-N-(6-oxo-5,6-dihidrofenantridin-2-yl)acetamida	PJ-34	Alexis Biochemicals
17	4H,5H-tieno[2,3-c]isoquinolin-5-ona	TIQ-A	Alexis Biochemicals
18	1,7-dimetil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-purin-2,6-diona	Paraxantina 1,7-dimetilxantina	Sigma-Aldrich
19	3-(4-clorofenil)quinoxalin-5-carboxamida	CNQ	Calbiochem
20	4-{{3-[(4-ciclopropancarbonilpiperazin-1-il)carbonil]-4-fluorofenil}metil)-1,2-dihidroftalazin-1-ona	Olaparib KU-0059436 AZD-2281	JS Research Chemicals Trading
21	(4Z)-4-[(1-metil-1H-pirrol-2-il)metiliden]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1,3-diona	BYK204165	Sigma-Aldrich

ANEXO

Tabla 1. Inhibidores de PARP probados.

22	2-[4-(trifluorometil)fenil]-1H,4H,5H,7H,8H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ona	XAV939	Maybridge
23	2-(piridin-2-il)-5H,7H,8H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ol	RF03877	Maybridge
24	2-ciclopropil-5H,7H,8H-tiopirano[4,3-d]pirimidin-4-ol	RF03876	Maybridge
25	4-[(1R,2S,6R,7S)-3,5-dioxo-4-azatriciclo[5.2.1.0 ^{2,6}]dec-8-en-4-il]-N-(quinolin-8-il)benzamida	IWR-1	Sigma-Aldrich
26	N-(6-metil-1,3-benzotiazol-2-il)-2-({4-oxo-3-fenil-3H,4H,6H,7H-tieno[3,2-d]pirimidin-2-il)sulfanil)acetamida	IWP-2	Sigma-Aldrich
27	4-iodo-3-nitrobenzamida	Iniparib BSI-201	Selleck Biochemicals
28	6-fluoro-2-{4-[(metilamino)metil]fenil}-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0 ^{4,13}]trideca-1,4(13),5,7-tetraen-9-ona	Rucaparib	Selleck Biochemicals
29	1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-5-il benzoato	UPF1035	Alexis Biochemicals
30	5-(2-oxo-2-feniletoksi)-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona	UPF1069	Alexis Biochemicals
31	2-fenil-4H-cromuro-4-ona	Flavona	Sigma-Aldrich

R RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIONES

TbPARP Y TbPARG EN *Trypanosoma brucei*

ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y EXPRESIÓN *IN VIVO* DE TbPARP Y TbPARG

El análisis bioinformático, detallado en la introducción, señaló que en *Trypanosoma brucei* las enzimas TbPARP y TbPARG estarían codificadas por un gen de copia única. Dichas predicciones fueron verificadas por ensayos de Southern blot, utilizando ADN genómico extraído de la cepa 29-13 de procíclicos de *T. brucei*.

Para determinar la organización genómica de TbPARP se utilizó una sonda correspondiente al fragmento comprendido entre las bases 582 y 1722 (1140 nucleótidos) de la región codificante de este gen. Dicho fragmento contiene los dominios catalítico y regulatorio, y parte del dominio WGR. La presencia de una única banda reactiva en el ADN digerido con enzimas de restricción que cortan por fuera de la región que hibrida la sonda (HindIII, BamHI, NcoI, SacII y XhoI) demostró que el gen *parp* está presente en una sola copia en el genoma de *T. brucei* (Fig. 1).

En el caso de TbPARG, las enzimas de restricción utilizadas tampoco cortan al ADN genómico dentro de la zona complementaria a la sonda (BamHI, SacI, XbaI y XhoI), por lo que la existencia de una sola banda en el Southern blot demostró que este gen también está presente como única copia en el genoma de este tripanosomátido. Debido a que la sonda consiste en 1047 nucleótidos correspondientes al dominio catalítico (entre las bases 104 y 1150), también es posible aseverar que TbPARG es la única representante de la familia PARG (Fig. 2).

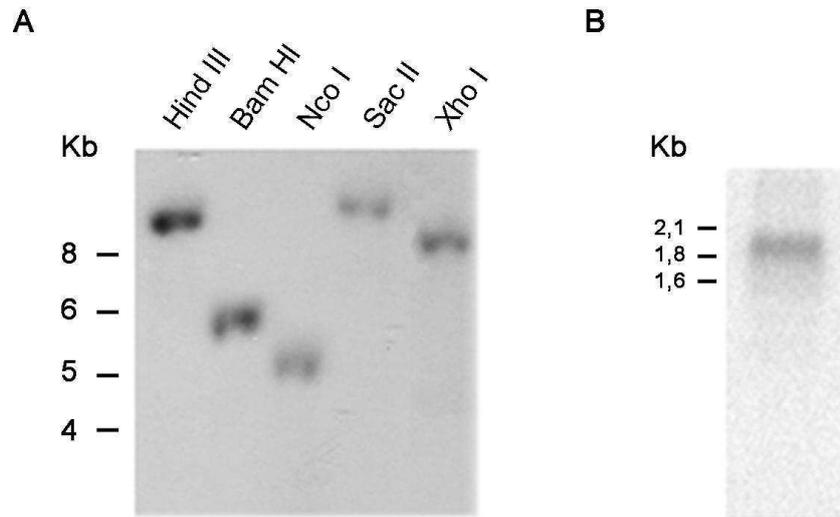


Figura 1. Southern blot y Northern blot de TbPARP sobre ADN genómico y ARN total de *Trypanosoma brucei* procíclico 29-13. **A.** ADN genómico de *T. brucei* (5 μ g) se digirió con las enzimas de restricción indicadas, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda correspondiente al fragmento entre las bases 582 y 1722 de la región codificante de TbPARP. Todas las enzimas cortan fuera de la región complementaria a la sonda. **B.** Northern blot. ARN total de procíclicos de *T. brucei* (30 μ g) se separó en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda correspondiente al fragmento entre las bases 1030 y 1445 de la región codificante de TbPARP. A la izquierda se indican las posiciones de los ARN ribosomales.

Por otro lado, los ensayos de Northern blot llevados a cabo a partir de ARN total de procíclicos de *T. brucei* confirmaron que ambos genes se encuentran activos en este estadio del parásito. La transcripción de TbPARP fue corroborada con la sonda constituida por el fragmento entre las bases 1030 y 1445 de la región codificante de TbPARP (Fig. 1); mientras que la transcripción del gen de TbPARG fue evidenciada con la misma sonda que la utilizada para el ensayo de Southern blot (Fig. 2). Las dos proteínas presentaron un único ARNm, por lo que se descarta la existencia de isoformas.

Finalmente, la expresión de ambas enzimas fue evaluada por la técnica de Western blot sobre extractos proteicos totales de parásitos procíclicos y sanguíneos (Fig. 3). El peso molecular teórico de la proteína TbPARP es de 65 kDa, según las predicciones efectuadas con el programa ProtParam. Sin embargo, anticuerpos producidos específicamente contra esta enzima a partir de un péptido antigénico del

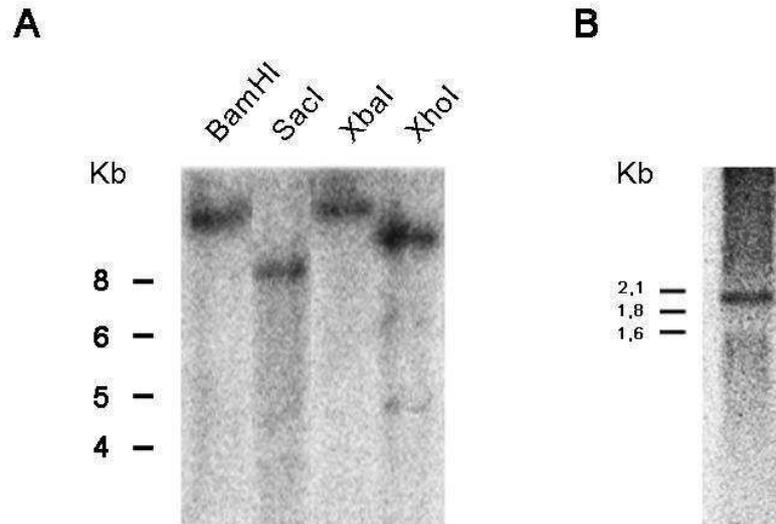


Figura 2. Southern blot y Northern blot de TbPARG sobre ADN genómico y ARN total de *Trypanosoma brucei* procíclico 29-13. **A.** ADN genómico de *T. brucei* (5 µg) se digirió con las enzimas de restricción indicadas, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda correspondiente al fragmento entre las bases 104 y 1150 de la región codificante de TbPARG. Todas las enzimas cortan fuera de la región complementaria a la sonda. **B.** Northern blot. ARN total de procíclicos de *T. brucei* (30 µg) se separó en geles desnaturizantes de agarosa-formaldehído, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con la misma sonda que la utilizada para el Southern blot. A la izquierda se indican las posiciones de los ARN ribosomales.

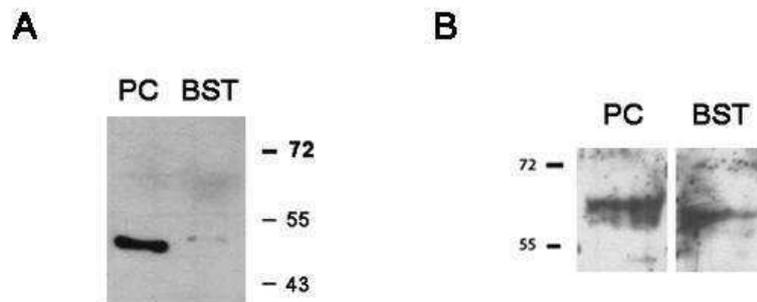


Figura 3. Western blot de TbPARP y TbPARG sobre extractos proteicos totales de *Trypanosoma brucei* procíclicos 29-13 y sanguíneos 90-13. Extractos de proteínas totales (40 µg) de procíclicos (PC) y sanguíneos (BST) fueron resueltos en SDS-PAGE 10% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con **A.** anticuerpos primarios anti-TbPARP (GenScript) y anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados a HRP; o **B.** anticuerpos primarios anti-TcPARG (producidos en el laboratorio) y anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados a HRP.

dominio catalítico permitieron identificar una banda de menor peso molecular al esperado (de alrededor 53 kDa) en los dos estadios del parásito. Este tamaño concuerda con el de la proteína TbPARP sin el extremo amino-terminal; es decir, con los dominios WGR, regulatorio y catalítico (desde el aminoácido 108 en adelante). Aún permanece sin esclarecer si esta forma clivada de la proteína corresponde a un estado fisiológico o es simplemente un artefacto de la técnica, ya que la proteólisis de PARP ha sido reportada en numerosas ocasiones (Zahradka and Ebisuzaki 1984; Kaufmann 1989; Podesta, Garcia-Herreros et al. 2004)(Podesta, Garcia-Herreros et al. 2004)(Kofler, Wallraff et al. 1993). Sin embargo, la detección de una banda con el peso molecular esperado sobre extractos de cultivos bacterianos que expresaban la proteína recombinante (Figura 4) inclinaría la balanza a favor de la primera hipótesis.

Para determinar por Western blot la expresión de TbPARG a nivel proteico se utilizaron anticuerpos obtenidos en ratón a partir de la proteína PARG recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rTcPARG), la cual posee un alto grado de similitud con la ortóloga de *T. brucei*. Los mismos revelaron la existencia de una banda con el peso molecular esperado (60 kDa) en parásitos sanguíneos; mientras que en procíclicos esta banda presentó un tamaño superior al teórico. Este hecho podría deberse a una modificación post-traducciona l de la enzima, teniendo en cuenta que TbPARG presenta un único ARNm (Fig. 2). Dicha modificación post-traducciona l sería una modificación regulatoria más que fisiológica ya que, aunque no de manera totalmente concluyente, el Western blot parecería mostrar una segunda banda minoritaria del peso molecular esperado. El análisis *in silico* de la proteína hPARG permitió identificar sitios putativos de fosforilación en la región N-terminal de la proteína (Gagne, Moreel et al. 2009) mientras que la fosforilación endógena de hPARG ha sido reportada exclusivamente para la S³¹⁶, aunque se desconocen las implicancias regulatorias de la misma (Beausoleil, Jedrychowski et al. 2004). Por otro lado, también ha sido evidenciado que la enzima TcPARG presenta un mayor tamaño al esperado en las tres formas de *T. cruzi* (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013) (incluso el estadio epimastigote también presenta múltiples bandas), de forma similar a lo observado para la proteína TbPARG en *T. brucei*.

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE TbPARP

EXPRESIÓN *IN VITRO* Y PURIFICACIÓN DE LA TbPARP RECOMBINANTE

Tras haber podido comprobar que la expresión de la enzima TbPARP tiene lugar en los dos estadios del ciclo de vida de *T. brucei*, el siguiente paso fue estudiar si la misma presentaba actividad catalítica y sus requerimientos para llevar a cabo la reacción. Para ello, se optó por expresar a la proteína recombinante (rTbPARP) en un sistema heterólogo.

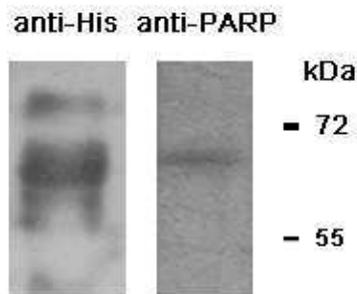


Figura 4. Expresión de rTbPARP en un sistema bacteriano. Extractos crudos (40 μ g de proteínas totales) de bacterias transformadas con el vector p22b⁺-TbPARP e inducidas con 200 μ M de IPTG durante 4 hs a 28 °C, fueron resueltos en SDS-PAGE 10% y transferidos a membrana de PVDF. Los Western blot fueron revelados con anticuerpos anti-His (izquierda) o anticuerpos específicos de TbPARP, GenScript (derecha).

El gen *PARP* fue subclonado en el vector de expresión pET-22b⁺, el cual genera la proteína fusionada a 6 histidinas (His6x) en su extremo carboxilo terminal. Bacterias de la cepa BL21-CodonPlus de *E. coli* fueron transformadas con esta construcción y la expresión de rTbPARP inducida con 200 μ M de IPTG durante 4 horas a 28 °C. La presencia de la proteína recombinante en el extracto bacteriano fue comprobada mediante ensayos de Western blot revelados con anticuerpos dirigidos contra la secuencia de histidinas y con anticuerpos específicos de TbPARP (Fig. 4). En ambos casos se observó una banda de peso molecular similar al esperado (66 kDa). El anticuerpo anti-His detectó además otras bandas de menor intensidad, probablemente de manera inespecífica ya que éstas no están presentes en el Western blot revelado con el anticuerpo anti-TbPARP.

Debido a que la caracterización bioquímica de una proteína requiere de grandes cantidades de la misma en la fracción soluble del extracto, fue necesario hacer más eficiente la producción de rTbPARP. Basándonos en la experiencia de nuestros colaboradores en Finlandia, se transformó la cepa Rosetta2(DE3) de *E. coli* con la misma construcción (pET-22b⁺-TbPARP) y se indujo la expresión de la enzima recombinante incubando a las bacterias durante toda la noche a 28 °C en un medio de

cultivo de auto-inducción. Mediante este método se obtuvieron mayores rendimientos del polipéptido en el sobrenadante y se acortaron los tiempos de producción.

La purificación de rTbPARP con el *tag* de histidinas se realizó de manera automatizada con la implementación del sistema Äkta Purifier (GE Healthcare). En un primer paso la enzima se purificó mediante cromatografía de pseudo-afinidad utilizando una resina de Ni⁺-agarosa, la cual retiene aquellas proteínas con abundancia de histidinas en su secuencia. En una segunda instancia la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular con una columna Superdex 200 y los perfiles de elución se muestran en la figura 5A. Las fracciones obtenidas en cada paso se analizaron además por SDS-PAGE (Fig. 5B).

Tras el paso final de purificación por cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron cuatro especies diferentes (Fig. 5A). El primer pico corresponde a especies de muy alto peso molecular y la ausencia de bandas en el SDS-PAGE demostró que se trata de agregados azarosos; razón por la cual esta fracción fue descartada para análisis posteriores. El segundo pico concuerda con especies de 250 kDa, las cuales coincidirían con la forma tetramérica de la proteína ya que la banda presente en el gel desnaturalizante se corresponde con el tamaño esperado para rTbPARP (66 kDa). Lo mismo se observó para las especies del tercer pico, cuyo peso molecular de 120 kDa podría ser explicado por la presencia de dímeros. Finalmente, el cuarto pico corresponde a especies de 65 kDa, que es el tamaño monomérico de rTbPARP; sin embargo, en el SDS-PAGE se evidenciaron múltiples bandas de menor peso molecular.

Estas observaciones indicarían que rTbPARP es capaz de oligomerizarse, de manera similar a lo reportado para PARPs de eucariotas superiores (Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez 1993; Ame, Spenlehauer et al. 2004; Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez 2004) y para la enzima ortóloga de *T. cruzi*. Además, la forma monomérica de la enzima sería susceptible a sufrir proteólisis, al menos en las condiciones aquí ensayadas.

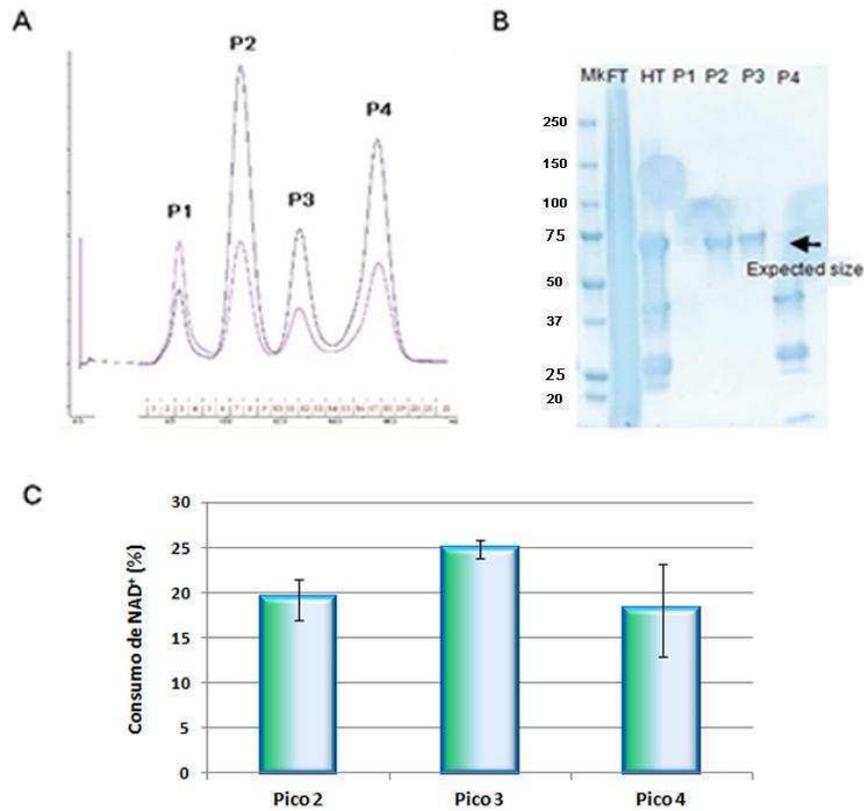


Figura 5. Purificación de rTbPARP y medición de la actividad. A. Cromatografía de exclusión molecular. Perfiles de absorbancia UV (280 nm-azul y 260 nm- rojo) en función de la fracción de elución. **B.** SDS-PAGE (4-20%) de las fracciones proteicas obtenidas en cada paso de purificación. (MK: marcador de peso molecular; FT: fracción total; HT: fracción obtenida por cromatografía de pseudo-afinidad en columna de Ni⁺-agarosa y P1-4: fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en cada uno de los picos). **C.** Ensayo de actividad (NAD⁺ 700 nM, ADN activado 1,5 μM, buffer Tris 50 mM pH 8 + 1,7% PEG 800) de las fracciones P2-4. Todos los puntos fueron obtenidos por triplicado y el gráfico muestra la media y la desviación estándar.

La actividad ADP-ribosil transferasa de las especies obtenidas en las fracciones de los picos 2, 3 y 4 de la columna de exclusión molecular fue medida mediante un ensayo fluorométrico en microplaca. Si bien las tres muestras presentaron escasa actividad debido a que dicha técnica no había sido optimizada aún, la mayor magnitud de consumo del sustrato NAD⁺ se obtuvo con aquella correspondiente a la enzima dimérica (Fig. 5C). Esto sugeriría que la proteína rTbPARP sería más activa como dímero. Estudios anteriores indicaron que hPARP-1 se une al ADN como dímero, siendo esta dimerización un paso crítico en la activación de la proteína (Langelier, Ruhl et al. 2010).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*

Las poli(ADP-ribosa) polimerasas (PARPs) transfieren residuos de ADP-ribosa presentes en el sustrato NAD^+ a una proteína aceptora o a la cadena del polímero en elongación (PAR); siendo su actividad dependiente de la presencia de rupturas en el ADN. Además, muchas de estas enzimas tienen la capacidad de auto-parilarse. Para evaluar la actividad de rTbPARP se optimizó un ensayo fluorométrico que ya había sido descrito para la proteína hPARP-1 (Putt and Hergenrother 2004) y que también fue adaptado para medir la actividad de la PARP de *T. cruzi* (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012). Este método se basa en la conversión del NAD^+ remanente en un derivado fluorescente, midiéndose el consumo de este sustrato de forma indirecta.

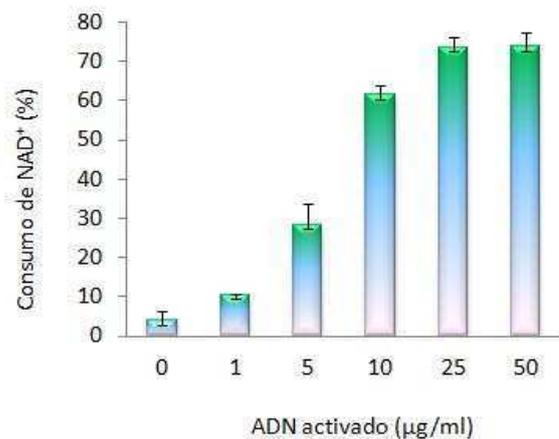


Figura 6. Actividad *in vitro* de rTbPARP en función de la concentración de ADN activado. El ensayo de actividad se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. La mezcla de reacción consistió en NAD^+ 500 nM, buffer Tris 50 mM pH 8 y rTbPARP 10 nM. Las concentraciones de ADN activado se indican en el gráfico. Todos los puntos fueron obtenidos por triplicado y el gráfico muestra la media y la desviación estándar.

Resulta llamativo que la TbPARP recombinante posea capacidad de responder a la presencia de ácidos desoxirribonucleicos mellados, ya que carece de los dominios canónicos para el reconocimiento de este tipo de macromoléculas. Se cree que el dominio WGR podría cumplir una función de unión al ADN cerca del extremo 5' (Langelier, Riccio et al. 2014), y por lo tanto podría ser el responsable de la señal de activación en la enzima de *T. brucei*. Otra posibilidad es que la encargada de participar en la interacción con el ADN sea la región del extremo N-terminal, muy rica en aminoácidos básicos (el 28% de los primeros 90 aa son básicos). Esta zona con una alta tasa de aminoácidos básicos también ha sido descrita para la PARP-2 murina (27% de los primeros 64 aa) y para la PARP-3 humana (20% de los primeros 54 aa);

enzimas que tampoco contienen los dominios clásicos de unión al ADN. De cualquier manera, este experimento prueba que TbPARP es altamente activada por ADN mellado, lo que está en sintonía con los estudios previamente realizados en *C. fasciculata* (Podesta, Garcia-Herreros et al. 2004) y *T. cruzi* (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008); así como también con el comportamiento reportado para hPARP-1 y 2 (Ame, Spenlehauer et al. 2004).

La enzima rTbPARP purificada se incubó en presencia de 500 nM de NAD⁺, ADN mellado (activado) y buffer de reacción en una placa de 96 wells durante 1 hora a 25°C, y se determinó el consumo de NAD⁺ por la disminución de la fluorescencia como fue descrito en materiales y métodos. Vale aclarar que todos los ensayos de actividad *in vitro* se llevaron a cabo con la tercera fracción eluída de la columna de exclusión molecular, debido a que ésta demostró ser la más activa (Fig. 5C).

El primer paso en la optimización del ensayo de actividad *in vitro* fue evaluar el efecto de la presencia de ADN activado en la mezcla de reacción (NAD⁺ 500 nM, buffer Tris-HCl 50 mM pH8 y rTbPARP 10 nM). Como se ilustra en la figura 6, rTbPARP requiere de este modulador para llevar a cabo su actividad ADP-ribosil transferasa. Más aún, la magnitud de la reacción de poli(ADP-ribosil)ación es directamente proporcional a la concentración de ADN activado, alcanzándose un máximo a los 25 µg/ml. Esta concentración fue la adoptada para realizar los ensayos subsiguientes.

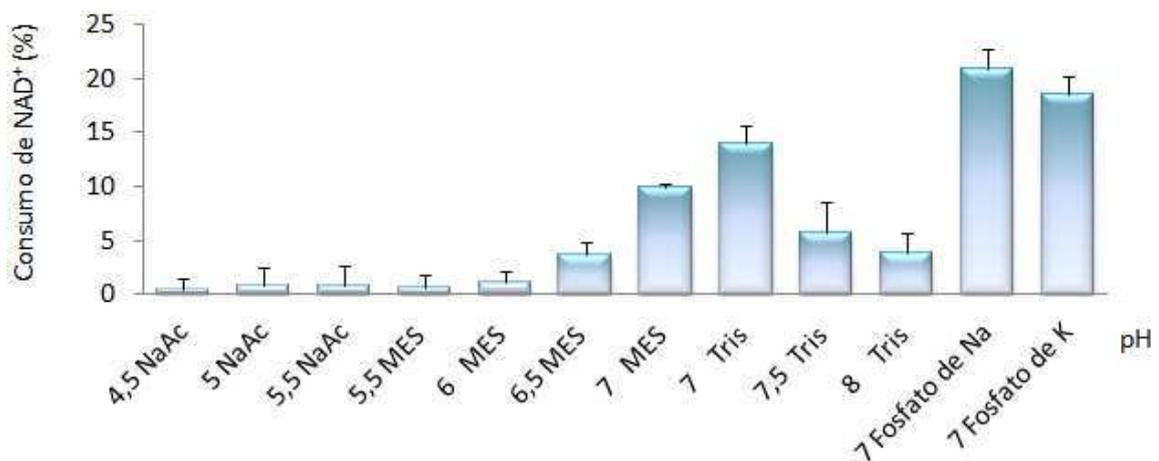


Figura 7. Actividad *in vitro* de rTbPARP en función del pH y distintos buffers. El ensayo de actividad se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. La mezcla de reacción consistió en NAD⁺ 500 nM, ADN activado 25 µg/ml, rTbPARP 10 nM y los buffers indicados en el gráfico (50 mM en cada caso). Todos los puntos fueron obtenidos por triplicado y el gráfico muestra la media y la desviación estándar.

A continuación se testearon agentes buffers a distintos pH. Se evidenció que éstos tienen un gran impacto sobre la reacción enzimática llevada adelante por rTbPARP (Fig. 7). La actividad óptima se obtuvo con los buffers de fosfato de sodio y potasio a pH 7.

Por otro lado, se sabe que la enzima hPARP-1 y otras PARPs relacionadas utilizan el catión Mg^{2+} como cofactor, característica que es compartida por muchas proteínas que interaccionan con ácidos nucleicos (Okayama, Edson et al. 1977; Yoshihara, Hashida et al. 1978; Ushiro, Yokoyama et al. 1987). Se prosiguió entonces a evaluar la dependencia de la actividad *in vitro* de rTbPARP sobre un pequeño grupo de cationes divalentes (Fig. 8A). En la mayoría de los casos se evidenció un efecto detrimental para la reacción de poli(ADP-ribosil)ación, presentando el Ca^{2+} el mayor grado de inhibición. La inhibición causada por la presencia de Zn^{2+} y Ni^{2+} podría deberse a la capacidad que poseen estos metales de unirse a grupos sulfhidrilos esenciales (Petzold, Booth et al. 1981). El Mg^{2+} , en cambio, produjo un incremento de la actividad dos veces mayor respecto al control.

Sin embargo, las pruebas con agentes estabilizadores mostraron que la adición de BSA es beneficiosa cuando la concentración de proteína es baja (Fig. 8C) y que el agregado de ambos, BSA y Mg^{2+} , no presentó un incremento significativo de la actividad en comparación con el agregado de BSA solo. Más aún, la incubación con el quelante de iones EDTA tampoco afectó la progresión de la reacción, lo que permitió descartar la existencia de trazas de Mg^{2+} que pudieran estar actuando como cofactor (Fig. 8B). De este modo se pudo corroborar que rTbPARP no requiere de ningún catión para su actividad ADP-ribosil transferasa, al igual que las PARPs de timo de cordero (Petzold, Booth et al. 1981), *C. fasciculata* (Podesta, Garcia-Herreros et al. 2004) {Podesta, 2004 #337}(Podesta, Garcia-Herreros et al. 2004) y *T. cruzi* (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008).

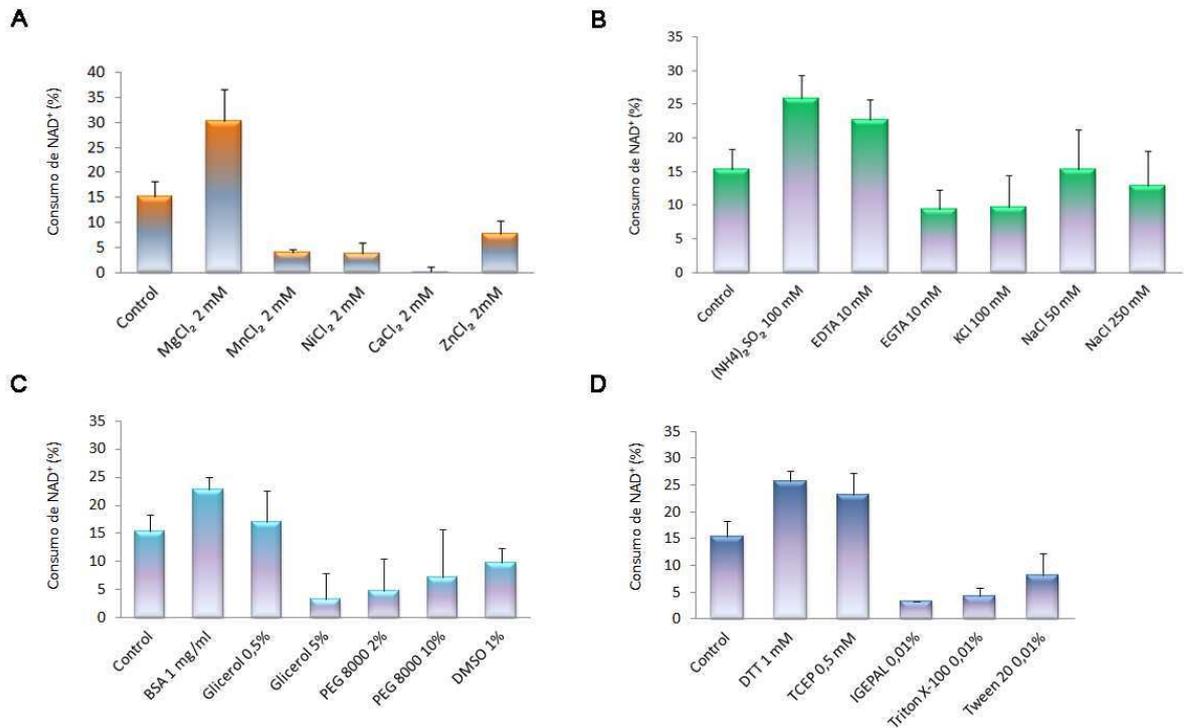


Figura 8. Medición de la actividad *in vitro* de rTbPARP en presencia de distintos compuestos. El ensayo de actividad se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos con la siguiente mezcla de reacción: NAD⁺ 500 nM, ADN activado 25 µg/ml, rTbPARP 10 nM y Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7 50 mM. Todos los puntos fueron obtenidos por triplicado y el gráfico muestra la media y la desviación estándar. **A.** Efecto de cationes divalentes. **B.** Efecto de agentes quelantes y fuerza iónica. **C.** Efecto de agentes estabilizadores. **D.** Efecto de agentes reductores y detergentes.

La evaluación con otros compuestos brindó información adicional acerca de TbPARP. Los detergentes inhibieron la reacción de poli(ADP-ribosil)ación más de un 50%; mientras que los agentes reductores DTT y TCEP, en cambio, estimularon la actividad hasta un 25% (Fig. 8D). Los agentes estabilizadores no tuvieron mayor incidencia sobre la actividad de rTbPARP; a excepción del glicerol 5% y PEG 8000 que resultaron perjudiciales para la reacción. La BSA, como se mencionó anteriormente, ejerció un efecto beneficioso para la actividad de la proteína; posiblemente debido al efecto de “*molecular crowding*”, especialmente importante en enzimas que están presentes en muy bajas concentraciones (Fig. 8C).

Finalmente, se determinó el buffer de reacción para los ensayos de actividad por el método fluorométrico (NAD⁺ 500 nM, 25 µg/mL de ADN activado, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7 100 mM, TCEP 0.5 mM y BSA 1 mg/mL). Tanto la concentración enzimática como el tiempo de incubación se ajustaron de forma tal que

la actividad de las muestras controles fuera alrededor del 25%, lo que permite obtener una señal robusta sin enlentecer la reacción a causa de una merma en la concentración de sustrato.

CINÉTICA ENZIMÁTICA Y CARACTERIZACIÓN DE TbPARP

Con los parámetros puestos a punto, se prosiguió a realizar ensayos de actividad en función de la concentración del sustrato NAD^+ . La cinética de reacción de esta proteína aparentó tener un comportamiento No-Michaeliano respecto al NAD^+ y, tras alcanzar una velocidad máxima, la curva decayó abruptamente (Fig. 9A). Además, a partir de 200 μM de NAD^+ la curva parecería reflejar un comportamiento de cooperatividad positiva del sustrato, aunque para determinar esto será necesario hacer una caracterización más exhaustiva de la cinética de rTbPARP.

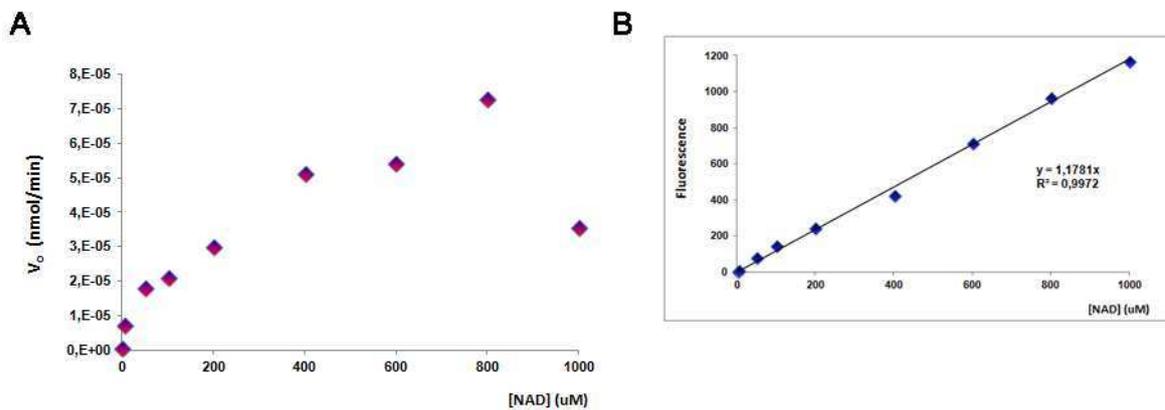


Figura 9. Cinética enzimática de rTbPARP. A. Ensayo de actividad *in vitro* medido por el método fluorométrico (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN activado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 100 mM, TCEP 0.5 mM, BSA 1 mg/mL y rTbPARP 50 nM) en función de distintas concentraciones del sustrato NAD^+ . **B.** Correlación de la fluorescencia vs. la concentración de NAD^+ en la mezcla de reacción.

La disminución de la velocidad a altas concentraciones de NAD^+ podría explicarse por la naturaleza auto-regulatoria de estas proteínas, las cuales poseen la capacidad de inhibir su actividad parilándose a sí mismas; como ya fue demostrado para TcPARP (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008). En efecto, el análisis bioinformático demostró que TbPARP posee un dominio regulatorio (REG) que sería susceptible de ser parilado. Para verificar la modificación por poli(ADP-ribosil)ación sobre la propia rTbPARP se llevó a cabo otro ensayo de actividad enzimática *in vitro*, en el que se utilizó NAD^+ biotinilado como sustrato (Bio NAD^+)

(Fig.10). Esto permitió identificar con estreptavidina conjugada a HRP a la proteína que incorporó ADP-ribosa a partir de Bio NAD⁺ en un ensayo de western-blot o dot-blot. La figura 10A ilustra cómo rTbPARP es capaz de auto-modificarse, a juzgar por la banda presente en el gel correspondiente a la enzima unida al Bio ADP-ribosa. Más aún, la intensidad de esta banda se atenuó cuando la actividad enzimática de rTbPARP fue inhibida por el inhibidor de primera generación 3-AB. Lo mismo fue observado por la técnica de dot-blot (Fig. 10A panel inferior).

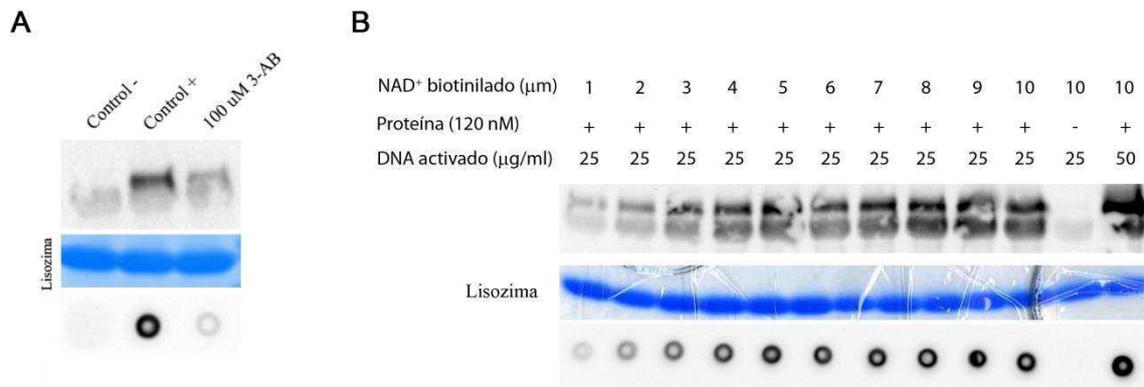


Figura 10. Auto-modificación de rTbPARP. La actividad enzimática se detectó por western y dot-blot con streptavidina conjugada a HRP. La lisozima se usó como control de carga. **A)** En el control negativo la proteína se adicionó en el momento de detener la reacción (rTbPARP 150 nM, ADN activado 25 μ g/mL, Bio NAD⁺ 1 μ m, NAD⁺ 4 μ m y NaH₂PO₄ 100 mM). 3-AB es un inhibidor de TbPARP. **B)** El ensayo de actividad se realizó con concentraciones crecientes de Bio NAD⁺ (1-10 μ m). Además de la establecida, se utilizó una concentración mayor de ADN activado (50 μ g/mL).

También se observó una inhibición de la actividad enzimática de rTbPARP aumentando la concentración del sustrato. A una concentración de proteína dada (120 nM) y concentraciones crecientes de Bio NAD⁺ (1 a 10 μ m), la banda de auto-modificación alcanzó una intensidad máxima a partir de 4 μ m de sustrato (Fig. 10B). Este efecto estaría relacionado con el nivel de actividad de la enzima y no con la saturación de los sitios de auto-modificación, ya que cuando la actividad de esta proteína fue aún más estimulada incrementándose la concentración de ADN activado (de 25 a 50 μ g/ml), la señal de la biotina unida a la proteína se intensificó nuevamente. Este hallazgo está en concordancia con la hipótesis que indica que TbPARP puede auto-regularse modificándose a sí misma.

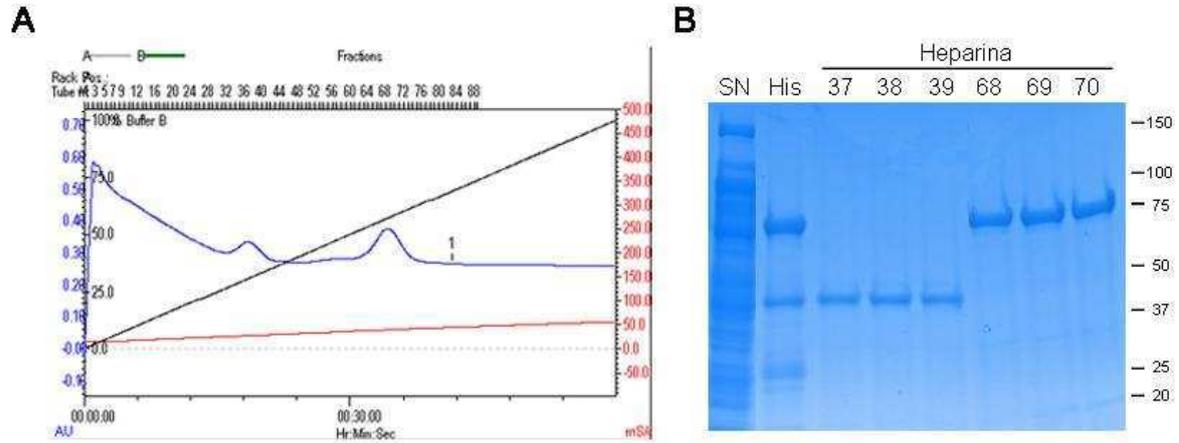


Figura 11. Purificación de rTbPARP por resina de Ni⁺-agarosa y columna de heparina. Para la elución de las proteínas retenidas en la columna de heparina se utilizó un gradiente de NaCl (200 mM - 1 M) y se recolectaron fracciones de 1 mL. **A.** Perfiles de absorbancia UV (280 nm-azul y 260 nm- rojo) en función de la fracción de elución. **B.** SDS-PAGE (4-20%) de las fracciones proteicas obtenidas en cada paso de purificación. (SN: sobrenadante del lisado bacteriano; His: fracción obtenida por cromatografía de pseudo-afinidad en columna de Ni⁺-agarosa; Heparina: fracciones obtenidas por columna de heparina).

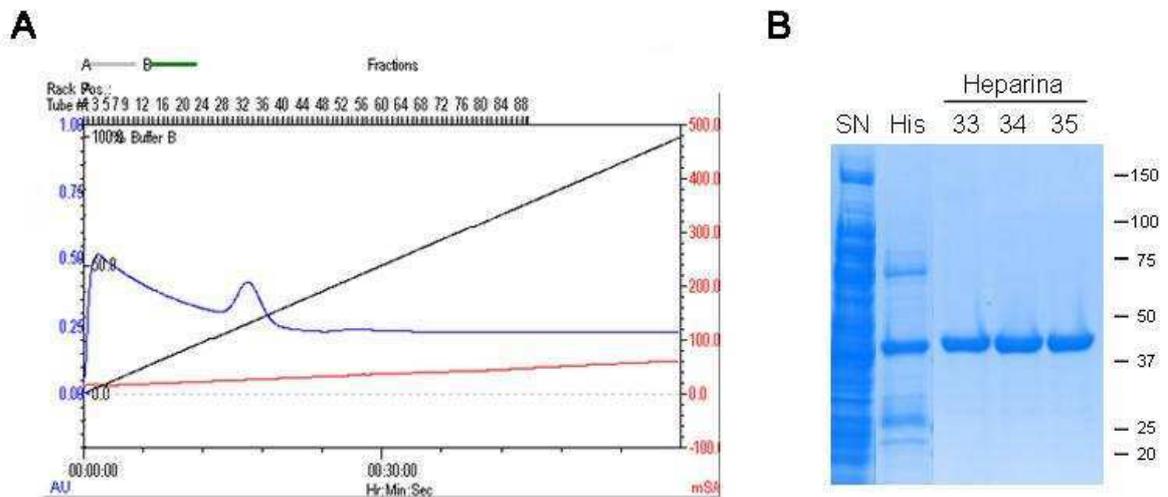


Figura 12. Purificación de rREG-CAT por resina de Ni⁺-agarosa y columna de heparina. Para la elución de las proteínas retenidas en la columna de heparina se utilizó un gradiente de NaCl (200 mM - 1 M) y se recolectaron fracciones de 1 mL. **A.** Perfiles de absorbancia UV (280 nm-azul y 260 nm- rojo) en función de la fracción de elución. **B.** SDS-PAGE (4-20%) de las fracciones proteicas obtenidas en cada paso de purificación. (SN: sobrenadante del lisado bacteriano; His: fracción obtenida por cromatografía de pseudo-afinidad en columna de Ni⁺-agarosa; Heparina: fracciones obtenidas por columna de heparina).

Por otra parte, el análisis bioinformático indicó que el dominio WGR podría cumplir una función de unión a nucleótidos y, por ende, sería el responsable de la señal de activación de esta enzima en *T.brucei*. Además, TbPARP posee una región N-terminal rica en aminoácidos básicos que también podría participar en el reconocimiento de ADN “nickeado” y en la subsiguiente activación enzimática.

Para evaluar si estos dominios están implicados en la unión al ADN se obtuvo una proteína de TbPARP truncada que consta solo de los dominios REG-CAT. Al igual que la proteína entera, esta versión truncada estaba fusionada a 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal (constructo pET-22b⁺ REG-CAT). Las dos enzimas recombinantes se expresaron de la misma forma que en los ensayos anteriores; pero algunas modificaciones fueron introducidas en el proceso de purificación. Con el fin de eliminar el ADN contaminante que pudiera estar co-purificándose con estas proteínas, se llevó a cabo un paso de purificación en columna de Heparina (HiTrap Heparina HP, GE Healthcare Life Sciences). El mismo se realizó luego de la purificación con la resina de Ni⁺-agarosa (cromatografía de pseudo-afinidad) y en reemplazo de la cromatografía por exclusión molecular.

Resumidamente, la estructura y carga negativa de la heparina imita al esqueleto de ADN, lo que provoca que el ácido nucleico unido a las proteínas a purificar sea desplazado por este ligando. De esta manera, solo las proteínas que se unen al ADN permanecerán retenidas a la matriz de la columna, las cuales luego serán eluidas utilizando un gradiente de concentración de NaCl en el buffer de elución.

El perfil de absorbancia UV de la purificación por columna de heparina de la rTbPARP completa presentó dos picos (Fig.11). El análisis por SDS-PAGE indicó que las bandas que correspondían al pico más grande (fracciones 68-70) tenían el peso molecular esperado (65,2 kDa), mientras que el peso molecular de las bandas del pico minoritario (fracciones 37-39) era de alrededor 40 kDa. Estas fracciones corresponderían a la proteína rTbPARP clivada y, curiosamente, su tamaño coincide con el estimado para los dominios REG-CAT.

Por otro lado, el perfil de absorbancia UV de la purificación por columna de heparina de la proteína truncada REG-CAT presentó un único pico (Fig. 12) con un tiempo de retención parecido al de la rTbPARP clivada putativa. Estas fracciones (33-35) presentaron el tamaño esperado (44,4 kDa) en el SDS-PAGE y demostraron ser activas en un ensayo de actividad por fluorescencia, aunque en mucho menor grado que la proteína rTbPARP entera ya que debieron ser incubadas durante más tiempo (2

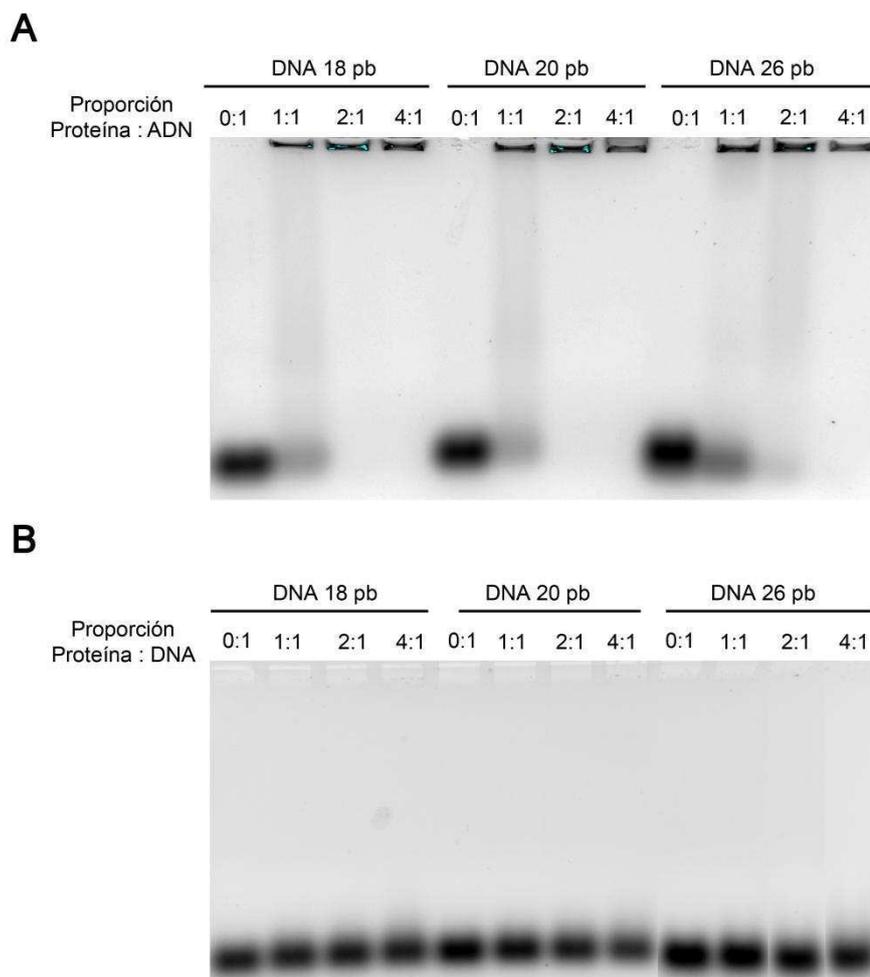


Figura 13. Ensayo de movilidad en gel (EMSA) de rTbPARP y rREG-CAT. Distintos tamaños (18, 20 y 26 pb) de oligonucleótidos doble cadena con extremos romos fueron incubados durante 1 hora y media en hielo con las proteínas recombinantes en diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 4:1) o sin proteína alguna (0:1). Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 0,75% y las bandas corresponden a los oligonucleótidos no unidos a las proteínas. **A.** rTbPARP. **B.** rREG-CAT.

horas) y a una concentración mayor (100-1000 nM); lo que indica que el dominio N-term y/o WGR son importantes para la activación de la enzima.

De esta manera se obtuvieron las proteínas TbPARP y REG-CAT recombinantes sin ADN contaminante, con una Abs_{260/280} entre 0,6 y 0,65. Con el fin de evaluar la unión de ambas enzimas al ácido desoxirribonucleico y determinar la estequiometría de tal interacción, se realizó un ensayo de retardo en gel (EMSA) utilizando distintos tamaños de oligonucleótidos de ADN doble cadena con extremos romos. Éstos fueron incubados con las enzimas en diferentes proporciones y luego corridos en un gel de

agarosa 0,75% (Fig. 13). Con este porcentaje de gel, el complejo oligonucleótido:proteína es demasiado grande para migrar más allá del punto de siembra, y las bandas que se observan pertenecen a los oligonucleótidos libres que no han sido unidos a las enzimas.

Si bien los resultados de este ensayo son preliminares, ya que la estequiometría de la unión entre rTbPARP : ADN debería ser determinada por HPLC en presencia y ausencia de estos oligonucleótidos, aún podemos arriesgar algunas conclusiones. En primer lugar, la rTbPARP efectivamente se uniría al ADN (Fig. 13A). Además, esta interacción parecería ser más eficiente cuando la proporción de enzima:oligonucleótido es de 2:1 y 4:1; brindando evidencia adicional a la hipótesis que reza que TbPARP es dimérica. Con respecto al tamaño de los oligonucleótidos, rTbPARP parecería unirse con mayor facilidad a aquellos que constan de menos pares de base (18 y 20 pb), ya que con el oligonucleótido de 26 pb se observó una banda tenue en la proporción 2:1.

En segundo lugar, se pudo observar que la proteína truncada REG-CAT fracasó en unirse al ADN en todas las proporciones enzima:oligonucleótido ensayadas (Fig. 13B). Esto indica que, tal como fue predicho por el análisis bioinformático, los dominios N-terminal o WGR serían los responsables de la interacción entre TbPARP y el ácido desoxirribonucleico. Lamentablemente no fue posible obtener a la proteína truncada WGR-REG-CAT en el sobrenadante para llevar a cabo estos experimentos, lo que hubiera permitido ir más allá y esclarecer cuál de los dos dominios es el encargado de la unión al ADN.

SCREENING DE INHIBIDORES DE rTbPARP

Parte de la caracterización *in vitro* de una enzima consiste en identificar aquellas moléculas que inhiben su actividad. Para ello se testeó una biblioteca de 31 compuestos, conformada en su mayoría por inhibidores de PARP conocidos (Tabla 1, apéndice) (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012). Estos compuestos fueron analizados a concentraciones de 1 y 10 μM mediante el ensayo de actividad por fluorescencia descrito anteriormente (Fig. 14A). A pesar que esta prueba tolera hasta un 6% de DMSO sin cambios significativos en la actividad enzimática, su concentración fue mantenida por debajo del 1% en todos los experimentos.

Aquellos inhibidores que presentaron valores aparentes de IC_{50} mayores a 1 μM fueron testeados luego a una concentración más baja (100 nM) (Fig. 14B). Además,

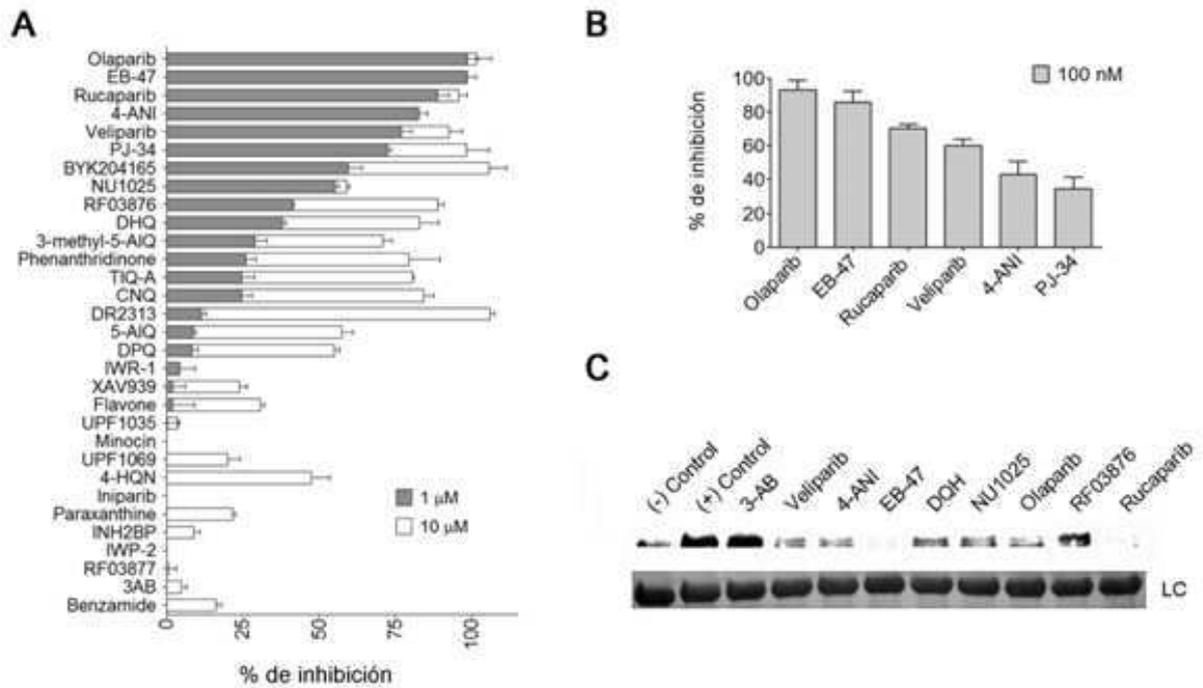


Figura 14. Screening de inhibidores de TbPARP. **A.** Un panel de 31 compuestos fue evaluado por su habilidad de inhibir *in vitro* a TbPARP. Los compuestos fueron adicionados a una concentración de 1 μ M (barras grises) o 10 μ M (barras blancas). La reacción fue iniciada con el agregado de rTbPARP a una concentración final de 2,5 nM y se la dejó proceder durante 40 minutos a 25 °C. Los valores fueron convertidos a % de inhibición en relación con el control de la misma placa. Todos los puntos fueron determinados por triplicado y se expresa el promedio con su desviación estándar. **B.** Los inhibidores más potentes fueron testeados a una concentración de 100 nM. **C.** La inhibición de TbPARP fue confirmada por Western blot utilizando 1 μ M de NAD⁺ biotinilado como sustrato (control +). La TbPARP (120 nM) fue incubada en presencia de 25 μ g/mL de ADN activado y 1 μ M de los compuestos que se indican en la figura. En el control negativo (control -) la enzima se agregó inmediatamente antes de detener la reacción. El PAR biotinilado sintetizado fue detectado con estreptavidina-HRP. Como control de carga (LC) se utilizó lisozima.

estos resultados fueron corroborados por ensayos de Western-blot utilizando NAD⁺ biotinilado (bio NAD⁺) e inhibidores a una concentración de 1 μ M (Fig. 14C).

A continuación, se determinaron experimentalmente los valores de IC₅₀ para los inhibidores más potentes (Tabla 1). Notablemente, muchos de los compuestos reportados como buenos inhibidores de la hPARP-1 no resultaron ser tan efectivos para la rTbPARP. Entre los mejores inhibidores para la enzima del parásito se destacan Olaparib (IC₅₀ 2,9 nM), EB-47 (IC₅₀ 6,5 nM), 4-ANI (IC₅₀ 23 nM), y Veliparib (IC₅₀ 49 nM) (Tabla 1). Los mismos compuestos demostraron ser los inhibidores más potentes para la proteína TcPARP (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012). A su vez,

Tabla 1. Inhibidores más potentes de TbPARP. Los valores de la potencia de los inhibidores de TbPARP son comparados con aquellos reportados para la hPARP-1. Estos valores resultaron del promedio de tres curvas dosis-respuesta ajustadas independientemente.

Compuesto	TbPARP IC ₅₀ [μM]	TbPARP pIC ₅₀ ± SEM	hPARP-1 IC ₅₀ (K _i) [μM]	Referencia
3-AB	58	4.24 ± 0.192	22	(Banasik, Komura et al. 1992)
Veliparib	0.049	7.31 ± 0.073	0.005 (K _i)	(Penning, TD et al. 2009)
4-ANI	0.023	7.64 ± 0.198	0.18	(Banasik, Komura et al. 1992)
EB-47	0.0065	8.19 ± 0.184	0.045	(Jagtap and Szabo 2005)
1,5-Isoquinolinediol	1.2	5.91 ± 0.072	0.39	(Banasik, Komura et al. 1992)
NU1025	0.68	6.17 ± 0.046	0.4	(Griffin, Srinivasan et al. 1998)
PJ-34	0.58	6.23 ± 0.109	0.02	(Jagtap and Szabo 2005)
Olaparib	0.0029	8.53 ± 0.104	0.005	(Menaar, Adcock et al. 2008)
RF03876	1.1	5.94 ± 0.166	-	-
Rucaparib	0.15	6.83 ± 0.032	0.0014 (K _i)	(Thomas, Calabrese et al. 2007)

Rucaparib y PJ-34 mostraron mayor preferencia por hPARP-1; mientras que EB-47 y 4-ANI mostraron una selectividad 10 veces mayor por TbPARP sobre hPARP-1. Previamente fue reportado que ambos compuestos son capaces de inhibir la síntesis de PAR en células humanas (Schlicker, Peschke et al. 1999) (Jagtap, Southan et al. 2004), por lo que EB-47 y 4-ANI podrían ser el punto de partida para el desarrollo de inhibidores de TbPARP más efectivos.

MODELADO POR HOMOLOGÍA Y SELECTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES

En colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Lehtiö profundizamos el estudio de los inhibidores de TbPARP. Para ello, se generó un modelo por homología basado en las estructuras cristalográficas resueltas para las PARPs humanas. Como ya se indicó en la introducción de esta tesis, los dominios regulatorio (REG) y catalítico (CAT) están conservados en las enzimas TbPARP, TcPARP y hPARP1-3; razón por la cual fueron seleccionadas para llevar a cabo el alineamiento de secuencia (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012). Basándonos en este alineamiento y en el modelo por homología pudimos observar que el sitio de unión a NAD⁺ está altamente conservado entre estas proteínas.

Como se muestra en la superposición de la PARP-1 de pollo en complejo con 4-ANI (código de acceso en el PDB 2PAX) y el modelo por homología de la TbPARP, el subsitio de nicotinamida (NI) presenta interacciones que son comunes para la mayoría de los inhibidores de PARP; esto es interacciones puente hidrógeno con Gly863 y Ser904, e interacciones de stacking con Tyr907 (Fig. 15). Sin embargo, también existen algunas diferencias entre el dominio REG de la hPARP-1 y la TbPARP que podrían afectar la unión de los inhibidores de mayor tamaño (que se extienden por fuera del bolsillo NI) como PJ-34 y Rucaparib, los cuales presentan una mayor selectividad por la hPARP-1.

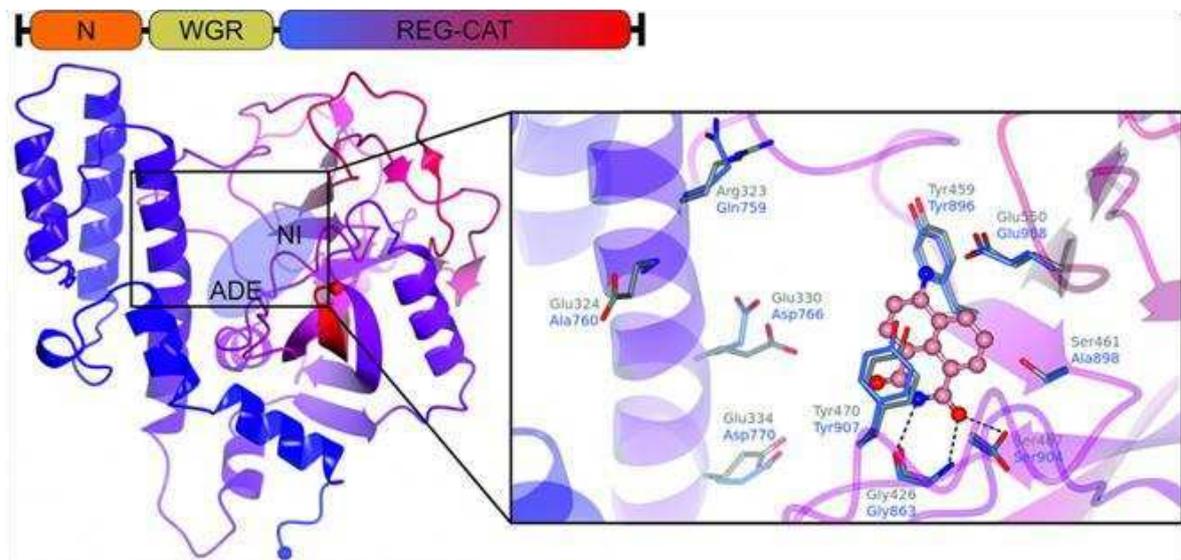


Figura 15. Modelado por homología y modos de unión de los inhibidores. Se muestra la organización de los dominios y el modelo por homología de la región REG-CAT de la TbPARP con los bolsillos de unión a la nicotinamida (NI) y a la adenosina (ADE) del sustrato NAD⁺. En el recuadro se observa la unión de 4-ANI al sitio de unión de la nicotinamida (basado en la superposición de la PARP de pollo, código de PDB 2PAX (Ruf, de Murcia et al. 1998)). Los residuos alrededor del sitio NI y del dominio REG se ilustran para la TbPARP (gris) y la 2PAX (azul, números correspondientes a la hPARP-1).

Rucaparib se une al bolsillo NI de las PARPs (Haikarainen, Narwal et al. 2014) y la menor potencia de este compuesto como inhibidor de TbPARP (150 nM) respecto a TcPARP (25 nM) (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012) y a hPARP-1 (1 nM) podría ser explicada por una diferencia en los aminoácidos, ya que en la enzima de *T. brucei* la alanina conservada es reemplazada por una serina (Ser461). Esto provocaría interacciones desfavorables.

CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE TbPARP

PRODUCCIÓN DE PAR A LO LARGO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Anteriormente se demostró que *Trypanosoma brucei* presenta una proteína TbPARP funcional, cuya actividad fue caracterizada *in vitro*. El objetivo de este apartado es estudiar el comportamiento de esta enzima en el contexto del parásito. La actividad de TbPARP *in vivo* es manifestada mediante la producción de PAR, pudiendo éste ser detectado con anticuerpos específicos.

En primer lugar se evaluó la presencia del polímero en un cultivo de parásitos procíclicos. Para ello se realizó una curva de crecimiento durante aproximadamente dos días y medio (Fig. 16A). La misma comenzó con una concentración de 5×10^5 parásitos/mL y alcanzó una concentración de 2×10^7 parásitos/mL, densidad a la cual estos tripanosomátidos empiezan a estresarse. Durante este tiempo, el análisis por Western blot presentó un patrón conservado de proteínas PARiladas, sobre todo en aquellas de bajo peso molecular (Fig. 16B). También mostró una mayor presencia de marca por encima de la banda de 72 kDa a partir de las 24 horas, señal que aumentó gradualmente hasta las 48 horas. La identificación del conjunto de proteínas pariladas (PARiloma) por inmunoprecipitación y espectrometría de masa podría esclarecer cuáles fueron las proteínas modificadas.

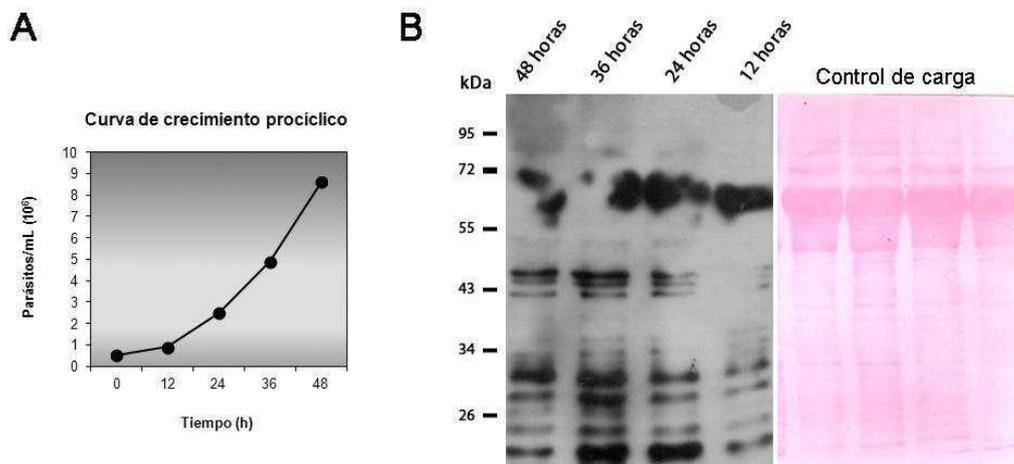


Figura 16. Presencia de PAR a lo largo de la curva de crecimiento. **A.** Curva de crecimiento de parásitos procíclicos de *T. brucei*. **B.** Western blot revelado con anticuerpos anti-PAR. Las muestras de extractos de procíclicos (40 μ g) fueron tomadas a diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento. Para el control de carga la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau.

El incremento de la cantidad de polímero durante la progresión de la curva de crecimiento podría deberse al estrés que sufre el cultivo a medida que aumenta la concentración de parásitos, ya que ésta es una de las causas que activa a TbPARP, como se verá más adelante. Vale aclarar que la mayor parte de los experimentos fueron realizados a una densidad de 5×10^6 células/mL con el fin de que los parásitos se encontraran dentro de la fase logarítmica de crecimiento y, a su vez, no se requiriera manipular grandes volúmenes del cultivo. Será esperable, entonces, observar una cantidad basal de PAR.

CINÉTICA DE LA FORMACIÓN Y DEGRADACIÓN DE PAR

A continuación se probó en parásitos procíclicos de *T. brucei* un modelo para estimular la actividad de PARP, con la consecuente síntesis del polímero. El mismo consistió en exponer a los parásitos durante 10 minutos frente a un agente oxidante como el H_2O_2 el cual provoca, entre otros efectos, rupturas en el ADN. Para evitar que el medio de cultivo interfiriera en la concentración efectiva de este compuesto, el tratamiento fue llevado a cabo en PBS-Glucosa 2%. Si bien las concentraciones de 300 μM y 500 μM indujeron la síntesis de PAR, en los experimentos subsiguientes se decidió utilizar la dosis más alta por producir un efecto más notorio (Fig. 17).

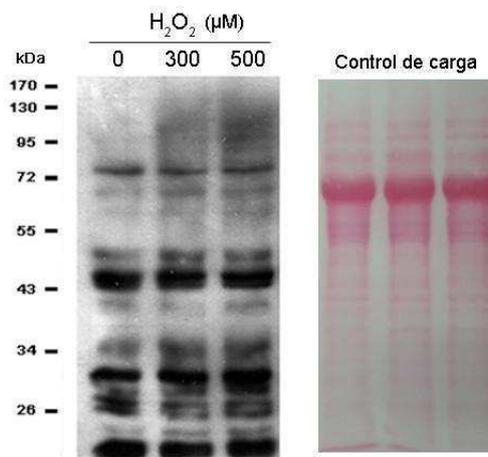


Figura 17. Modelo para estimular la actividad de TbPARP en parásitos procíclicos de *T. brucei*. Western blot de extractos de procíclicos (40 μg) revelado con anticuerpos anti-PAR. Los parásitos fueron expuestos durante 10 minutos a distintas concentraciones de H_2O_2 : 0, 300 y 500 μM en PBS-Glucosa 2%. Como control de carga la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau.

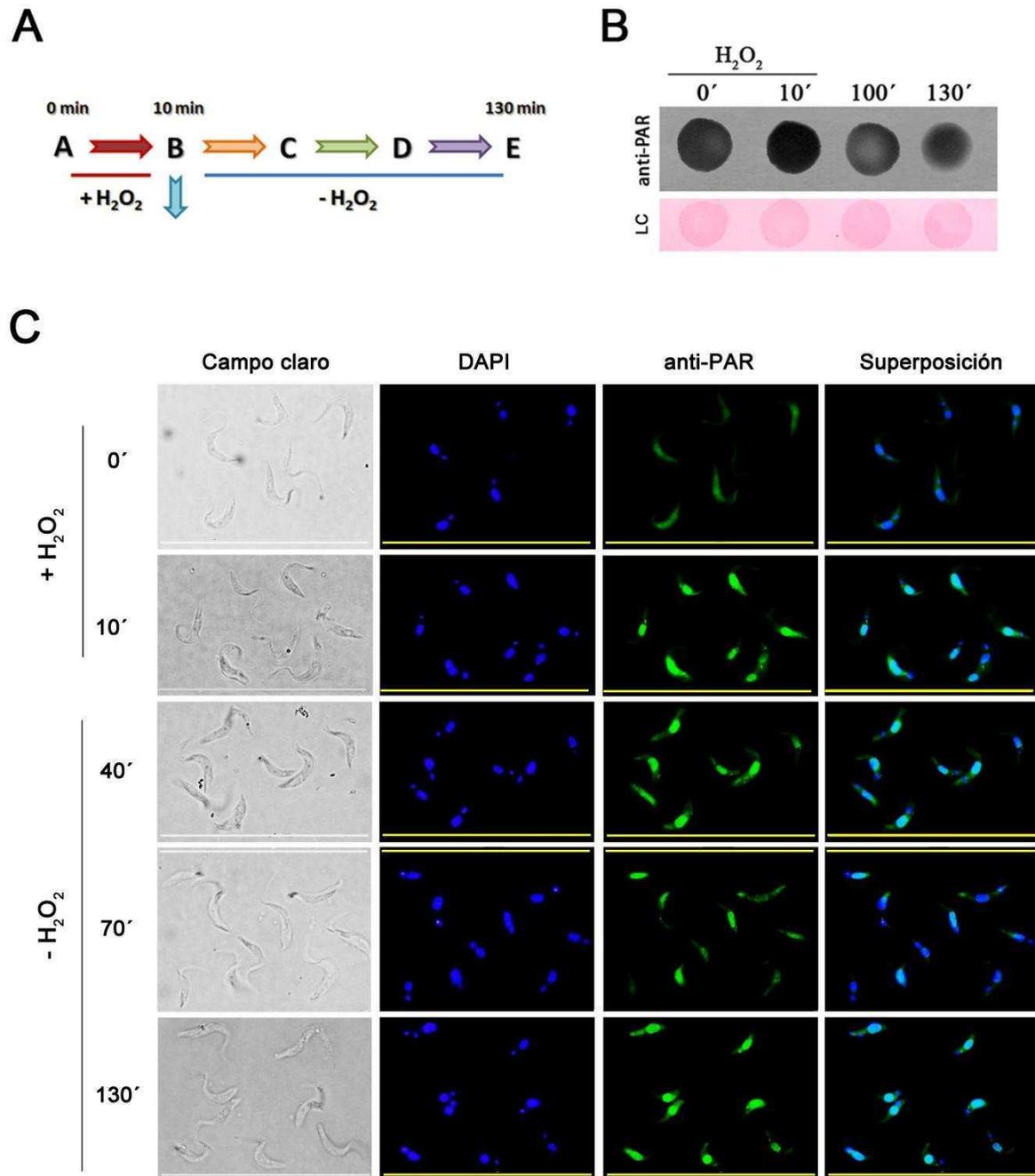


Figura 18. Cinética de PAR en parásitos procíclicos de *T. brucei* tratados con H₂O₂. **A.** Esquema general del modelo de tratamiento con H₂O₂. Los parásitos fueron expuestos a 500 μM de H₂O₂ durante 10 minutos en PBS-Glu 2% y, tras el lavado del agente, se tomaron muestras a distintos tiempos durante la recuperación. **B.** Dot blot revelado con anticuerpos anti-PAR de extractos de parásitos procíclicos (5 μg) que recibieron el tratamiento que se describe en el punto A. Para el control de carga (LC) la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau. **C.** IFI de parásitos procíclicos que recibieron el tratamiento que se describe en el punto A. La localización de PAR se detectó con anticuerpos específicos. El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI. Las barras representan 50 μm.

La estimulación de la actividad de TbPARP por medio del tratamiento con H_2O_2 permitió luego analizar la cinética de la síntesis y degradación de PAR. Para ello se incubó un cultivo de parásitos procíclicos con el agente genotóxico durante 10 minutos y, tras el lavado del mismo, se permitió la recuperación de los tripanosomátidos en medio de cultivo; como está ilustrado en el esquema de la figura 18A. El examen por Dot blot mostró que, a pesar de presentar una cantidad basal de PAR relativamente alta, la señal del polímero aumentó tras los 10 minutos de tratamiento, para luego disminuir a los 90 minutos de la fase de recuperación. Sin embargo, a los 130 minutos la cantidad de PAR se incrementó nuevamente. Una explicación probable para esto radica en que la intensidad del daño genómico fue tan grande que a este organismo no le fue posible restablecer su estado original en el lapso de tiempo ensayado, ya que aún quedarían rupturas en el ADN que continuarían activando a la enzima (Fig. 18B).

Algo similar se observó al analizar la localización de PAR mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (Fig. 18C). En un primer momento la cantidad de polímero en el núcleo fue muy escasa y difusa, pero una vez concluidos los 10 minutos de tratamiento con H_2O_2 la marca de PAR en esta organela se volvió mucho más intensa. Esta señal perduró hasta los 30 minutos de la fase de recuperación, hasta que descendió transcurridos los 60 minutos. Sorprendentemente, 2 horas después de finalizado el tratamiento la localización de PAR en el núcleo volvió a hacerse muy notoria, adoptando esta organela una forma más redondeada. La acumulación de PAR en el núcleo incluso tras de la remoción del H_2O_2 implica que la ADP-ribosilación no es desencadenada por el agente oxidante en sí mismo, sino más bien por efectos de éste sobre el ADN. El resultado de este experimento coincide con lo observado en el Dot blot e indica que la respuesta ante este tratamiento comprende oleadas de aparición y cantidad de PAR en el núcleo, que probablemente tengan que ver con la reparación del ADN que está allí teniendo lugar.

PRODUCCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PAR EN PARÁSITOS SANGUÍNEOS

La respuesta frente al tratamiento con H_2O_2 también fue examinada en cultivos del estadio sanguíneo de *T. brucei*. En primer lugar se evaluó la concentración del agente oxidante a la cual se produce la activación de TbPARP y la síntesis de PAR (Fig. 19A). Al igual que en el caso de los parásitos procíclicos, estos cultivos presentaron una cantidad basal de polímero aún en ausencia de daño, mientras que la señal de PAR se incrementó en función de la concentración del H_2O_2 (250 y 500 μM). Para los experimentos subsiguientes se optó por utilizar 250 μM del compuesto, ya que a esta concentración el fenotipo de activación de TbPARP era evidente.

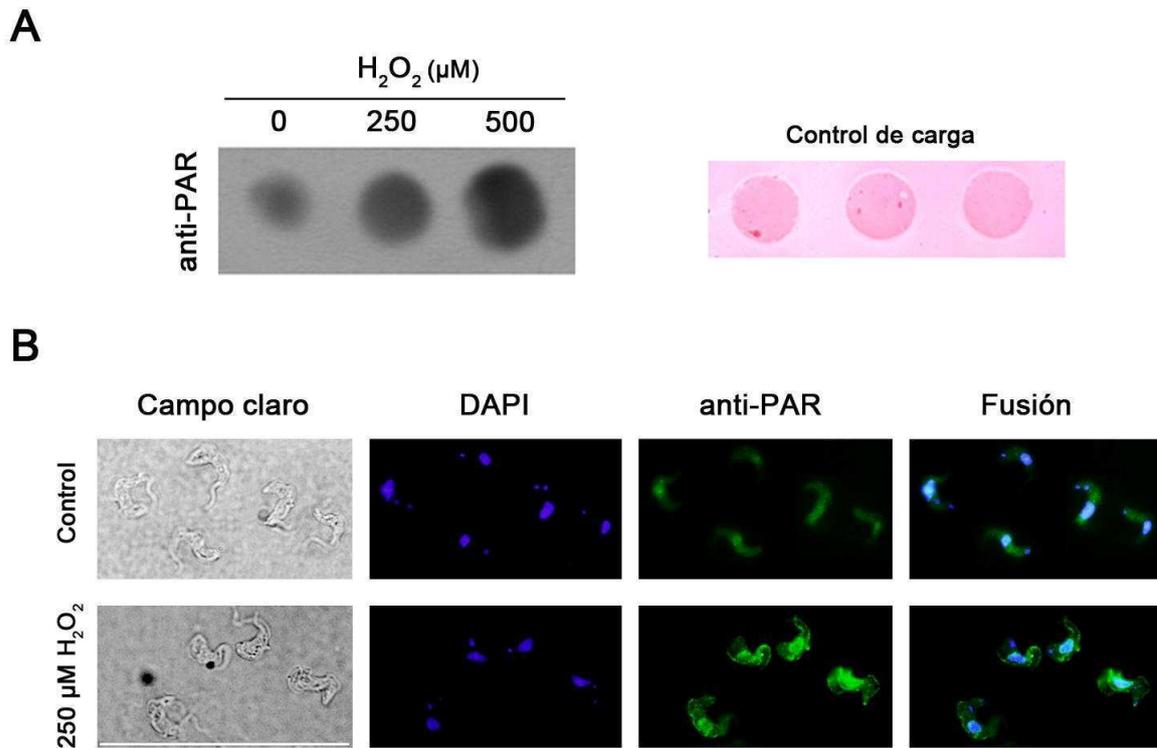


Figura 19. PAR en parásitos sanguíneos de *T. brucei* tratados con H₂O₂. **A.** Dot blot revelado con anticuerpos anti-PAR de extractos de parásitos sanguíneos (5 μg) tratados durante 10 minutos con distintas concentraciones de H₂O₂: 0, 250 y 500 μM en PBS-Glucosa 2%. Como control de carga la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau. **B.** IFI de parásitos sanguíneos tratados durante 10 minutos con 250 μM de H₂O₂. La localización de PAR fue detectada con anticuerpos específicos. El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI. La barra representa 50 μm.

En cuanto a la localización de PAR, nuevamente se observó lo ocurrido en los parásitos procíclicos. Transcurridos los 10 minutos de tratamiento con 250 μM de H₂O₂, la sutil señal que presentaba PAR en el núcleo se volvió mucho más grande e intensa (Fig. 19B).

Como conclusión de esta primera parte, pudimos demostrar que TbPARP es una enzima funcional capaz de responder *in vivo* frente al estímulo con H₂O₂ sintetizando polímero en el núcleo, tanto en cultivos de parásitos procíclicos como de sanguíneos.

CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE TbPARG

ACTIVIDAD DE TbPARG *IN VIVO*

La enzima encargada de la contraparte del metabolismo de PAR, es decir, TbPARG, no pudo ser caracterizada *in vitro* debido a la dificultad de ser expresada adecuadamente en un sistema bacteriano. Por esta razón, para corroborar la funcionalidad de esta enzima se decidió llevar a cabo un ensayo de actividad *in vivo*. Utilizando el modelo puesto a punto anteriormente, se expuso a parásitos procíclicos frente al agente genotóxico H_2O_2 durante 10 minutos. De esta manera se estimuló la actividad de PARP y, en consecuencia, la de PARG. Para poder adjudicar a esta última la función de remoción del polímero sintetizado, traducido en una disminución en la cantidad de PAR, se utilizó al inhibidor adenosin difosfato (hidroxi metil) pyrrolidine diol (ADP-HPD), un análogo de ADP-ribosa que es específico de las enzimas PARGs (Slama, Aboul-Ela et al. 1995)(Slama, Aboul-Ela et al. 1995). En presencia del mismo, era esperable que la cantidad de PAR se viera aumentada debido a la imposibilidad de PARG de hidrolizar al polímero.

Debido a que las células son poco permeables al inhibidor ADP-HPD, los parásitos fueron tratados previamente con digitonina, un detergente que solubiliza los lípidos y permeabiliza las membranas celulares. A modo de control, la figura 20 muestra que el tratamiento con digitonina no alteró la cantidad de PAR tras la exposición con el H_2O_2 . Además, la observación al microscopio indicó que la viabilidad celular tampoco se vio afectada.

La cinética de PAR de los parásitos procíclicos expuestos al tratamiento con H_2O_2 en presencia del inhibidor ADP-HPD mostró efectivamente un aumento del polímero respecto a los parásitos controles (Fig. 21). Esto significa que la enzima TbPARG es funcional y la encargada de la remoción del polímero, hecho que permite completar el ciclo del metabolismo de PAR.

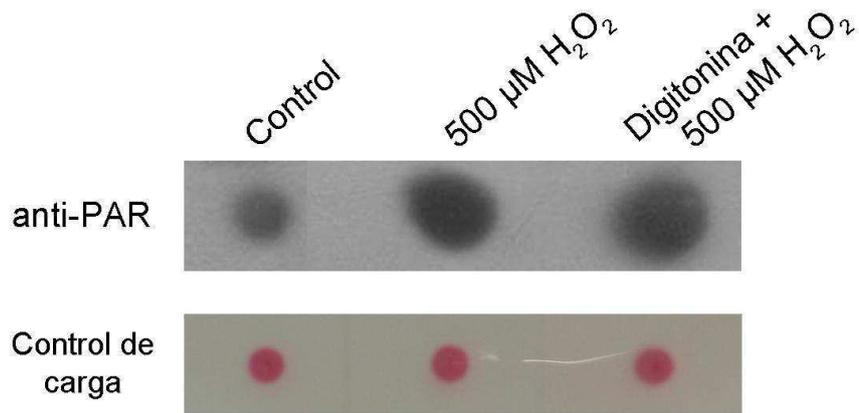


Figura 20. Parásitos procíclicos tratados con H₂O₂ y digitonina. Dot blot de extractos de parásitos procíclicos (3 μg) revelado con anticuerpos anti-PAR. Los cultivos fueron tratados durante 10 minutos con buffer (control) o con 500 μM de H₂O₂, previa incubación con digitonina (2,5 μg/mL) durante 5 minutos. Como control de carga la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau.

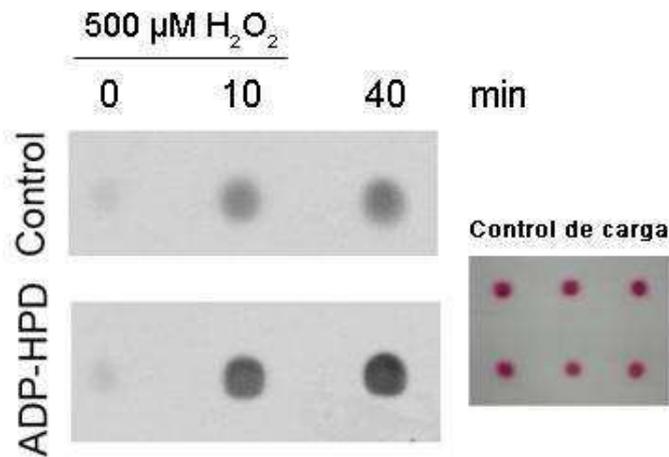


Figura 21. Cinética de PAR en presencia del inhibidor ADP-HPD en parásitos procíclicos. Cultivos de parásitos procíclicos fueron tratados con digitonina (2,5 μg/mL) durante 5 minutos y, luego de su lavado, los mismos fueron incubados durante 10 minutos con el inhibidor ADP-HPD (120 nM) o con buffer (control). Ambos cultivos fueron tratados durante 10 minutos con 500 μM de H₂O₂ y luego de este tiempo se dejaron recuperar durante 30 minutos en medio de cultivo, en presencia del inhibidor cuando correspondió. La cinética de la aparición del polímero fue analizada a distintos tiempos mediante dot blot de extractos de procíclicos (3 μg) revelados con anticuerpos anti-PAR. Como control de carga la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TbPARP Y TbPARG

Luego de confirmar que TbPARP y TbPARG son funcionales, la localización subcelular donde se hallan ambas enzimas en condiciones normales y una vez que han sido activadas fue la siguiente incógnita a responder.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TbPARG

Ha sido descrito que la proteína hPARG presenta diferentes isoformas, cada una de las cuales posee una localización subcelular distinta. Aquella relacionada con la degradación de los polímeros de ADP-ribosa en el núcleo se localiza en la zona perinuclear en ausencia de lesiones genómicas y, tras la aparición de daño genómico y la formación de PAR, ésta transloca al núcleo (Meyer, Meyer-Ficca et al. 2007) (Botta and Jacobson 2010) (Bonicalzi, Haince et al. 2005) (Haince, Ouellet et al. 2006).

La localización subcelular de TbPARG en cultivos de parásitos procíclicos y sanguíneos de *T. brucei* fue determinada por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos producidos en el laboratorio contra la proteína de *T. cruzi* (anticuerpos anti-TcPARG), los cuales ya habían sido probados con éxito para Western blot y Dot blot. Mediante microscopía de fluorescencia se observó que la proteína TbPARG se encuentra localizada en el núcleo en ambos estadios del parásito, independientemente de la presencia de rupturas en el ADN y de la existencia de polímero en esta organela (Fig. 22 A y B). Si bien los parásitos sanguíneos exhibieron una pequeña cantidad de PAR en condiciones normales, esta señal se incrementó luego del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 22B). A su vez, la detección nuclear de PAR con anticuerpos específicos ofreció un control para corroborar la efectividad del tratamiento y la formación de polímero en esta organela.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TbPARP

Dentro de la familia de la hPARP, aquellas enzimas involucradas en la señalización y reparación del daño genómico han demostrado tener una localización exclusivamente nuclear (Diefenbach and Burkle 2005) (Curtin 2005).

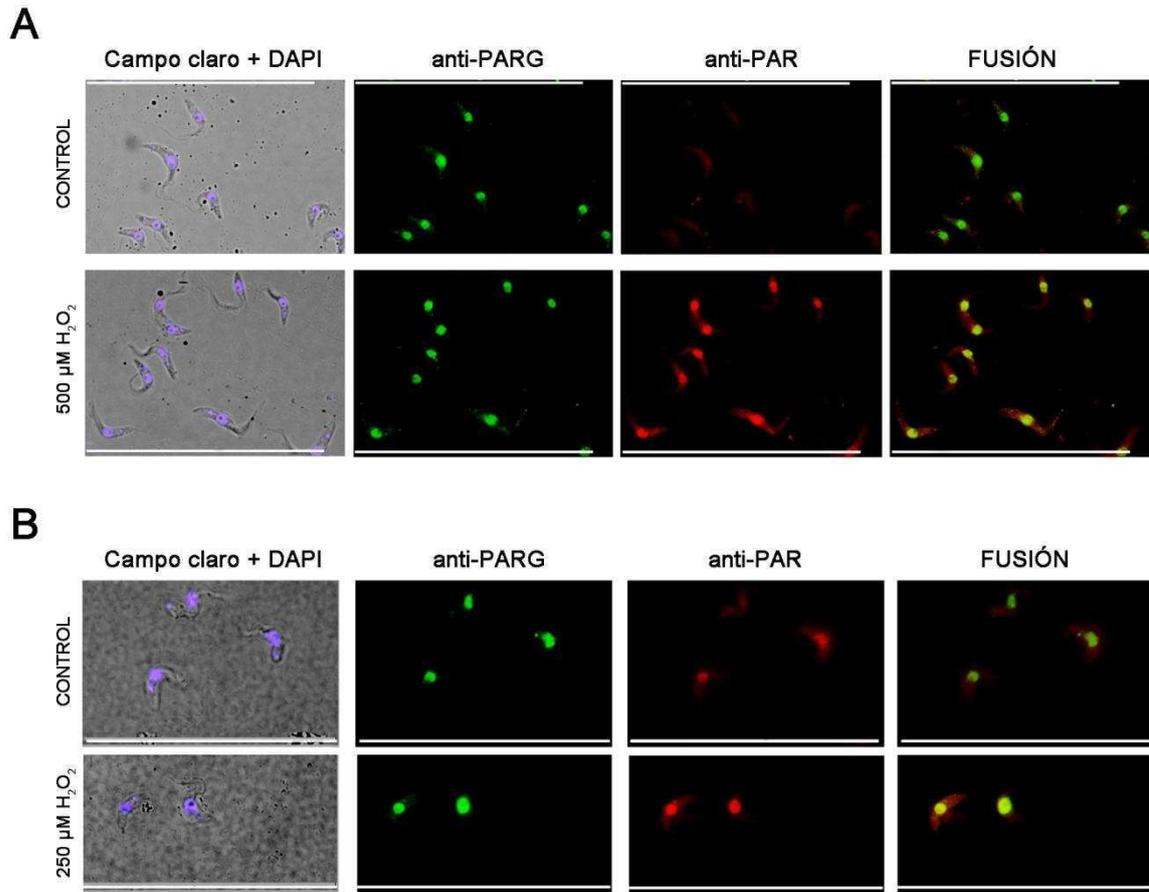


Figura 22. Localización subcelular de TbPARG por IFI en parásitos procíclicos y sanguíneos. **A.** IFI de parásitos procíclicos en condiciones control y tratados durante 10 minutos con 500 μM de H₂O₂. **B.** IFI de parásitos sanguíneos en condiciones control y tratados durante 10 minutos con 250 μM de H₂O₂. La localización de TbPARG fue determinada con anticuerpos anti-TcPARG producidos en el laboratorio. Para la localización de PAR se usaron anticuerpos específicos. El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI. Se muestra la co-localización de TbPARG y PAR (Fusión). La barra representa 50 μm.

El análisis de los parásitos procíclicos en condiciones normales por la técnica de inmunofluorescencia indirecta exhibió una señal de TbPARP citoplasmática y difusa; con grumos en la zona entre el núcleo y el kinetoplasto, así como también alrededor de estas dos organelas. Sin embargo, tras exponer a los parásitos a un agente genotóxico, TbPARP presentó una señal nuclear intensa (Fig. 23 A). Este hallazgo es coherente con la aparición de PAR en el núcleo luego del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 23 B). Lo mismo fue observado con el microscopio de fluorescencia para los parásitos sanguíneos, donde la detección de TbPARP en el núcleo se hizo evidente post-tratamiento (Fig. 24).

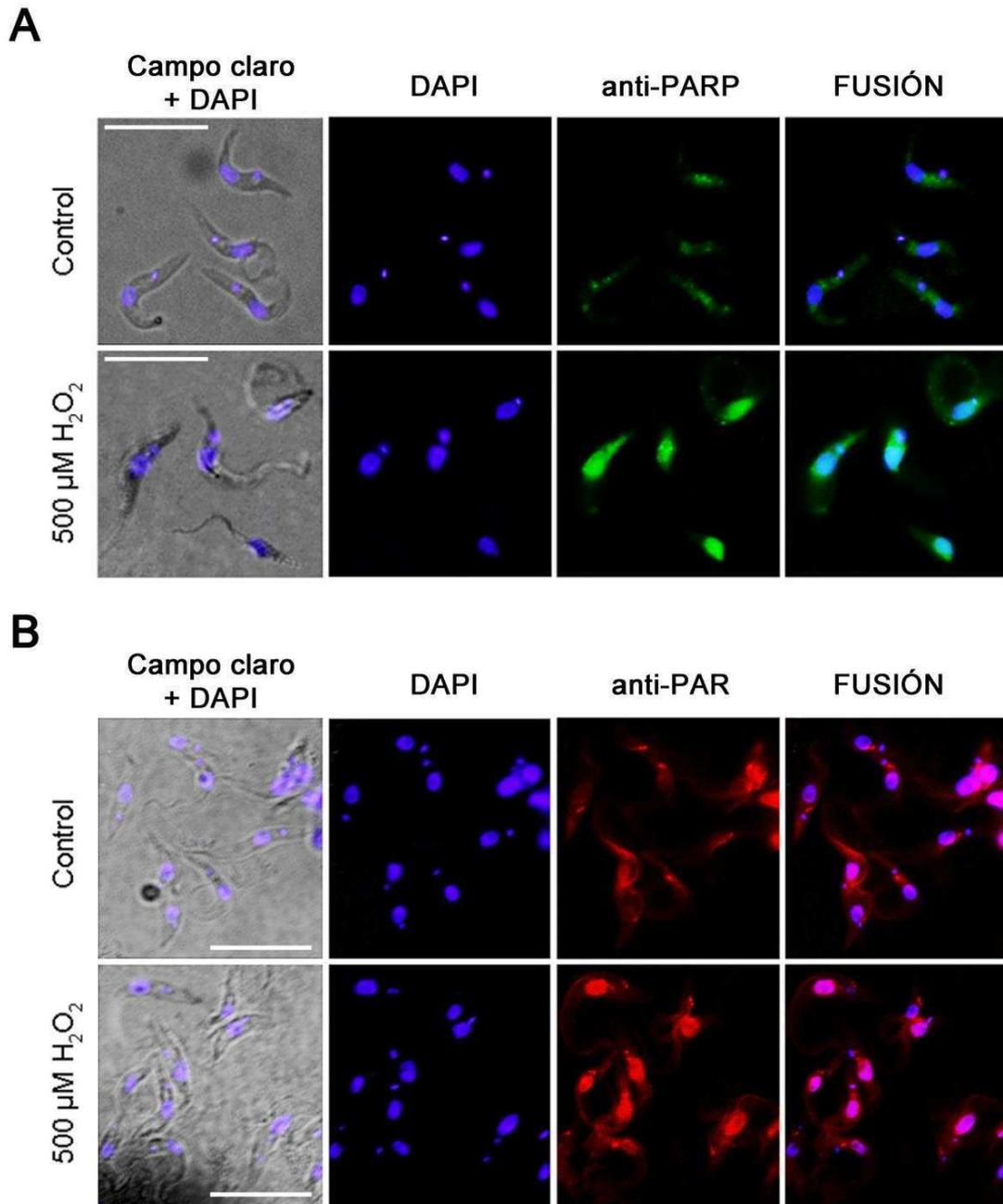


Figura 23. Localización subcelular de TbPARP y PAR por IFI en parásitos procíclicos. IFI de parásitos procíclicos en condiciones control y tratados durante 10 minutos con 500 μM de H_2O_2 . **A.** La localización de TbPARP fue determinada con anticuerpos anti-TbPARP (GenScript). **B.** La localización de PAR fue determinada con anticuerpos específicos (BD). El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI. La barra representa 10 μm .

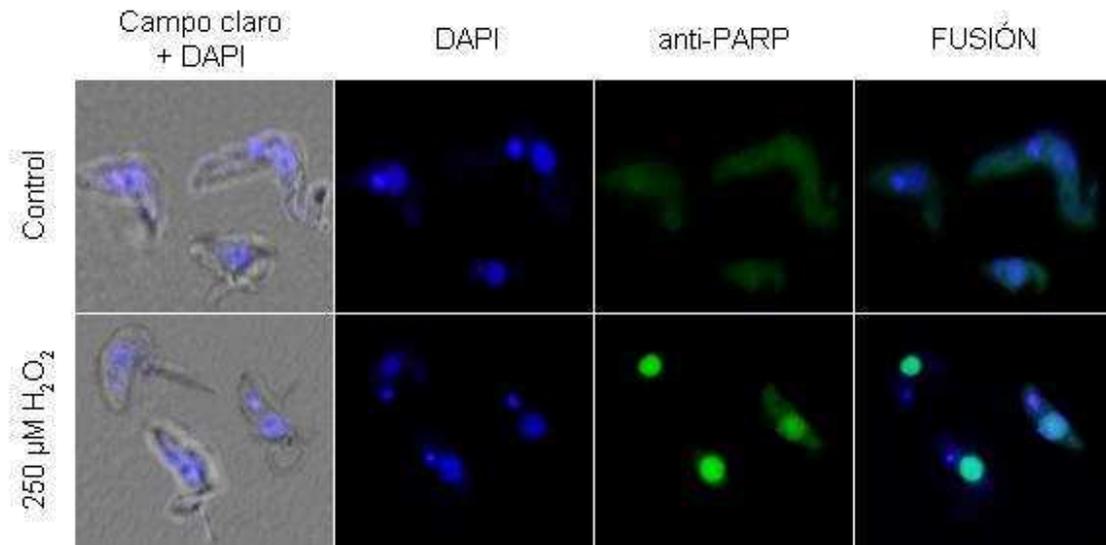


Figura 24. Localización subcelular de TbPARP por IFI en parásitos sanguíneos. IFI de parásitos sanguíneos en condiciones control y tratados durante 10 minutos con 250 μM de H_2O_2 . La localización de TbPARP fue determinada con anticuerpos anti-TbPARP (GenScript). El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI.

Dos hipótesis podrían explicar este resultado. La primera de ellas señala que la enzima TbPARP se encontraría diseminada en el citoplasma en condiciones normales, y por lo tanto se dificultaría su detección (a excepción de los grumos dispuestos entre el núcleo y el kinetoplasto observados en los parásitos procíclicos). El tratamiento con un agente genotóxico estimularía la translocación de la enzima hacia el núcleo y, al confinarse ésta en un espacio más reducido, su señal se incrementaría notablemente. La segunda hipótesis apunta a que TbPARP estaría presente en pequeñas cantidades y que, ante la presencia de daño, la expresión de esta enzima se induciría, teniendo como destino final el núcleo. En *T. cruzi* fue reportado que la formación del polímero en el núcleo está relacionada con la concentración del agente de daño (H_2O_2 o UV), mientras que la cantidad de TcPARP permanece invariable (Vilchez Larrea, Alonso et al. 2011). De todos modos no podemos descartar esta última teoría en *T. brucei*, ya que los resultados obtenidos por Western blot no han sido concluyentes. Por lo tanto, si la proteína migra desde el citoplasma hacia el núcleo o es sintetizada *de novo* en el momento en que su función es requerida por el parásito es una incógnita que deberá ser dilucidada más adelante.

La localización subcelular exhibida por TbPARP y TbPARG se contrapone con la reportada para este par de enzimas en otros eucariotas superiores (Diefenbach and Burkle 2005) (Curtin 2005) (Bonicalzi, Haince et al. 2005) (Haince, Ouellet et al. 2006).

Sin embargo, coincide con la descripción de las proteínas ortólogas en *T. cruzi* (Vilchez Larrea, Alonso et al. 2011) (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013), lo que permite especular que en estos parásitos dicha localización podría constituir un mecanismo regulatorio diferente, controlándose de algún modo la actividad de ambas proteínas. La carencia de señal de PARP en el núcleo explica los bajos niveles de polímero en este compartimento celular en ausencia de daño genómico. La exposición a agentes genotóxicos estimula la migración de PARP al núcleo e induce la síntesis de PAR en esta organela. Finalmente el polímero es degradado por PARG en este compartimento, restableciéndose el ciclo.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PAR

Como se describió anteriormente, el tratamiento con H₂O₂ induce la aparición de PAR en el núcleo. Pero además, una marca citoplasmática del polímero fue observada en dos puntos en posición perpendicular al kinetoplasto, tanto en los parásitos procíclicos tratados como en los controles (Fig. 23 B). A pesar de que la presencia permanente de PAR en este sitio era llamativamente definida y contundente, este patrón no había sido observado tan claramente en otras IFIs. Esto podría deberse a la falta de resolución de las imágenes por centrarnos en la intensa señal nuclear de PAR o, una hipótesis alternativa estaría relacionada con la especificidad diferencial de anticuerpos provenientes de diferentes marcas o lotes por distintos tamaños del polímero (Lafon-Hughes, Vilchez Larrea et al. 2014). De cualquier manera, este hallazgo ameritaba ser estudiado en mayor profundidad.

CO-LOCALIZACIÓN DE PAR Y TbPARP CON EL CUERPO BASAL

La marcación de TbPARP en focos entre la zona del núcleo y el kinetoplasto de parásitos procíclicos “wild type”, en adición a la detección de PAR en dos puntos bien definidos y dispuestos de manera perpendicular al kinetoplasto, nos permitió especular con la posibilidad de una asociación entre el polímero y los cuerpos basales.

El cuerpo basal de *T. brucei* es una estructura centriolo-like ubicada en la base del flagelo (donde también se forma el bolsillo flagelar). El mismo está íntimamente asociado con el kinetoplasto y dirige su segregación durante la mitosis (Robinson and Gull 1991). El anticuerpo monoclonal comercial YL1/2 tiene especificidad por la tubulina- α tirosinada y reconoce al extremo posterior de la célula de *T. brucei* y al cuerpo basal maduro, marcando las fibras que se irradian a partir de esta estructura (Gluenz, Povelones et al. 2011) (Stephan, Vaughan et al. 2007).

Con el fin de establecer si los componentes del metabolismo de PAR podrían estar relacionados con la estructura del cuerpo basal, extracciones citoesqueléticas de parásitos procíclicos fueron doblemente marcadas por inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-YL1/2. La naturaleza interconectada del citoesqueleto de los tripanosomátidos permite que éste sea purificado por medio de una simple extracción con detergente (Robinson and Gull 1991). Luego de este procedimiento lo que se obtiene es la fracción de microtúbulos del citoesqueleto, la cual conserva su forma y estructura original. La utilidad de esta técnica reside en que a través de ella se aísla al citoesqueleto con sus proteínas asociadas de todo el resto del material citoplasmático. Otra variante que se introdujo respecto a las inmunofluorescencias realizadas hasta el momento es que las muestras se fijaron con metanol frío en lugar de paraformaldehído. El metanol actúa al mismo tiempo como agente fijador y permeabilizador, ya que solubiliza todas las porciones membranosas de la célula. De esta forma, las estructuras citoesqueléticas quedan aún más expuestas.

En la inmunofluorescencia realizada sobre las extracciones citoesqueléticas doblemente marcadas con anticuerpos que reconocen al polímero y al cuerpo basal (anti-PAR y anti-YL1/2, respectivamente), se repitió la identificación de PAR en dos puntos bien definidos en la vecindad del kinetoplasto (Fig. 25 A y B). La presencia del polímero en estos preparados demuestra que el mismo se encuentra estrechamente asociado a la estructura del esqueleto del parásito. Sin embargo, no se observó una superposición entre las señales de PAR y la de YL1/2, indicando que éste se halla en la zona contigua a cada uno de los cuerpos basales; quizá modificando a proteínas relacionadas con ellos.

Llamativamente, también se advirtió la presencia de PAR en el núcleo, pudiendo ser consecuencia de dos sucesos (Fig. 25 A y B). La primera hipótesis es que en este tipo de preparados el polímero basal nuclear se observe de manera más intensa que la señal apreciada en las inmunofluorescencias normales debido a la disminución del ruido generado por los otros componentes celulares, eliminados con esta técnica. La otra posibilidad es que el propio tratamiento de extracción del citoesqueleto activara de alguna manera a PARP y, tras su migración al núcleo, formara polímero en este lugar. Respecto a esta segunda alternativa, sin embargo, es necesario tener en cuenta que en estos preparados no se advirtió la presencia de la enzima en el núcleo (Fig 26 y 27); aunque la síntesis de PAR bien podría ser anterior al aislamiento de proteínas y esqueleto del parásito, y PARP podría no interactuar fuertemente con la estructura citoesquelética en esta organela.

A

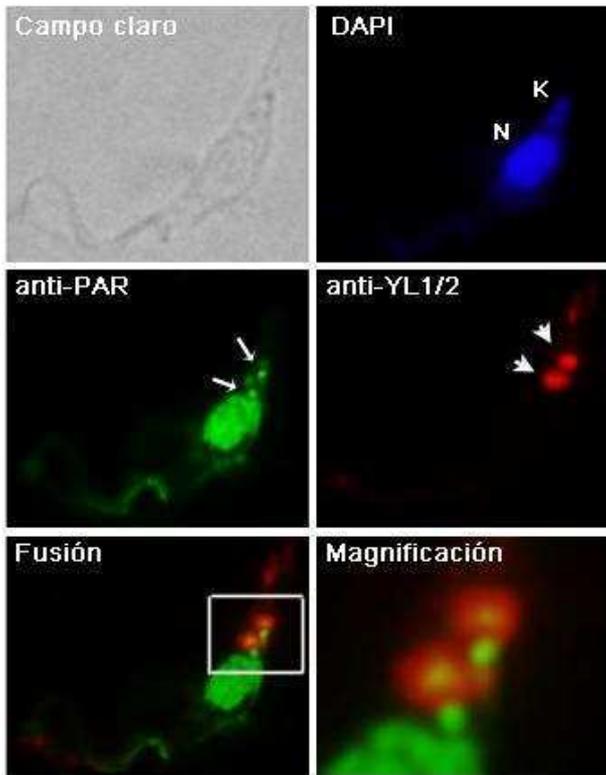
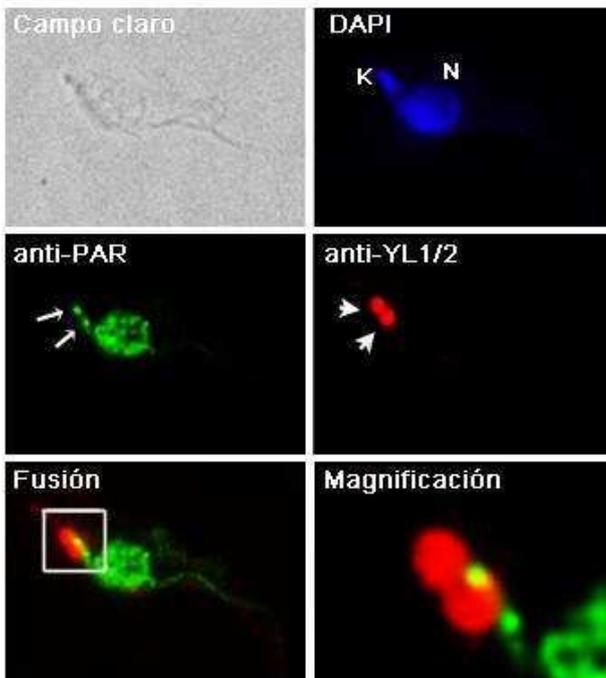


Figura 25. Análisis de la asociación de PAR y el cuerpo basal. A y B. Inmunofluorescencias del citoesqueleto de parásitos procíclicos fijados con metanol frío. Se realizó una doble marcación con anticuerpos anti-PAR (flechas) y anti- YL1/2 (cabezas de flechas), que marca el cuerpo basal. El núcleo (N) y el kinetoplasto (K) fueron marcados con DAPI.

B



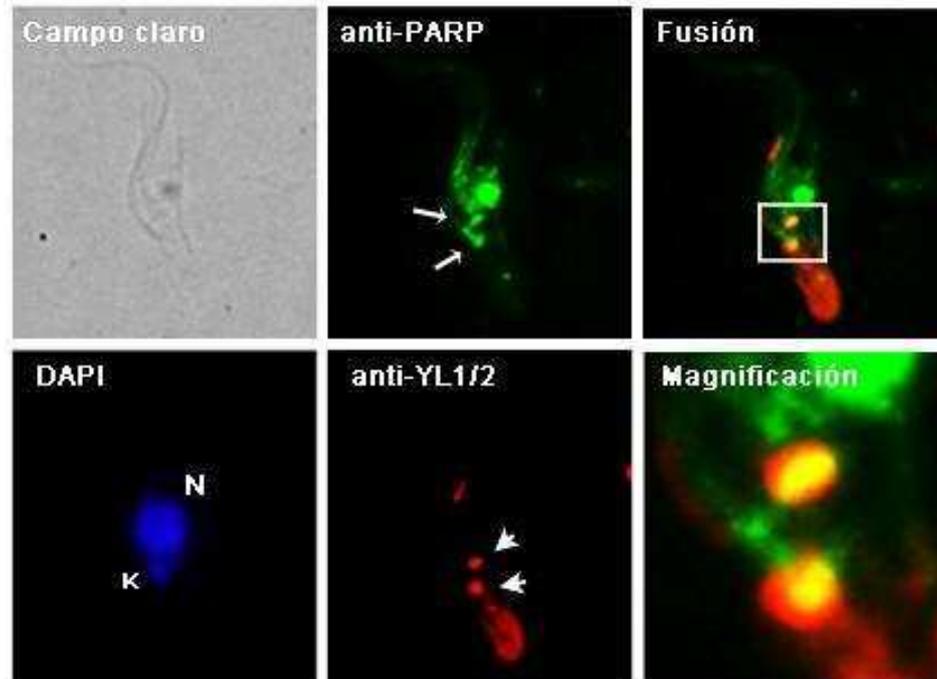


Figura 26. Análisis de la asociación de TbPARP y el cuerpo basal. Inmunofluorescencias del citoesqueleto de parásitos procíclicos fijados con metanol frío. Se realizó una doble marcación con anticuerpos anti-TbPARP (flechas) y anti- YL1/2 (cabezas de flechas), que marca el cuerpo basal. El núcleo (N) y el kinetoplasto (K) fueron marcados con DAPI.

En la Inmunofluorescencia sobre las extracciones citoesqueléticas donde se realizó la doble marcación de la enzima TbPARP y el cuerpo basal (anticuerpos anti-PARP y anti-YL1/2, respectivamente), en cambio, se pudo constatar una co-localización de ambas estructuras (Fig. 26 y 27). Esto significa que TbPARP no solo interacciona fuertemente con las estructuras esqueléticas que conforman el bolsillo flagelar; sino que, además, se halla en el mismo sitio que los cuerpos basales.

Estos hallazgos sugerirían que el metabolismo de PAR podría estar relacionado con las funciones del cuerpo basal y el ciclo celular de los parásitos procíclicos de *T. brucei*. El cuerpo basal está adherido al genoma mitocondrial a través de un complejo de unión tripartita (Fig. i8). Es una posibilidad que alguno de los componentes de dicho complejo podría estar PARilado. El complejo tripartita comprende una serie de filamentos que hacen de guía para la segregación del kinetoplasto, el cual está vinculado a la duplicación y segregación del cuerpo basal y del flagelo. El cuerpo basal madura en la transición de las fases G₁/S a partir de un cuerpo pro-basal, mientras que la replicación del kinetoplasto se produce cerca de la fase S nuclear. Resulta llamativo que en los parásitos procíclicos la citocinesis no se detiene por problemas en la mitosis, pero la inhibición de la duplicación del cuerpo basal o de su segregación sí la arresta completamente.

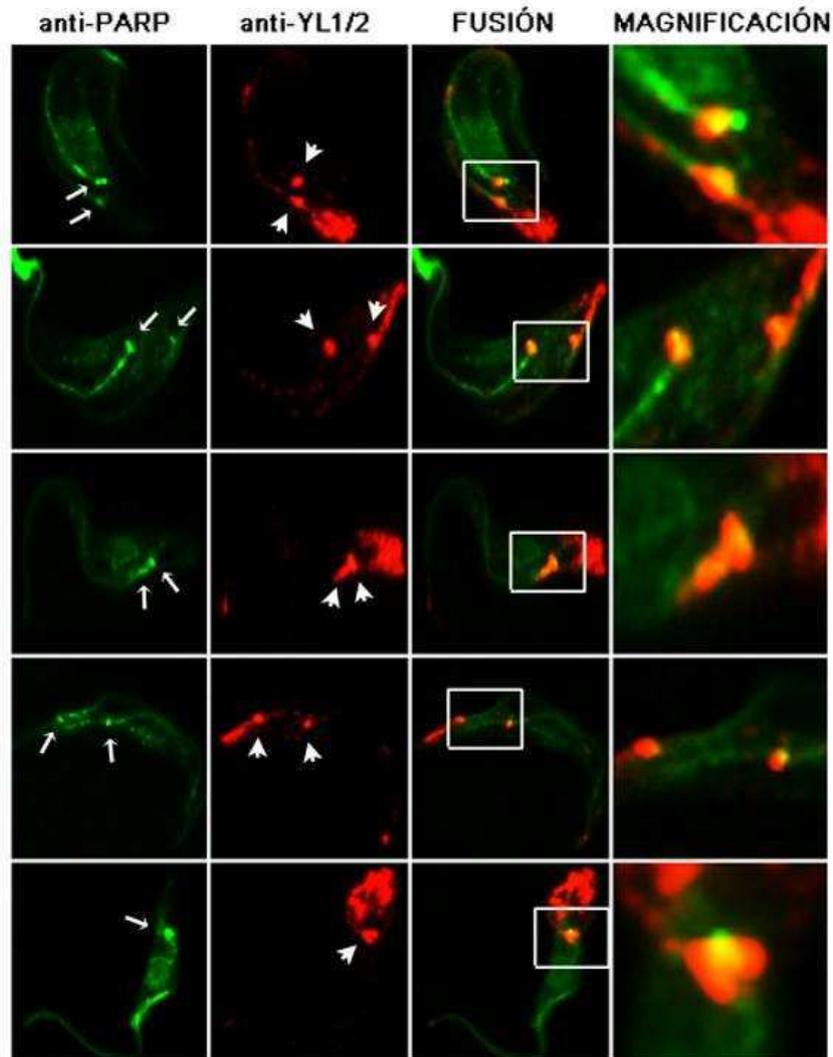


Figura 27. Análisis de la asociación de TbPARP y el cuerpo basal. Inmunofluorescencias del citoesqueleto de parásitos procíclicos fijadas con metanol frío. Se realizó una doble marcación con anticuerpos anti-TbPARP (flechas) y anti- YL1/2 (cabezas de flechas), que marca el cuerpo basal.

SUPERVIVENCIA CELULAR DE PARÁSITOS CARENTES DE UNA TbPARP FUNCIONAL

INHIBICIÓN *IN VIVO* DE TbPARP

Los compuestos que se identificaron como los mejores inhibidores de TbPARP *in vitro* se ensayaron para determinar su capacidad de inhibir la formación de PAR *in vivo* en parásitos de las formas procíclica y sanguínea, desafiándolos una vez más con

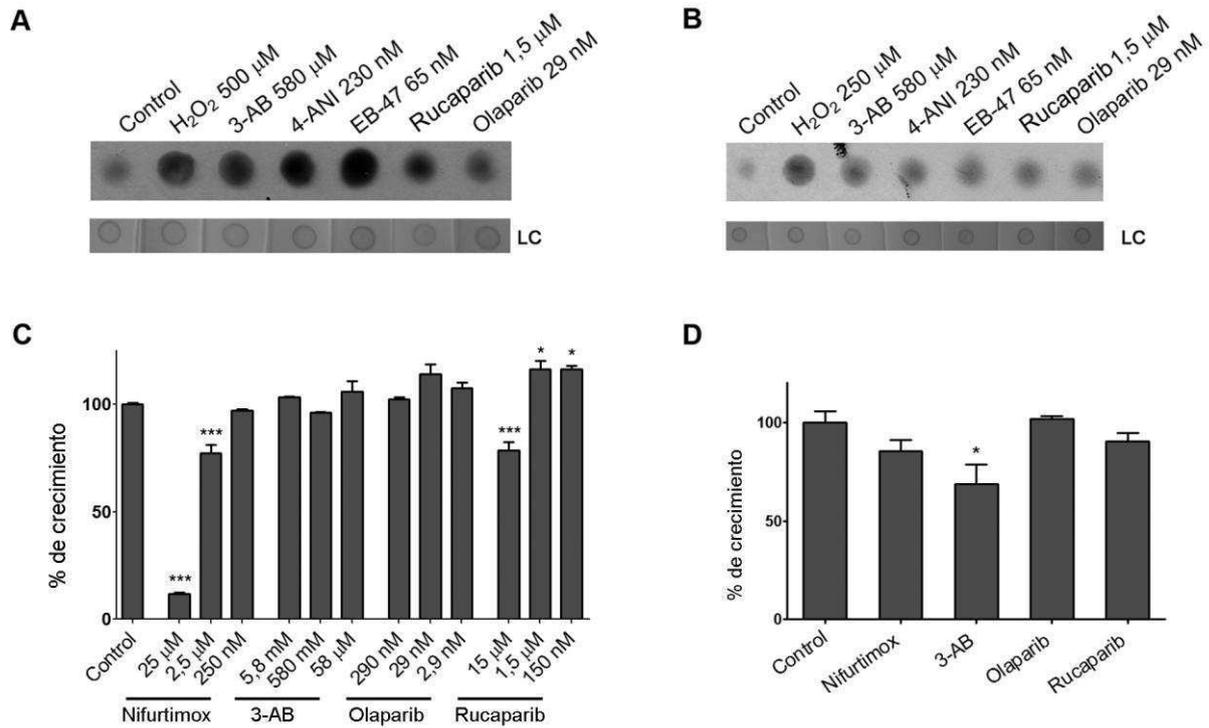


Figura 28. Inhibición de TbPARP *in vivo* y efecto de los inhibidores de PARP en el crecimiento de *Trypanosoma brucei*. La formación de PAR se evaluó mediante dot-blot en **A.** cultivos procíclicos pre-incubados 30 minutos con inhibidores de PARP y desafiados con 500 μM de H₂O₂ durante 10 minutos, y en **B.** cultivos sanguíneos pre-incubados 10 minutos con inhibidores de PARP y desafiados con 250 μM de H₂O₂ durante 10 minutos. Los controles positivos (H₂O₂) se realizaron en ausencia de inhibidores y los controles negativos (control) no fueron tratados con H₂O₂. La membrana se tiñó con Rojo Ponceau como control de carga (LC). **C.** Efecto de los inhibidores de PARP seleccionados sobre el crecimiento de los parásitos procíclicos tras 48 horas de incubación, medidos por absorbancia a 620 nm. **D.** Efecto de los inhibidores de PARP seleccionados sobre el crecimiento de los parásitos sanguíneos tras 24 horas de incubación, contados en cámara de Neubauer. El Nifurtimox fue usado a 2,5 μM y los inhibidores a la misma concentración que en el panel B. El crecimiento de los cultivos control (en ausencia de inhibidores o Nifurtimox) se consideró como 100%. Todos los puntos se determinaron por triplicado y se muestran las medias con sus desviaciones estándar. También se indica la significancia del resultado respecto al control (***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05), analizado con el método estadístico ANOVA.

peróxido de hidrógeno. Los inhibidores fueron testeados a una concentración 10 veces mayor que el valor *in vitro* de IC₅₀. Los compuestos y concentraciones ensayadas *in vivo* fueron los siguientes: 4-ANI, 230 nM; EB-47, 65 nM; Olaparib, 29 nM; y Rucaparib, 1,5 μM. El 3-AB fue utilizado como control a una concentración de 580 mM. En el caso de los parásitos procíclicos, Olaparib y Rucaparib inhibieron la formación de PAR *in vivo*, aunque no mostraron una inhibición completa; 4-ANI y EB-47, en cambio, no inhibieron a TbPARP en absoluto (Fig. 28 A). En el caso del estadio sanguíneo del

tripanosomátido, si bien la mayoría de los inhibidores disminuyeron la formación de PAR, ninguno lo hizo de manera completa a las concentraciones aquí ensayadas (Fig. 28 B).

Sólo los inhibidores Olaparib y Rucaparib fueron capaces de reducir la formación de PAR en ambos estadios del tripanosomátido. Esto podría explicarse por variaciones en la capacidad de estos fármacos para penetrar la membrana externa de *T. brucei* o en los mecanismos del parásito que permiten la desintoxicación metabólica de estos inhibidores (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012).

Olaparib y Rucaparib fueron seleccionados entonces para ser evaluados por su capacidad de afectar el crecimiento de parásitos procíclicos en una serie de concentraciones que van desde el valor de IC_{50} *in vitro* hasta dos órdenes de magnitud superior (Fig. 28C). También fue probado el compuesto 3-AB, reportado como un inhibidor que disminuye el crecimiento de *T. cruzi* (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012) (Fernandez Villamil, Baltanas et al. 2008). Además se incluyó a Nifurtimox en el panel de compuestos como un control positivo, debido a su actividad tripanocida ampliamente probada. Nifurtimox es una droga que se ha utilizado durante más de 40 años para tratar la enfermedad de Chagas y forma parte de una terapia combinada que ha sido aprobada recientemente para combatir a la tripanosomiasis de África Occidental causada por *T. brucei* (Dethoua, Nzoumbou-Boko et al. 2013) (Priotto, Kasparian et al. 2009). Ninguno de los inhibidores de PARP probados fue capaz de afectar negativamente el crecimiento del parásito en el cultivo, a excepción de Rucaparib que causó una disminución del 20% con la concentración más alta utilizada (15 μ M). El Nifurtimox, en cambio, ya a una concentración de 2,5 μ M redujo el crecimiento de la forma procíclica del parásito.

Las curvas de crecimiento de los parásitos del estadio sanguíneo en presencia de Olaparib y Rucaparib a la misma concentración que la utilizada para el ensayo de inhibición de TbPARP *in vivo* también mostraron que estos compuestos no son capaces de afectar significativamente la supervivencia de *T. brucei* (Fig. 28D). La incubación en presencia de 3-AB o Nifurtimox, sin embargo, sí produjo una disminución en el crecimiento del parásito, aunque sólo el efecto de 3-AB fue significativo en comparación con el control. A lo mejor el tiempo de incubación con los inhibidores fue demasiado corto para observar un mayor efecto, aunque estos resultados sí mostraron una tendencia.

ARN DE INTERFERENCIA DE TbPARP

Debido a que estos resultados contrastaban con los obtenidos anteriormente en *T. cruzi* (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012), nos propusimos abordar este estudio con un enfoque diferente, eliminando a la enzima de interés de los parásitos procíclicos por la técnica de ARN de interferencia (ARNi). Para ello se utilizó al vector p2T7^{TI}-177 (Wickstead, Ersfeld et al. 2002), el cual se integra en la región repetida de 177 pares de bases de los minicromosomas. La expresión ectópica del ARN doble cadena fue inducida por tetraciclina causando la ablación específica del ARNm endógeno codificante para TbPARP.

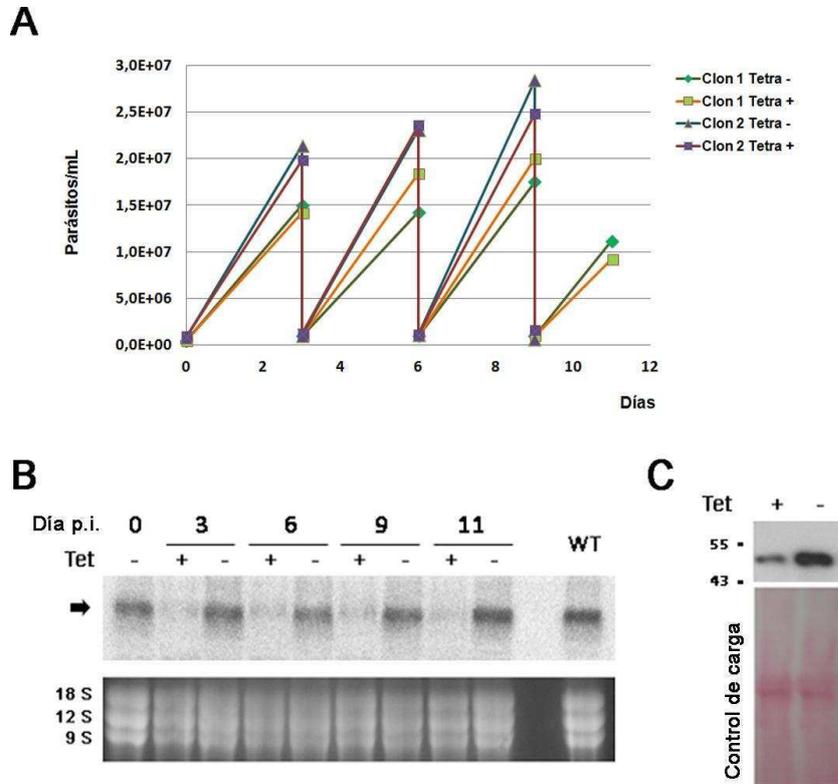


Figura 29. Transgénicos ARNi-TbPARP de parásitos procíclicos. A. Curva de crecimiento de parásitos inducidos con tetraciclina (Tet +) y no inducidos (Tet -) de dos clones independientes 1 y 2 evaluados durante 11 y 9 días, respectivamente; contados en cámara de Neubauer. **B.** Análisis por Northern-blot del clon 1 a los días 3, 6, 9 y 11 post-inducción (pi) con tetraciclina (Tet). Los niveles de ARN ribosomal se estimaron mediante la tinción con bromuro de etidio para asegurar que cantidades iguales de ARN total sean sembradas en cada carril. La flecha indica la banda correspondiente al ARNm de TbPARP, la cual también está presente en los parásitos silvestres (WT). **C.** Análisis por Western-blot al tercer día post-inducción del equivalente celular a 2×10^6 parásitos, revelados con anticuerpos dirigidos contra TbPARP (GeneScript). La membrana fue teñida con rojo Ponceau como control de carga.

Un fragmento (nucleótidos 1030 a 1445) del gen *Tbparp* (número de acceso de GenBank DQ679800) fue amplificado mediante PCR a partir de ADNg utilizando un par de primers específicos, los cuales introdujeron los sitios de restricción para las enzimas *SpeI* y *HindIII* en los extremos del producto de PCR. Tras la digestión con ambas enzimas de restricción, el producto de PCR fue ligado al vector p2T7^{TI}-177 digerido con *SpeI* / *HindIII*. El constructo de ARNi resultante se linealizó con *NotI* previo a la introducción en la cepa 29-13 de *T. brucei* mediante electroporación. Luego de la electroporación, las células fueron transferidas a 10 ml de medio SDM-79 suplementado con antibióticos y fueron incubadas durante 24 horas. Los transfectantes fueron seleccionados con 20 µg/mL de zeocina hasta obtener líneas celulares estables luego de tres semanas de incubación continua. Para la inducción del ARN doble cadena, las células fueron cultivadas en el medio anterior conteniendo 1,0 µg/mL de tetraciclina.

Se obtuvo una curva de crecimiento para cada uno de los clones independientes contando los parásitos en cámara de Neubauer. A pesar que las curvas de crecimiento de ambos clones presentaron diferencias entre sí, no se observaron variaciones entre los transfectantes inducidos y los controles sin inducir (Fig. 29 A). Además, el silenciamiento de uno de ellos (clon 1) fue chequeado por Northern-blot a lo largo de 11 días (Fig. 29 B) y por Western-blot al tercer día de inducción (Fig. 29 C). Si bien la abolición de la expresión de la enzima no fue completa, la misma se redujo notoriamente. Por esta razón los ensayos subsiguientes con parásitos RNAi-PARP fueron realizados al tercer día post-inducción del cultivo.

Los experimentos llevados a cabo con los parásitos transgénicos ARNi-TbPARP indicaron que la falta de TbPARP no altera la tasa de crecimiento del cultivo. Esto sugeriría que TbPARP no es esencial para la forma procíclica de *T. brucei*, al igual que se observó en los ensayos con los inhibidores. Un estudio de secuenciación de blancos de ARNi en *T. brucei* también arribó a la misma conclusión, ratificando que la carencia de una TbPARP funcional no tiene consecuencias sobre la viabilidad del parásito (Alsford, Turner et al. 2011).

Como ya fue mencionado, las conclusiones a las que se arribó con *T. brucei* difieren de aquellas obtenidas con *T. cruzi*, donde la inhibición de TcPARP por la presencia de 25 nM de Olaparib en cultivos de epimastigotes dio lugar a una disminución en el crecimiento del 50% (Vilchez Larrea, Haikarainen et al. 2012). Esto significaría que PARP estaría cumpliendo roles diferentes en estos dos tripanosomátidos.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que en los estudios realizados por nosotros, TbPARP no fue completamente silenciada ni inhibida 100%, y la baja concentración de proteína remanente podría ser suficiente para la supervivencia de *T. brucei* en condiciones de crecimiento normales.

MUERTE CELULAR POST-DAÑO GENÓMICO EN PARÁSITOS CARENTES DE UNA TbPARP FUNCIONAL

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS CARENTES DE UNA TbPARP FUNCIONAL

Dado que TbPARP parecía no ser crucial para la viabilidad de la forma procíclica de *T. brucei* en condiciones normales, nos preguntamos si la misma jugaría un rol en parásitos sometidos a estrés oxidativo.

Como parámetro de sensibilidad de los parásitos ante el estrés oxidativo, se determinó la respuesta de los cultivos frente al compuesto genotóxico utilizado hasta ahora en nuestro modelo experimental. Para ello se estimó la supervivencia del tripanosomátido midiendo su motilidad transcurridas las 6 horas de tratamiento con H₂O₂ en parásitos sin PARP funcional.

Distintas estrategias fueron implementadas para el cálculo de los parásitos viables, sin embargo todas presentaron alguna dificultad. El conteo con el colorante vital Azul de Tripán no tuvo éxito debido a la imposibilidad de hacer foco sobre el pequeño cuerpo de estos parásitos, lo que imposibilitaba identificar con certeza las células teñidas. Por otro lado, la citometría de flujo de los parásitos teñidos con Ioduro de Propidio no presentó una correspondencia entre la concentración de H₂O₂ y el número de eventos de parásitos muertos, por lo que esta correlación podría no ser lineal a las concentraciones en las que trabajábamos. El cálculo de la concentración de los parásitos por medio de la absorbancia a 620 nm, que ya había sido utilizado anteriormente, tampoco fue fructífero ya que los resultados presentaban demasiada variación. Esto puede haber sido consecuencia de que la absorbancia mide la cantidad de biomasa, no de parásitos viables, y por lo tanto se infiere de manera indirecta en qué pocillos los parásitos continuaron dividiéndose y en cuales mantuvieron su concentración inicial debido a la muerte de las células. Además, la tasa de proliferación introducía otra variable en la medición, pudiendo no mantenerse constante en los parásitos tratados. Otra dificultad que presentaron las últimas dos

técnicas es que el porcentaje de parásitos sobrevivientes se obtenía en base al número de células presentes en los pocillos controles de la placa, por lo que diferencias sutiles en el inoculo inicial de ambos pocillos podía derivar en conclusiones erróneas.

Por lo antes expuesto, decidimos adoptar la medición de la motilidad como un parámetro de viabilidad, para lo cual luego del tratamiento se filmaron los parásitos sobre una cámara de Neubauer. El porcentaje de supervivencia se obtuvo contando en cada pocillo los parásitos mótils sobre los parásitos totales, eliminando de esta manera el problema causado por la variación de la concentración inicial de parásitos en diferentes pocillos.

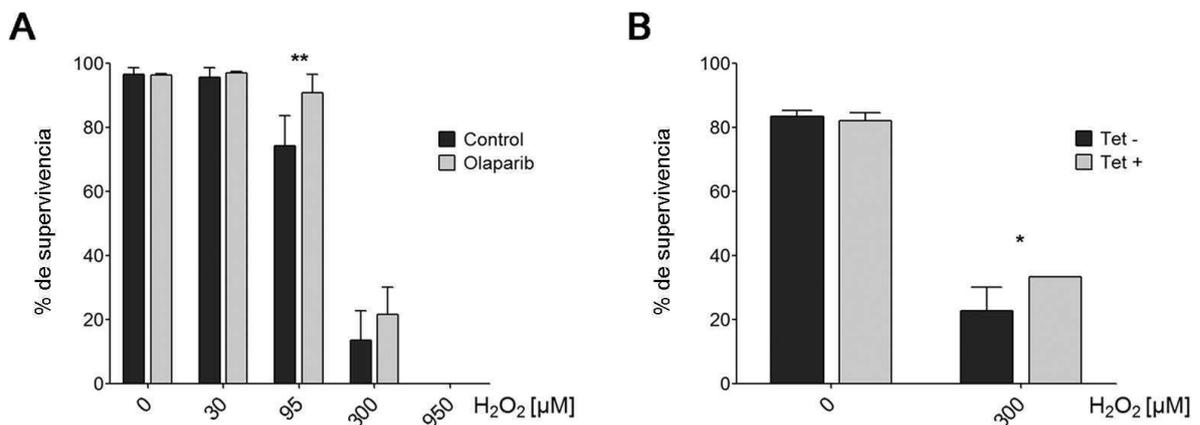


Figura 30. Supervivencia celular de cultivos con la función de TbPARP abrogada, sometidos al tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se evaluó la supervivencia celular de los parásitos procíclicos mediante la medición de la motilidad a las 6 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂. **A.** Cultivos procíclicos previamente incubados con 29 nM de Olaparib durante 30 minutos o sin inhibidor añadido (control). **B.** Cultivos transgénicos de ARNi PARP al tercer día de inducción (Tet +) o sin inducir (Tet -). Todos los puntos se determinaron por triplicado y se muestran las medias con sus desviaciones estándar. También se indica la significancia del resultado respecto al control (***, p <0,001; **, p <0,01; *, p <0,05), analizado con el método estadístico ANOVA.

Los experimentos fueron realizados por triplicado con distintas concentraciones de H₂O₂ en cultivos procíclicos pre-incubados con Olaparib, a una concentración que ha demostrado ser eficaz para inhibir la formación de PAR *in vivo* (29 nM) (Fig. 30 A). Los parásitos controles no mostraron sensibilidad a este agente de daño hasta 30 μM. A 95 μM se observó una disminución en la viabilidad de alrededor del 20%, el cual aumentó a un 80% de inhibición a 300 μM.

Al analizar dosis bajas o subletales de H_2O_2 (30 μM), no se vio diferencia en la viabilidad del parásito en presencia o ausencia de Olaparib. Sin embargo, a una dosis que disminuyó el número de parásitos móviles (95 μM), la presencia de Olaparib en el medio redujo la pérdida de viabilidad inducida por el oxidante y los cultivos se volvieron más resistentes a este agente genotóxico. A una concentración letal de H_2O_2 (300 μM) se evidenció un ligero efecto protector en presencia del inhibidor de PARP, aunque el mismo no fue estadísticamente significativo (Fig. 30 A). Un resultado similar se observó cuando los parásitos transgénicos que no expresaban TbPARP (ARNi-PARP) fueron sometidos al mismo tratamiento con H_2O_2 , al tercer día de inducción con tetraciclina (Fig. 30 B).

En conjunto, estos experimentos demostraron que la falta de una TbPARP funcional conduce a un aumento en la resistencia al H_2O_2 en parásitos procíclicos de *T. brucei*. Se sabe que PARP se activa frente al daño genotóxico y que está relacionada con la muerte celular de diferentes maneras. Para evaluar si la producción exacerbada de PAR o la acumulación de PAR en el núcleo está relacionada con la pérdida de viabilidad de parásitos expuestos a H_2O_2 se obtuvieron dos líneas de parásitos transgénicos, una que carece de la enzima TbPARG (ARNi-PARG) y la otra que sobre-expresa a TbPARP (p2216- PARP).

MUERTE CELULAR POST-DAÑO GENÓMICO EN PARÁSITOS CARENTES DE TbPARG

ARN DE INTERFERENCIA DE TbPARG

Al igual que para generar el ARN de interferencia de TbPARP, el knock-down de TbPARG se obtuvo utilizando el vector p2T7^{T1}-177 (Wickstead, Ersfeld et al. 2002). El fragmento del gen *Tbparg* (nucleótidos 593 a 979) fue amplificado por la técnica de PCR, generando los sitios de restricción de las enzimas SpeI y HindIII, con las que se ligó la secuencia al plásmido. La transfección de los parásitos procíclicos de la cepa 29-13 de *T. brucei* fue llevada a cabo como se indicó en la sección “ARNi de TbPARP”, así como también la obtención de clones estables utilizando zeocina como marcador de selección. Para la inducción del ARNm doble cadena que inhibe la expresión de TbPARG, se agregó al medio 1,0 $\mu g/mL$ de tetraciclina.

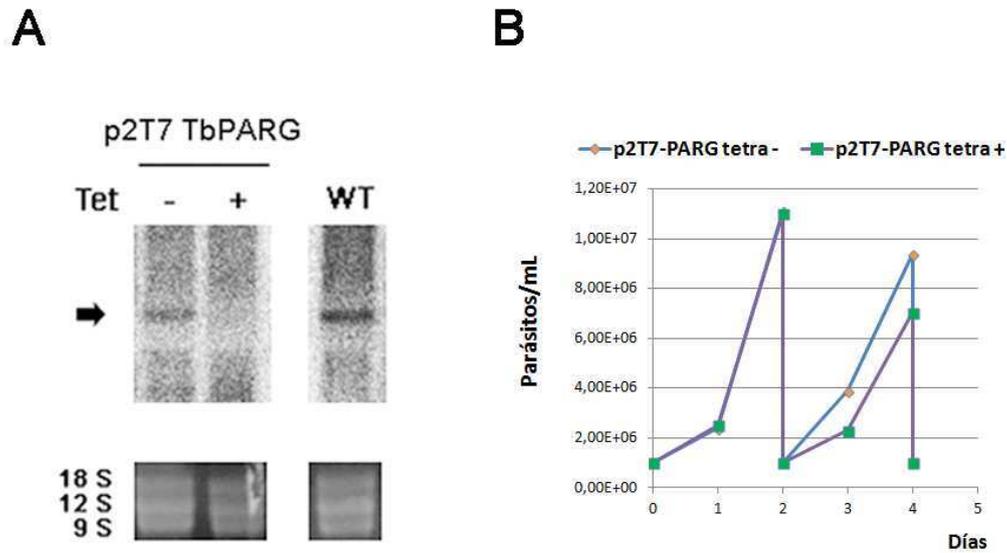


Figura 31. Transgénicos ARNi-TbPARG de parásitos procíclicos. A. Análisis por Northern blot al tercer día post-inducción con tetraciclina (Tet +). Los niveles de ARN ribosomal se estimaron mediante la tinción con bromuro de etidio para asegurar que cantidades iguales de ARN total fueran sembrados en cada carril. La flecha indica la banda correspondiente al ARNm de TbPARG, la cual también está presente en los parásitos silvestres (WT). **B.** Curva de crecimiento seguida durante 4 días de los parásitos transgénicos inducidos con tetraciclina (Tetra +) y no inducidos (Tetra -), contados en cámara de Neubauer.

El silenciamiento de la enzima TbPARG en los parásitos transgénicos fue verificado por medio de la técnica de Northern blot, el cual fue revelado con la misma sonda que la utilizada para el Southern blot de TbPARG (Fig. 2A). Este fragmento correspondía a la región entre las bases 104 y 1150 de la región codificante del gen. La figura 31A muestra cómo el ARNm de la proteína de interés ha desaparecido en los cultivos inducidos durante 3 días, mientras que está presente en los cultivos controles no inducidos; como lo ratifica el cultivo silvestre (Fig. 31A).

La curva de crecimiento del cultivo ARNi-PARG inducido manifestó una disminución en la concentración de parásitos a partir del tercer día; momento en el que se demostró que el silenciamiento de la enzima era efectivo (Fig. 31B). Esto indicó que, en contraste con lo acontecido con el knock-out funcional de TbPARG, la ausencia de TbPARG sería perjudicial para la supervivencia de la forma procíclica del parásito. En base a este resultado se decidió profundizar el estudio de la relación entre las enzimas del metabolismo de PAR y el ciclo celular, como se verá en una sección más adelante.

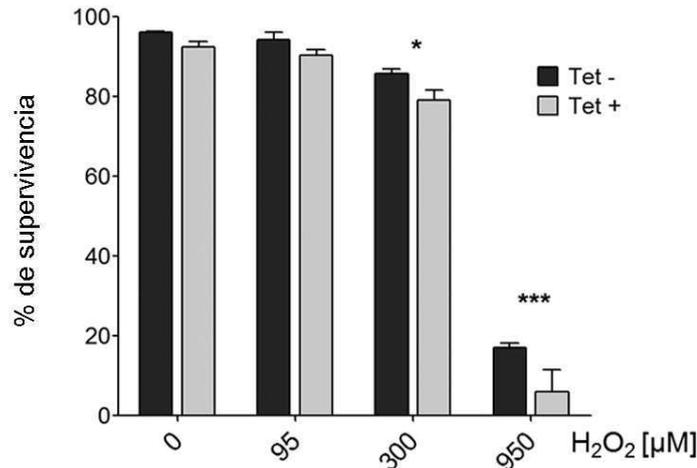


Figura 32. Supervivencia celular de cultivos de parásitos procíclicos transgénicos ARNi-TbPARG, sometidos al tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se evaluó la supervivencia celular de los parásitos procíclicos transgénicos al tercer día de inducción (Tet +) o sin inducir (Tet -) mediante la medición de la motilidad a las 6 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂. Todos los puntos se determinaron por triplicado y se muestran las medias con sus desviaciones estándar. También se indica la significancia del resultado respecto al control (***, p <0,001; **, p <0,01; *, p <0,05), analizado con el método estadístico ANOVA.

Continuando con el objetivo inicial de dilucidar el efecto que produce la ausencia de TbPARG sobre la respuesta al agente genotóxico H₂O₂, se midió la motilidad luego de 6 horas de tratamiento al tercer día de inducido el silenciamiento de TbPARG; de la misma manera que se hizo con los cultivos pre-incubados con Olaparib y ARNi de TbPARP. Varias fueron las conclusiones a las que se pudo arribar con este experimento (Fig. 32). En primer lugar, en ausencia de daño (0 µM de H₂O₂) el porcentaje de parásitos viables fue el mismo para los cultivos inducidos que para los controles. A priori, esto indicaría que la disminución en el número de los parásitos deficientes de TbPARG en la curva de crecimiento no obedecería a un incremento en la tasa de muerte, sino a un enlentecimiento en la velocidad de crecimiento (Fig. 31B). En segundo lugar, al igual que ocurrió con los otros cultivos, no se distinguieron variaciones entre los parásitos inducidos y los controles a concentraciones bajas de H₂O₂ (hasta 95 µM). A dosis mayores de 300 µM y 950 µM, sin embargo, las diferencias entre el cultivo inducido y el no inducido se incrementaron en un 6% y 11%, respectivamente; presentando en los parásitos knock-down un mayor efecto citotóxico. Esto confirmó la hipótesis que la ausencia de TbPARG hace más sensibles a estos parásitos frente al daño genómico.

El papel de PARG en la muerte celular es controversial y algunos autores han reportado que su inhibición confiere protección a células neuronales estresadas con compuestos oxidativos (Ying, Seigny et al. 2001). Estudios llevados a cabo en células silenciadas de PARG también mostraron una disminución de la citotoxicidad a dosis altas de H₂O₂ (0,5-1 mM) (Blenn, Althaus et al. 2006). Otras publicaciones revelaron resultados contradictorios ya que, a concentraciones bajas del agente oxidante, la eliminación de PARG tuvo un efecto protector; mientras que a concentraciones altas disminuyó la supervivencia celular, suprimiéndose la necrosis e incrementándose la apoptosis (Erdelyi, Bai et al. 2009). Por otro lado, células carentes de PARG manifestaron un aumento de la muerte celular y una alteración en la reparación de las rupturas de simple y doble cadena del ADN, destacándose una función clave de esta enzima en la respuesta al daño genómico (Ame, Fouquerel et al. 2009). Aunque el rol de PARG en la regulación de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo no ha sido develado, la alteración del ciclo de PAR daría lugar a un retraso en la reparación del genoma, lo que explicaría el aumento de la sensibilidad a los estímulos genotóxicos. Además, la acumulación de PAR disminuiría la actividad de PARP y, por consiguiente, la depleción de NAD⁺; lo que reduciría la necrosis y aumentaría la apoptosis.

A pesar de la discordancia de los resultados con los estudios de PARG, en *T. cruzi* la inhibición de la actividad de TcPARG con los inhibidores ADP-HPD y DEA disminuyó el crecimiento en un 35,7% y 37,5%, respectivamente, al cuarto día de la curva de crecimiento. Ambos compuestos produjeron un aumento de la acumulación del polímero tanto en condiciones normales como tras el tratamiento con H₂O₂, seguramente debido a una reducción del catabolismo de PAR (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013). Por otro lado, la sobre-expresión de TcPARG en cultivos de epimastigotes transgénicos provocó un aumento del 40% en el número de parásitos, en condiciones no estresantes (Vilchez Larrea, Alonso et al. 2011). Estos hallazgos son coherentes con los descritos en *T. brucei*.

PARÁSITOS PROCÍCLICOS TRANSGÉNICOS SOBRE-EXPRESANTES DE TbPARP

PARÁSITOS PROCÍCLICOS TRANSGÉNICOS SOBRE-EXPRESANTES DE TbPARP

Con el fin de obtener parásitos sobre-expresantes de TbPARP, la secuencia del gen *Tbparp* fue sub-clonada en el vector de expresión p2216 (Kelly, Reed et al. 2007);

el cual genera la proteína de fusión PARP-eYFP. La presencia del plásmido con el inserto fue chequeada por Southern blot con la misma sonda que la utilizada para la técnica de Southern blot en los parásitos procíclicos silvestres (Fig. 1A). Se observó una doble banda correspondiente al gen endógeno y al constructo, el cual es integrado en el sitio que no se transcribe entre los genes *ARNr* (Fig. 33A). La expresión del transgén fue confirmada mediante la técnica de Western blot con anticuerpos dirigidos contra GFP, que presentan reacción cruzada con eYFP (Fig. 33B). La banda de alrededor 80 kDa pertenece a la proteína recombinante conformada por la TbPARP endógena, que como se indicó en la sección “Organización genómica y expresión *in vivo* de TbPARP y TbPARG” posee un tamaño de alrededor 53 kDa, en adición al epítipo eYFP de 27 kDa en el extremo carboxilo terminal.

La curva de crecimiento demostró que la sobre-expresión de TbPARP es detrimental para la supervivencia de los parásitos procíclicos, ya que la densidad celular se redujo a más de la mitad al tercer día de inducción del cultivo (Fig. 33C).

Sorprendentemente, la sobre-expresión de TbPARP-eYFP produjo el direccionamiento de la misma hacia el núcleo, independientemente de la existencia de daño en el ADN (Fig. 34). Además, la identificación de PAR en esta organela reveló que la proteína recombinante se encontraría activa y sintetizando polímero. La inmunofluorescencia también reiteró la marca de PAR en dos puntos en la cercanía del kinetoplasto, observada en las IFIs anteriores. Pero lo más llamativo fue la co-localización de TbPARP-eYFP con el kinetoplasto. Esta novedosa ubicación de TbPARP no había podido ser registrada hasta el momento, aunque las IFIs llevadas a cabo con los preparados de las extracciones citoesqueléticas habían mostrado la presencia de la proteína en la cercanía del genoma mitocondrial (Fig. 25 y 26).

La localización extra-nuclear de TbPARP podría no solo ser un mecanismo regulatorio de la actividad de esta enzima, sino también una estrategia para derivar a la única PARP del parásito al núcleo y a la mitocondria, con el fin de mantener la integridad de ambos genomas.

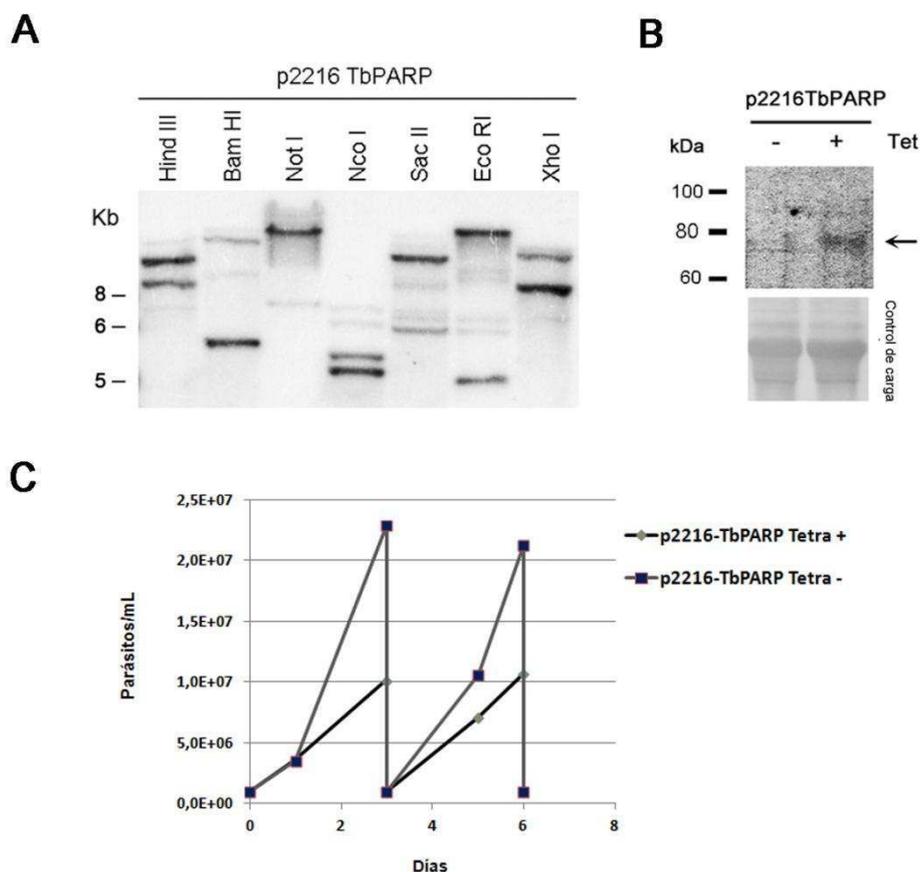


Figura 33. Procíclicos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP). **A.** Southern blot. El ADN genómico (5 µg) se digirió con las enzimas de restricción indicadas, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda correspondiente al fragmento entre las bases 582 y 1722 de la región codificante de TbPARP. Todas las enzimas cortan fuera de la región complementaria a la sonda. **B.** Análisis por Western blot al tercer día post-inducción del equivalente celular a 2×10^6 parásitos, revelados con anticuerpos anti-GFP (Santa Cruz). La membrana fue teñida con rojo Ponceau como control de carga. La flecha indica la banda correspondiente a la enzima recombinante TbPARP-eYFP. **C.** Curva de crecimiento de parásitos transgénicos (p2216-TbPARP) inducidos con tetraciclina (Tetra +) o no inducidos (Tetra -) durante 6 días, contados en cámara de Neubauer.

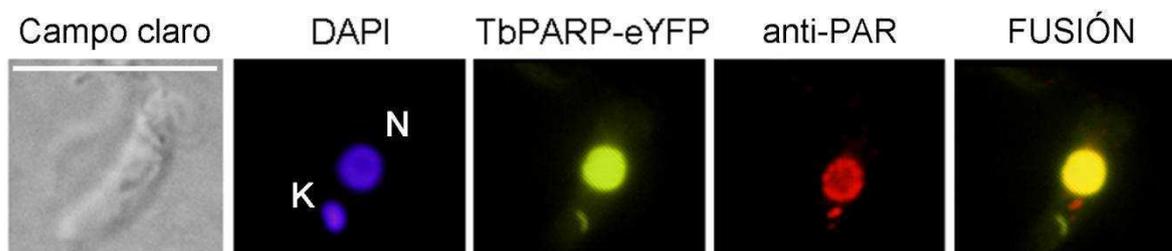


Figura 34. Inmunofluorescencia de parásitos procíclicos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP-eYFP (p2216-PARP). La localización subcelular de TbPARP y de PAR fueron detectadas con la proteína de fusión TbPARP-eYFP y los anticuerpos policlonales anti-PAR, respectivamente. El ADN nuclear (N) y kinetoplastídico (K) fueron marcados con DAPI. La barra blanca representa 10 µm.

CONSTRUCTOS TRUNCADOS DE TbPARP

GENERACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS

Para asegurarse que los efectos de la sobre-expresión de TbPARP-eYFP no correspondían a un artefacto de la técnica, parásitos procíclicos fueron transfectados con el vector vacío (p2216) para generar la proteína eYFP. Por otro lado, el impacto que provocó la expresión exacerbada de TbPARP-eYFP induciendo la activación de la enzima en ausencia de estímulo, supuso una herramienta poderosa que permitió continuar profundizando la caracterización de TbPARP. Con el fin de obtener proteínas recombinantes truncadas se generaron dos constructos adicionales: uno con el extremo amino-terminal de TbPARP (Nterm-eYFP) y el otro correspondiente a TbPARP sin este fragmento, es decir con los dominios WGR-REG-CAT (WRC-eYFP). Los insertos de los constructos comprendieron los aminoácidos 1-108 para p2216-Nterm y los aminoácidos 106-573 para p2216-WRC.

La presencia de los constructos (p2216, p2216-Nterm y p2216-WRC) en el genoma de los parásitos transgénicos fue corroborada por Southern blot (Fig. 35A), utilizando como sonda una región de 884 bases la cual incluía la secuencia codificante de eYFP. Este fragmento fue extraído del plásmido p2216 con las enzimas BamHI y EcoRV. La sobre-expresión de las proteínas recombinantes resultantes también fue chequeada por Western blot, utilizando anticuerpos anti-GFP (Fig. 35B). Si bien todas las proteínas recombinantes se expresaron al segundo día de inducción de los cultivos transgénicos, la proteína Nterm-eYFP (p2216-Nterm) lo hizo de manera más pronunciada que el resto. Dos de las tres bandas del gel coincidieron con el peso molecular teórico: eYFP (p2216) alrededor de 27 kDa y Nterm-eYFP (p2216-Nterm) de 39 kDa.

El tamaño de la banda correspondiente a la proteína WRC-eYFP (p2216-WRC) (alrededor de 78 kDa) fue levemente inferior que el esperado, de 82 kDa. A su vez, este peso molecular fue similar al obtenido para la proteína recombinante entera TbPARP-eYFP (p2216-TbPARP) (Fig. 33B). Esta evidencia apoya la teoría que TbPARP presentaría un sitio de gran propensión al clivaje en el empalme de los dominios N-terminal y WGR. Ha sido reportado que entre los dominios BRCT y WGR de la proteína hPARP-1 se encuentra un péptido de 60-residuos francamente básicos, el cual es susceptible de ser digerido por proteasas por no formar ninguna estructura terciaria particular (Huambachano, Herrera et al. 2011). En la misma calle del gel también se pudo advertir una banda más tenue, de aproximadamente 67 kDa. La

misma podría tratarse del fragmento REG-CAT de la enzima TbPARP (40 kDa), sumado al epítipo eYFP. Como se recordará, solo este fragmento había podido ser producido en la fracción soluble utilizando un sistema de expresión *in vitro*, lo que significaría que esta región podría poseer un grado de estabilidad mayor que el resto de los dominios, como el WGR-REG-CAT y el CAT.

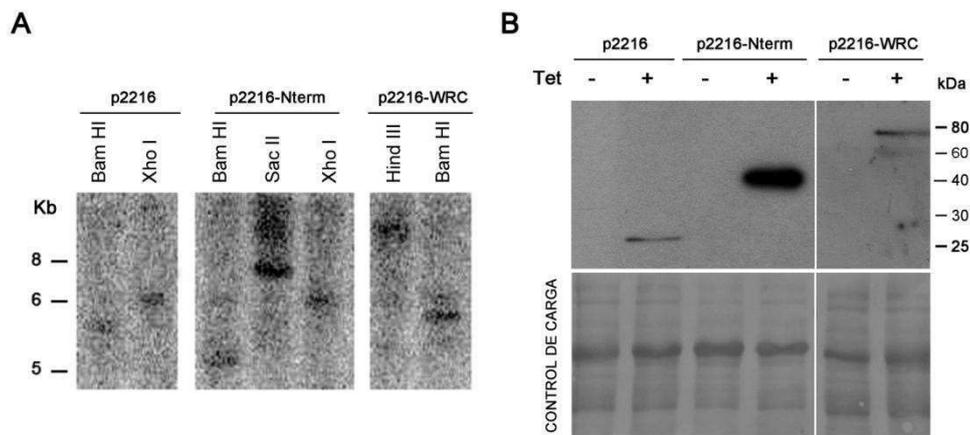


Figura 35. Procíclicos transgénicos sobre-expresantes de los constructos truncados de TbPARP. **A.** Southern blot. El ADN genómico (5 µg) se digirió con las enzimas de restricción indicadas, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con la sonda correspondiente a la región codificante de eYFP. Todas las enzimas cortan fuera de la región complementaria a la sonda. **B.** Análisis por Western blot al segundo día post-inducción del equivalente celular a 2×10^6 parásitos, revelados con anticuerpos anti-GFP (Santa Cruz). La membrana fue teñida con rojo Ponceau como control de carga.

Las curvas de crecimiento de los parásitos transgénicos variaron de acuerdo al constructo con el que fueron transfectados; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos inducidos y los controles al segundo día post-inducción (Fig. 36). Una excepción fue el cultivo que sobre-expresaba TbPARP-eYFP (p2216-PARP), ya que a este tiempo presentó una disminución en la concentración de parásitos del 14%; efecto que se acrecentó aún más al tercer día post-inducción, cuando la densidad del cultivo inducido se redujo un 50%. Mediante este experimento se probó que la disminución en el crecimiento de los parásitos procíclicos transgénicos fue causada específicamente por el efecto que tiene la sobre-expresión de la TbPARP entera, y no de cualquier proteína recombinante.

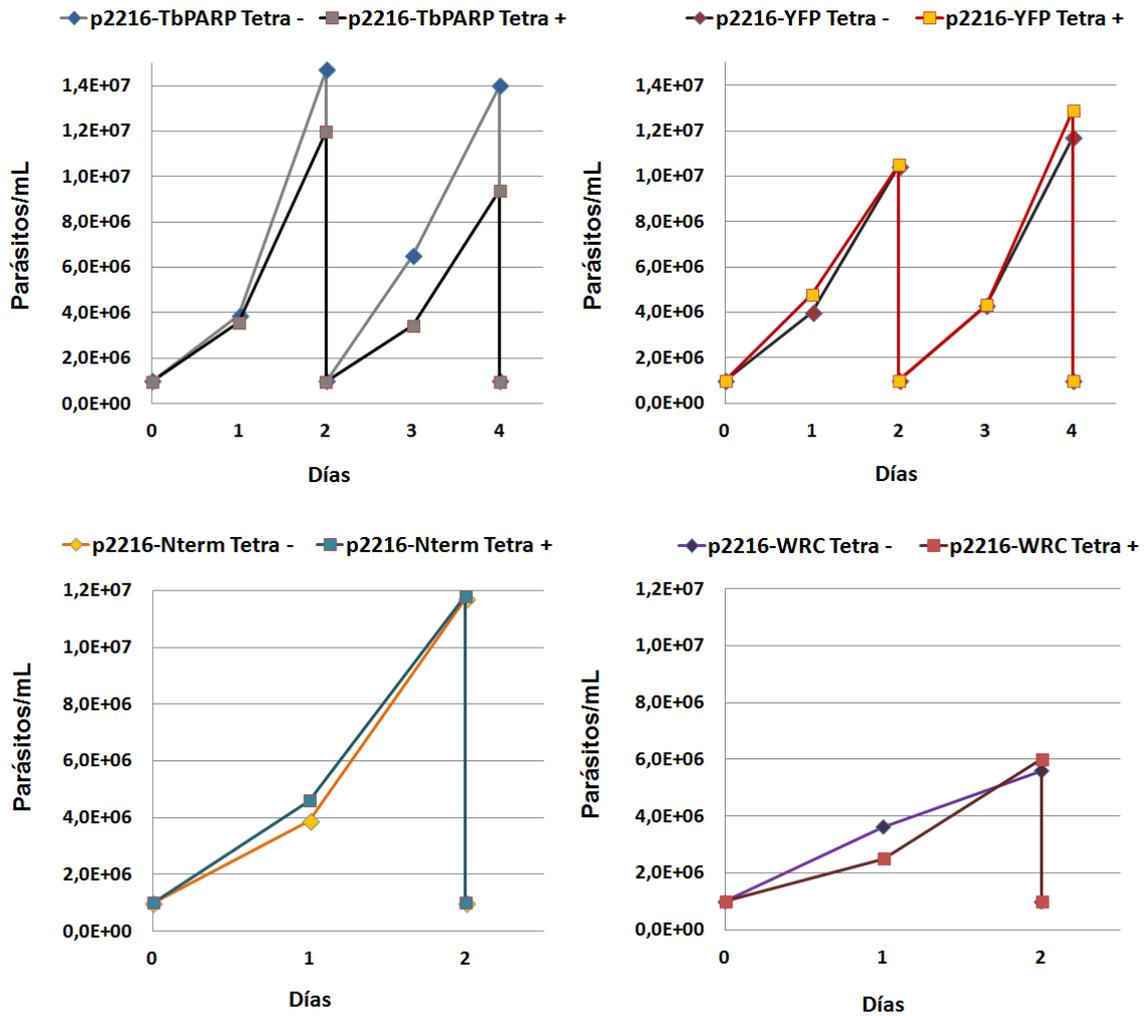


Figura 36. Curva de crecimiento de procíclicos transgénicos sobre-expresantes de los constructos p2216. La concentración de parásitos fue calculada manualmente en cámara de Neubauer a lo largo de 2 ó 4 días en parásitos inducidos y no inducidos de parásitos transgénicos: p2216-TbPARP (expresa TbPARP-eYFP), p2216 (expresa eYFP), p2216-Nterm (expresa Nterm-eYFP) y p2216-WRC (expresa WGR-REG-CAT-eYFP).

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS CONSTRUCTOS TRUNCADOS

En todos los organismos eucariotas las proteínas se dirigen al núcleo a través de un mecanismo mediado por receptor, el cual requiere de una secuencia específica de localización nuclear (NLS). El complejo proteína / receptor se transporta activamente a través del complejo del poro nuclear (NPC) y, una vez en el núcleo, se disocia; retornando el receptor al citoplasma. Existe heterogeneidad tanto al nivel de las NLSs como de los receptores específicos que las reconocen (Marchetti, Tschudi et al. 2000). El prototipo de NLS, ejemplificado por el antígeno T del virus SV40, es un péptido de siete aa caracterizado por un alto contenido de aminoácidos básicos. Una variación

consiste en una NLS bi-partita, la cual comprende dos grupos de aminoácidos básicos con una alta prevalencia de lisinas, separados por 10 aminoácidos. Un tercer tipo de NLS, denominado M9, ha sido identificado recientemente en la proteína de unión al ARN hnRNPA1 y no presenta ninguna similitud con las dos anteriores (Marchetti, Tschudi et al. 2000). Las proteínas que contienen NLS y M9 no compiten entre ellas ya que son reconocidas por diferentes receptores (Westergaard, Bercovich et al. 2010). La heterogeneidad también se refleja al nivel de los receptores transportadores con los que interaccionan las distintas NLSs. Un receptor heterodimérico, compuesto por la Importina α e Importina β , se une a las proteínas que llevan la NLS clásica. La Importina α se une a la NLS mientras que la Importina β media la unión con el NPC. Por otro lado, un único receptor monomérico denominado Transportina se une a la NLS M9 y media la importación nuclear de la hnRNPA1. Otro componente esencial involucrado en el transporte hacia el núcleo son las GTPasas relacionadas con las Ras, Ran/TC4, y sus factores regulatorios. Hasta la fecha existe muy poca información acerca de las proteínas que se dirigen hacia el núcleo en los tripanosomátidos. Se sabe que en ciertas instancias la NLS del antígeno T de SV40 puede mediar la importación nuclear en *T. brucei*; así como también existe un homólogo de Ran/TC4 en este parásito. Se ha observado que *T. cruzi*, en cambio, posee una NLS bipartita compleja compuesta por aminoácidos básicos (Marchetti, Tschudi et al. 2000).

La localización nuclear de TbPARP-eYFP y la formación de PAR en esta organela, en parásitos transgénicos (p2216-TbPARP) que no fueron desafiados con un agente genotóxico, fue un resultado llamativo (Fig. 34). Mediante un ensayo de inmunofluorescencia se demostró que para que ocurriera este acontecimiento era necesaria la presencia de TbPARP, ya que la sobre-expresión de eYFP sola no conducía a la proteína heteróloga hacia el núcleo, sino que la misma era encontrada dispersa en el citoplasma (Fig. 37). Tampoco fue detectado polímero en esta organela. Estos resultados implicaban que debía existir una señal de localización nuclear (NLS) dentro de la secuencia de TbPARP que le permitiera ser trasladada hacia el compartimento nuclear.

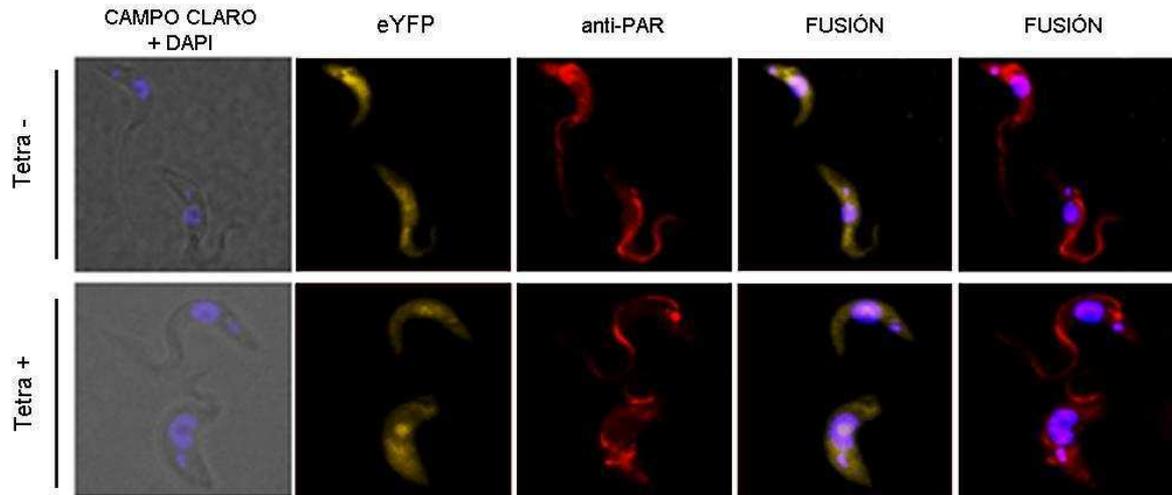


Figura 37. Inmunofluorescencia de parásitos transgénicos que sobre-expresan la proteína eYFP (vector p2216 vacío). Inmunofluorescencia de parásitos transgénicos (p2216) no inducidos (Tetra -) e inducidos con tetraciclina (Tetra +) durante 2 días. La localización subcelular de eYFP y PAR fue detectada por la fluorescencia de la proteína eYFP y con anticuerpos policlonales anti-PAR, respectivamente. El ADN nuclear y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI.

Llama la atención el alto porcentaje de aminoácidos básicos en la región amino-terminal de las enzimas de los tripanosomátidos TbPARP (28% en los primeros 90 aa) y TcPARP (27% en los primeros 70 aa); al igual que ocurre con las proteínas hPARP-2 (27 % en los primeros 64 aa) y hPARP-3 (20% en los primeros 54 aa).

Existiendo la posibilidad que una señal NLS se encontrara en el dominio amino terminal de TbPARP, rico en aminoácidos básicos, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia con parásitos transgénicos que sobre-expresaban a Nterm-eYFP (p2216-Nterm). Al igual que lo evidenciado para la TbPARP-eYFP entera, esta proteína de fusión era direccionada al núcleo, tanto en presencia como en ausencia de un agente oxidativo (Fig. 38). Por otra parte, si bien los parásitos controles (no inducidos) expuestos al tratamiento con H_2O_2 exhibieron PAR en el núcleo debido a que la TbPARP endógena estaba siendo estimulada; no pudo ser revelado lo que sucedía con el polímero en los cultivos inducidos ya que la señal fluorescente proveniente de la proteína de fusión Nterm-eYFP era tan intensa que interfería con la marca de PAR, dando falsos positivos (Fig. 38). Tampoco fue posible dilucidar si la proteína heteróloga estaba actuando como una dominante negativa en situación de estrés.

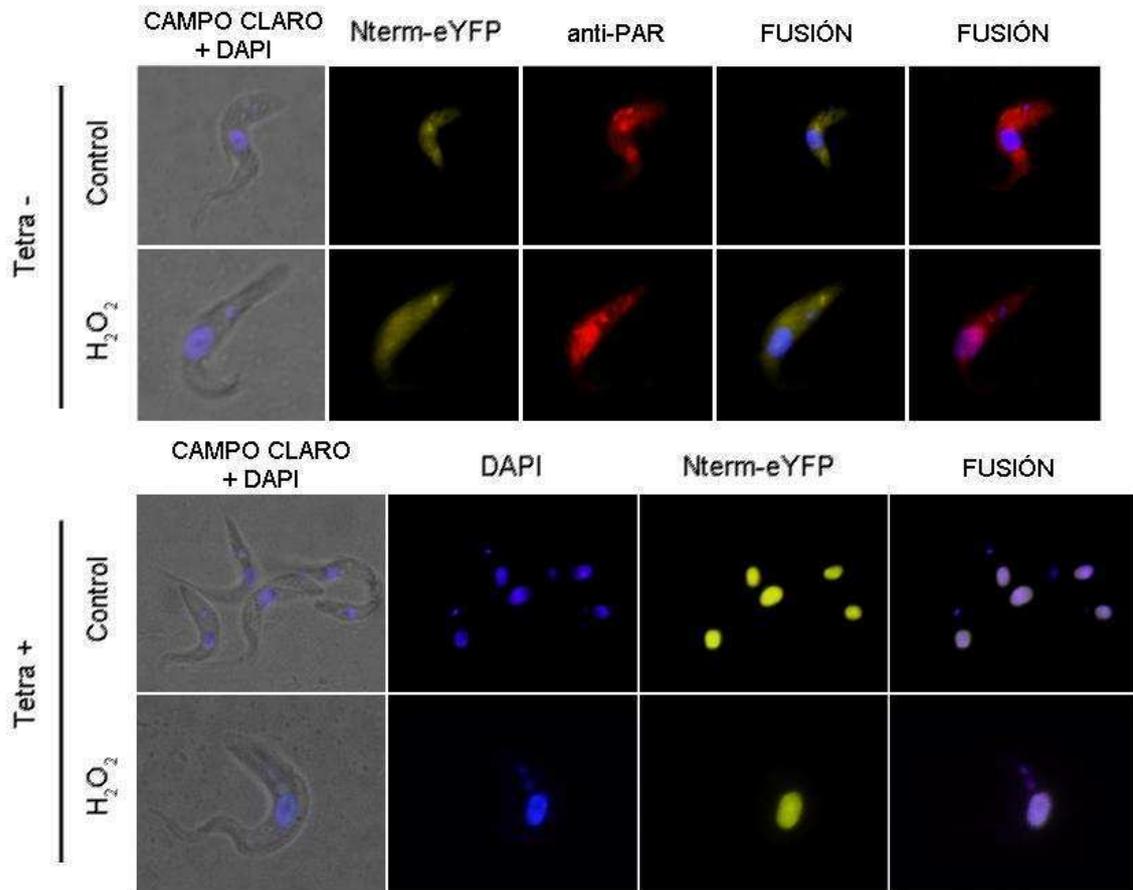


Figura 38. Inmunofluorescencia de parásitos transgénicos que sobre-expresan la proteína Nterm-eYFP (vector p2216-Nterm). Inmunofluorescencia de parásitos transgénicos no inducidos (Tetra -) e inducidos con tetraciclina (Tetra +) durante 2 días, expuestos a 500 μ M de H_2O_2 durante 10 minutos o sin tratar (control). La localización subcelular de Nterm-eYFP y de PAR fue detectada por la fluorescencia de la proteína eYFP y con anticuerpos policlonales anti-PAR, respectivamente. El ADN nuclear y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI.

La existencia de una secuencia que conduce a la proteína al núcleo dentro del dominio N-terminal de TbPARP fue corroborada aún más con la inmunofluorescencia realizada en los parásitos transgénicos p2216-WRC, ya que éstos no mostraron a WRC-eYFP en el compartimento nuclear, incluso luego del tratamiento con H_2O_2 (Fig. 39).

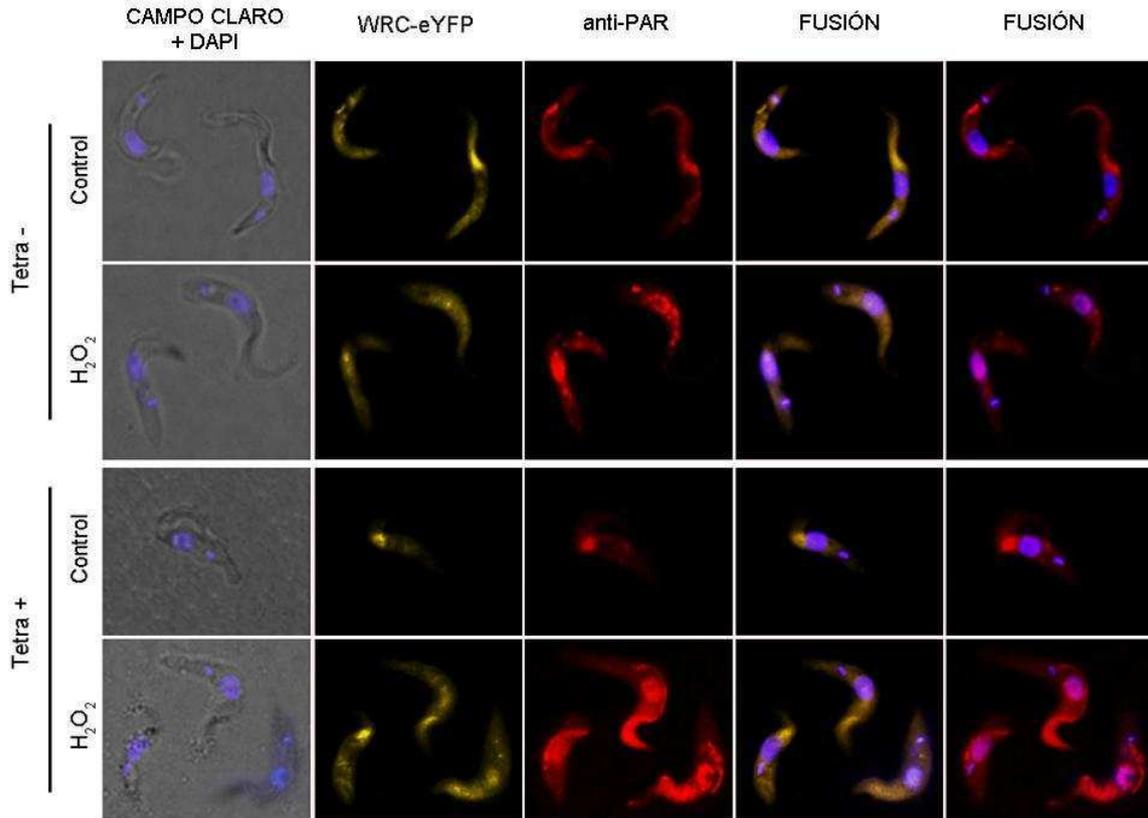


Figura 39. Inmunofluorescencia de parásitos transgénicos que sobre-expresan la proteína WRC-eYFP (vector p2216-WRC). Inmunofluorescencia de parásitos transgénicos no inducidos (Tetra -) e inducidos con tetraciclina (Tetra +) durante 2 días, expuestos a 500 μ M de H_2O_2 durante 10 minutos o sin tratar (control). La localización subcelular de WRC-eYFP y de PAR fue detectada por la fluorescencia de la proteína eYFP y con anticuerpos policlonales anti-PAR, respectivamente. El ADN nuclear y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI.

Estos experimentos también reforzaron la idea que el efecto detrimental de la sobre-expresión de la TbPARP-eYFP entera sobre la supervivencia de los cultivos transgénicos no es un hecho fortuito. La producción exacerbada de la proteína Nterm-eYFP, cuyo destino también es el núcleo, no ocasionó ningún perjuicio sobre el crecimiento de los parásitos, sirviendo como un control adicional (Fig. 36). En resumen, la disminución de la viabilidad celular en los parásitos transgénicos p2216-PARP no se debe a la sobre-expresión de una proteína aleatoria, como fue demostrado anteriormente, como tampoco se debe a la presencia exagerada de una proteína heteróloga en el núcleo; reafirmando una vez más la responsabilidad exclusiva de la síntesis exagerada de TbPARP sobre la citotoxicidad observada.

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS CON UNA EXPRESIÓN EXACERBADA DE PAR

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS SOBRE-EXPRESANTES DE TbPARP

Previamente fue demostrado que la ausencia de una TbPARP funcional no afecta la viabilidad del parásito, aunque la carencia de esta enzima le confiere resistencia cuando éste es expuesto ante un agente causal de daño. Por el contrario, la abrogación de TbPARG provoca un enlentecimiento en la curva de crecimiento y un incremento de la sensibilidad frente al tratamiento con un compuesto oxidante, sugiriendo que la acumulación de PAR podría tener un efecto detrimental para la célula.

En esta línea de razonamiento, era esperable que los parásitos transgénicos que sobre-expresaban TbPARP se comportaran de una manera similar a aquellos que no disponían de una enzima TbPARG que removiera al polímero. Esto fue, de hecho, lo que se observó cuando se realizó el mismo tratamiento y se midió la motilidad de estos parásitos. A concentraciones sub-letales de H₂O₂ (95 y 300 µM) los cultivos que presentaban una síntesis exacerbada de la proteína recombinante TbPARP-eYFP (p2216-PARP) exhibieron una mayor sensibilidad que los controles no inducidos, siendo estas diferencias significativas, en especial a la concentración de 300 µM (Fig. 40). A la misma dosis, los parásitos que sobre-expresaban a las proteínas recombinantes eYFP y Nterm-eYFP (la cual migraba al núcleo sin necesidad de ser estimulada con un agente genotóxico) también mostraron una leve disminución en la resistencia, pero este efecto era mucho más sutil que el provocado por la TbPARP-eYFP entera.

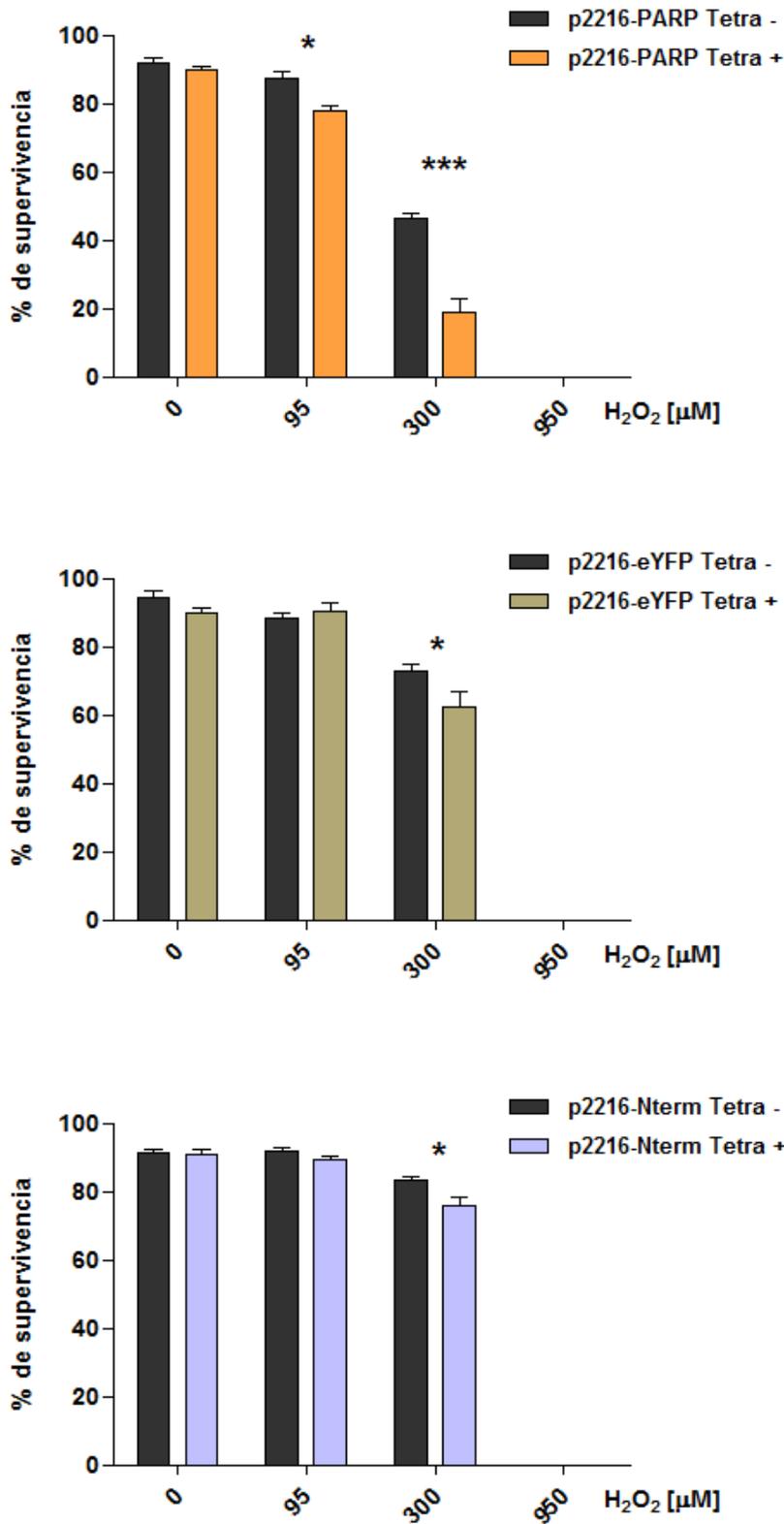


Figura 40. Supervivencia celular de cultivos de parásitos procíclicos transgénicos p2216-TbPARP, p2216-eYFP y p2216-Nterm, sometidos al tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se evaluó la supervivencia celular de los parásitos procíclicos transgénicos al segundo día de inducción (Tet +) y sin inducir (Tet -) mediante la medición de la motilidad a las 6 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂. Todos los puntos se determinaron por triplicado y se muestran las medias con sus desviaciones estándar. También se indica la significancia del resultado respecto al control (***, p <0,001; **, p <0,01; *, p <0,05), analizado con el método estadístico ANOVA.

Al igual que se evidenció en los parásitos transgénicos ARNi-TbPARG, no se reportaron diferencias en el porcentaje de viabilidad entre los cultivos inducidos y controles de los procíclicos transgénicos p2216-PARP (TbPARP-eYFP) a la concentración de 0 μM de H_2O_2 (Fig. 40); indicando que la reducción de la concentración de parásitos en la curva de crecimiento sería la consecuencia de un enlentecimiento en la progresión del ciclo celular y no de un aumento en la mortalidad.

Bajo condiciones de estrés, la activación de PARP ha demostrado tener un rol dual ya que puede actuar como un mecanismo protector cuando niveles bajos de daño tienen lugar, o inducir la pérdida de viabilidad cuando el estímulo genotóxico es sustancial. Además, cuando esto último ocurre, ha sido extensamente demostrado que PAR actúa como un interruptor entre distintos caminos de muerte celular (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013). La inhibición de PARP podría prevenir la disminución de NAD^+ y, por ende, impedir el agotamiento de las reservas de energía (Blenn, Althaus et al. 2006), lo que conferiría un efecto protector a altas concentraciones de H_2O_2 , o un aumento de la muerte celular de tipo apoptótica sobre la necrótica. Los resultados obtenidos con Olaparib, el silenciamiento de TbPARP y TbPARG, y la sobreexpresión de TbPARP concuerdan con esta lógica.

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PARÁSITOS PROCÍCLICOS SOBRE-EXPRESANTES DE TbPARP

Hasta ahora fue observado que la carencia de TbPARG y la expresión exacerbada de TbPARP resultan detrimental para la viabilidad del parásito, un proceso que es acelerado por el estrés provocado con compuestos genotóxicos. Además, se demostró que la TbPARP endógena es citoplasmática, y se activa y transloca al núcleo una vez que es estimulada con un agente causal de daño del material genético. TbPARG, por el contrario, reside en el núcleo independientemente de la presencia de rupturas en el genoma. Ambas enzimas convergen en el metabolismo de PAR, y el polímero es sintetizado en el núcleo tras la migración de TbPARP a esta organela. La sobre-expresión de TbPARP confirmó este resultado, siendo en este caso su síntesis exacerbada la desencadenante de la producción nuclear de PAR. La acumulación de polímero en el núcleo también podría ser provocada por la ausencia de TbPARG, cuya función comprende la remoción de las unidades de ADP-ribosa que lo forman. Teniendo en cuenta estos datos, se pensó que el fenotipo de los parásitos transgénicos podría estar relacionado con una variación de los niveles de PAR en el parásito.

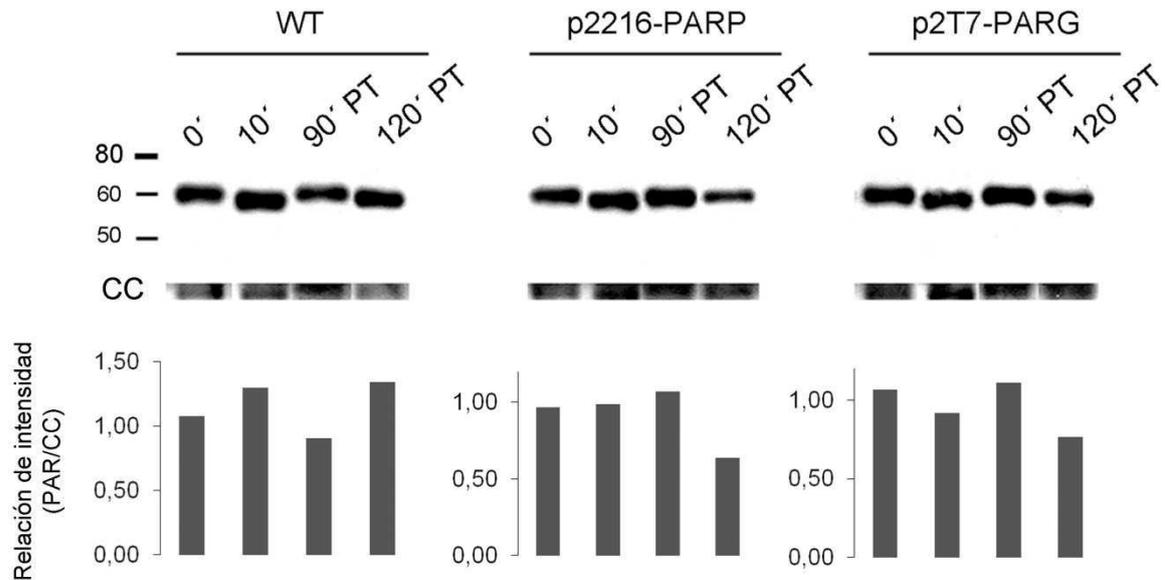


Figura 41. Respuesta de PAR en cultivos procíclicos sometidos al tratamiento con H_2O_2 . Parásitos wild type (WT) y transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) y con la TbPARG silenciada (p2T7-PARG) fueron analizados por Western-blot para evaluar la respuesta de PAR frente a la exposición con 1 mM de H_2O_2 durante 10 minutos. Se tomaron muestras a distintos tiempos durante y luego del tratamiento (PT), y se identificó a PAR con anticuerpos anti-PAR específicos (BD). Los datos fueron normalizados con la intensidad de la banda del control de carga (CC) obtenida con anticuerpos anti- α tubulina, y se muestra la relación de ambas señales.

Para examinar en profundidad el efecto del H_2O_2 sobre la alteración del metabolismo de PAR, los parásitos fueron tratados con 1 mM de este compuesto y la aparición del polímero fue evaluada a distintos tiempos por Western blot (Fig. 41). En parásitos *wild type*, la cantidad de PAR se incrementó a los 10 minutos de tratamiento, disminuyendo parcialmente a los 90 minutos. Los niveles del polímero aumentaron nuevamente a los 120 minutos, probablemente debido a la persistencia del daño en el ADN. Esto concuerda con lo evidenciado previamente por IFI en la cinética de PAR de los parásitos procíclicos tratados con H_2O_2 (Fig. 18).

Los parásitos silvestres presentaron niveles basales de PAR altos (tiempo 0, Fig. 41), exhibiendo éstos una localización citoplasmática (Fig. 23). Tras un estímulo genotóxico, polímero adicional es sintetizado en el núcleo lo que explicaría, al menos en parte, el incremento de los niveles de PAR observado por Western blot a los 10 minutos de tratamiento (Fig. 41). Al compararse la dinámica de la síntesis y degradación de PAR de los parásitos transgénicos (cultivos sobre-expresantes de TbPARP y silenciados de TbPARG) con la de los cultivos silvestres, se detectó un

patrón diferente en la cantidad de polímero a los 90 y 120 minutos post-tratamiento. Por lo tanto, una de las causas por la cual la capacidad de respuesta frente al daño genotóxico está afectada en los parásitos transgénicos podría deberse a una alteración en los niveles de PAR.

EFFECTO DEL NIVEL DE PAR NUCLEAR SOBRE EL CAMINO DE MUERTE CELULAR

Es sabido que el H₂O₂ puede conducir a una muerte celular de tipo apoptótica o necrótica, dependiendo de la concentración del agente oxidante utilizada y/o del tipo celular en cuestión. PAR ha demostrado jugar un rol activo en respuesta a tipos particulares de daño en el ADN, actuando además como un interruptor entre los caminos de supervivencia y muerte celular (Burkle and Virag 2013). Este mecanismo fue descrito anteriormente por nuestro grupo de trabajo en *T. cruzi* (Vilchez Larrea, Alonso et al. 2011), donde PARP cumple distintas funciones en la señalización de la avería genómica.

Con el fin de descifrar el mecanismo a través del cual el H₂O₂ podría inducir la muerte celular en estos parásitos, cultivos *wild type* y transgénicos (p2216-PARP y p2T7-PARG) fueron analizados por la redistribución de sus fosfolípidos y por la incorporación de yoduro de propidio en el interior de la célula con la técnica de citometría de flujo.

Las anexinas son una familia de proteínas dependientes de Ca²⁺ que se unen a fosfolípidos, preferencialmente a fosfatidil-serina. Bajo condiciones fisiológicas normales, la fosfatidil-serina se encuentra localizada predominantemente en la cara interna de la membrana plasmática. Tras la iniciación de la apoptosis, la fosfatidil-serina pierde su distribución asimétrica a lo largo de la bicapa lipídica y transloca a la cara externa de la membrana, marcando a las células como un blanco de fagocitosis. Una vez alojada en la superficie extracelular, la fosfatidil-serina puede ser detectada por medio de Anexina V conjugada al compuesto fluorescente isocianato de fluoresceína (FITC). En estadios tempranos de la apoptosis, sin embargo, la membrana plasmática permanece íntegra; por lo que excluye a colorantes vitales como el yoduro de propidio. En células que están atravesando un proceso necrótico, en cambio, la membrana se encuentra comprometida por lo que el yoduro de propidio puede ingresar a la célula y teñir al ADN. La señal de la Anexina V en este caso no es positiva. En estadios tardíos de muerte celular la membrana se permeabiliza completamente, permitiendo el acceso tanto de la Anexina V como del colorante vital

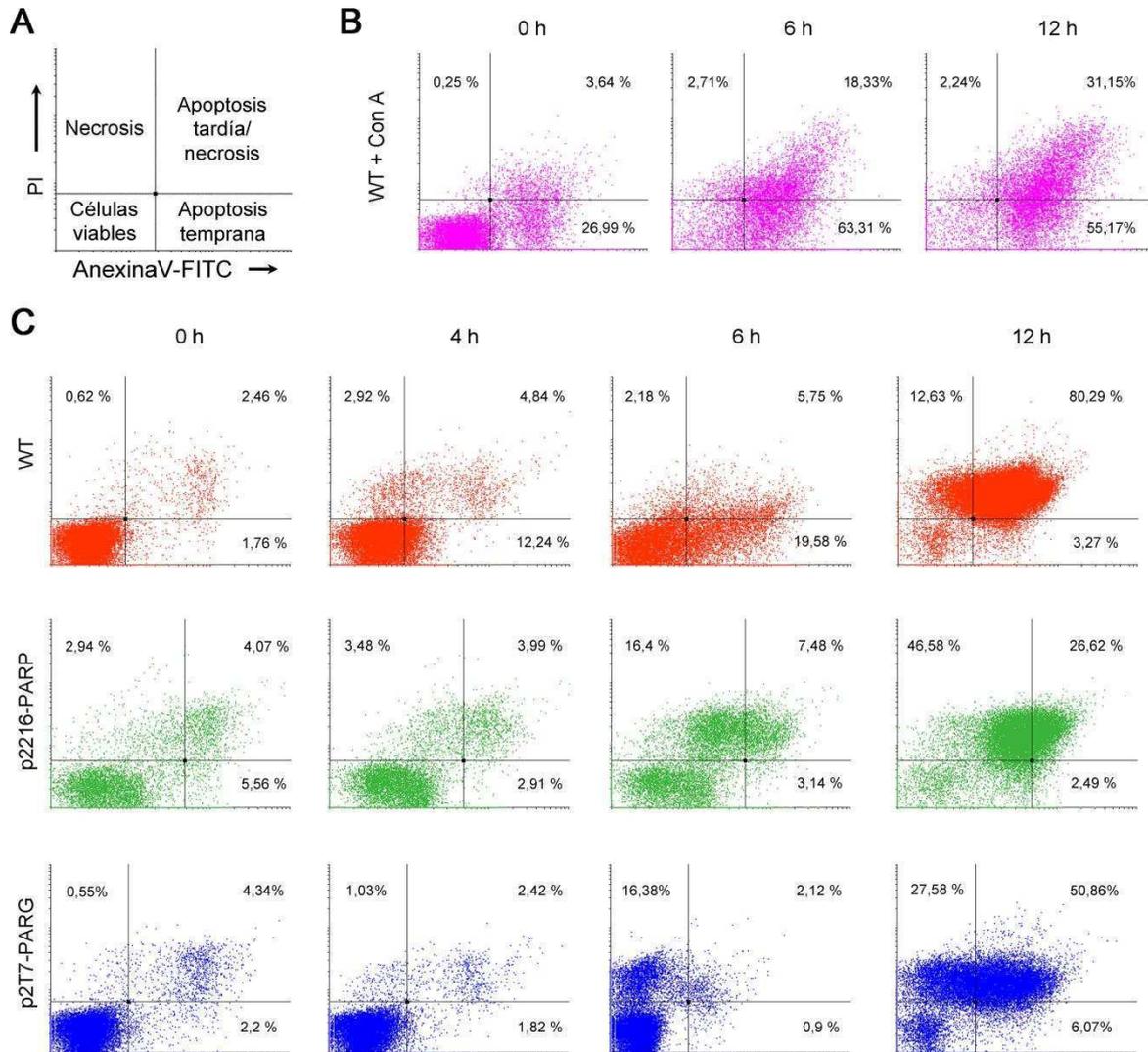


Figura 42. Valoración del tipo de muerte celular por citometría de flujo. **A.** El diagrama muestra las distintas poblaciones celulares que pueden ser detectadas por tinción con Ioduro de propidio (PI) y con el conjugado de AnexinaV-FITC. **B.** Como control de apoptosis-like los cultivos wild type fueron tratados con 10 µg/mL de Conavalina A (Con A). **C.** Diagrama de la citometría de flujo de parásitos procíclicos wild type, sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) y silenciados para TbPARP (p2T7-PARG) tratados con 1 mM de H₂O₂ a diferentes intervalos de tiempo. El cuadrante inferior izquierdo muestra las células viables y fue definido para cada cultivo al tiempo 0 (control) (nótese que este cuadrante está corrido hacia la derecha en el cultivo p2216-PARP debido a que el mismo posee una fluorescencia intrínseca proveniente de la proteína de fusión PARP-eYFP). También se detalla el porcentaje de la población celular que hay en cada cuadrante.

al interior celular. En células viables, por el contrario, ambas señales son negativas (Fig. 42A).

La Conavalina A es conocida por causar una muerte apoptosis-like en *T. brucei* (Welburn, Dale et al. 1996) (Welburn, Barcinski et al. 1997), por lo que cultivos *wild*

type fueron tratados con esta lectina (10 µg/mL) a modo de control. Éstos presentaron una respuesta típica de apoptosis con un incremento en la incorporación de Anexina V (Fig. 42B). Un patrón similar al del control positivo fue observado para los parásitos silvestres tras 6 horas de tratamiento con H₂O₂ (Fig. 42C). Sin embargo, cuando las células con el metabolismo de PAR alterado (parásitos sobre-expresantes de TbPARP, p2216-PARP; y parásitos silenciados para TbPARG, p2T7-PARG) fueron expuestas al mismo inductor de daño, un aumento en la incorporación de yoduro de propidio fue observado para ambos cultivos transgénicos, indicando en este caso un mecanismo de muerte celular de tipo necrótico (Fig. 42C).

Ya se habló sobre la dualidad de PAR como actor central en la supervivencia y muerte celular. El polímero, además, actúa como un interruptor molecular entre los tipos de muerte celular apoptótica y necrótica (Burkle and Virag 2013). Se ha reportado que un aumento en la síntesis de PAR, producto de una sobre-activación de PARP, agotaría las reservas de NAD⁺ y provocaría el vaciamiento de ATP en la célula, induciendo el camino necrótico de muerte celular. Aquí demostramos que no solo la producción exacerbada de PAR desencadena un mecanismo necrótico de muerte celular (parásitos transgénicos que sobre-expresan TbPARP), sino que su acumulación en la célula también puede conducir al mismo destino (parásitos transgénicos silenciados para TbPARG). Dicha acumulación tiene una localización subcelular particular: el núcleo; como fue observado en parásitos transgénicos p2216-PARP (Fig. 34), y como se verá más adelante en parásitos transgénicos p2T7-PARG (Fig. 48). La acción tóxica de PAR por su presencia *per se* ya fue descrita previamente (Andrabi, Kim et al. 2006). De los resultados de estos experimentos se desprende que TbPARP y TbPARG pueden mediar el cambio de apoptosis-like a necrosis mediante la alteración de los niveles de PAR y la acumulación de polímero en el núcleo.

En los últimos años se ha reordenado la clasificación de las distintas vías de muerte celular. Para la categorización actual, PARthanatos es una subruta del proceso de necroptosis (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013). La misma surge como alternativa a la catástrofe energética celular inducida por PARilación e hiper-activación de hPARP-1 que acontece en la necrosis. Las células sometidas a PARthanatos comparten características con aquellas que manifiestan un mecanismo de apoptosis, como la externalización de fosfatidilserina, la disipación del potencial de membrana mitocondrial, la condensación de la cromatina y el encogimiento. Sin embargo, en contraste con el proceso de muerte apoptótico, el mecanismo de PARthanatos está

acompañado por una pérdida de la integridad de la membrana celular (pero sin hinchamiento de la célula), fragmentación del ADN a gran escala (~50 kb) y falta de dependencia energética o de activación de caspasas. Se cree que en esta subruta PAR abandona el núcleo y desencadena la liberación del factor inductor de apoptosis AIF (ahora considerado un mediador de necrosis) desde la mitocondria. Luego, éste transloca hacia el núcleo donde estimula la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en grandes segmentos (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013). Las dos endonucleasas involucradas en la fragmentación del ADN por la vía de activación independiente de caspasas son AIF y endonucleasa G (EndoG) (van Zandbergen, Luder et al. 2010). Hasta la fecha no ha sido identificado un ortólogo de AIF en estos tripanosomátidos, pero la translocación de EndoG desde la mitocondria hacia el núcleo fue evidenciada en *L. infantum* y la pérdida de la expresión de esta endonucleasa le confirió a *T. brucei* una robusta resistencia frente a la muerte celular dependiente de ROS (van Zandbergen, Luder et al. 2010). Varios hallazgos sugieren que el mantenimiento de un equilibrio redox intracelular tiene un rol crucial en las decisiones de vida/muerte en ambas formas de *T. brucei*, y sugieren que las ROS actuarían como mediadores en la vía de señalización de la muerte celular programada (Duszenko, Figarella et al. 2006). Dicho de otro modo, se cree que los protozoarios poseen un mecanismo más bien primitivo de apoptosis que no depende de proteasas como las caspasas, sino más bien de la formación de ROS (Duszenko, Figarella et al. 2006). Como se puede apreciar, aún queda mucho por investigar para dilucidar el mecanismo de muerte celular desencadenado en estos experimentos.

En resumen, un metabolismo de PAR alterado, con una acumulación de polímero en el núcleo, tiene consecuencias negativas sobre el cultivo de parásitos procíclicos de *T. brucei*; un desenlace que es acelerado por un estímulo genotóxico. De la actividad de TbPARP y TbPARG dependerá la vía de muerte celular que se desencadenará tras el estrés oxidativo.

CICLO CELULAR EN PROCÍCLICOS DE *T. brucei*

CICLO DE VIDA DE LOS PARÁSITOS PROCÍCLICOS DE *T. brucei*

En condiciones normales, las curvas de crecimiento de los cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) y silenciados para TbPARG (p2T7-PARG) exhibieron un retraso de alrededor del 50% al tercer día de inducción (Fig. 31 y 33C). Sin embargo, no se presentaron diferencias en el porcentaje de viabilidad entre los cultivos inducidos y los controles a la concentración de 0 μ M de H₂O₂ en los

ensayos de supervivencia frente al estrés oxidativo (Fig. 32 y 40); indicando que la reducción en la concentración de parásitos durante el crecimiento del cultivo se debía a un retraso en la progresión del ciclo celular y no a un aumento en la mortalidad. Se decidió entonces indagar acerca del rol que cumplirían las enzimas TbPARP y TbPARG en el crecimiento y la división celular.

Las características del ciclo celular de los parásitos procíclicos se describen en la figura 43 A. A diferencia de otros eucariotas, muchas estructuras subcelulares y organelas tales como la mitocondria, el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y el flagelo están presentes como copia única en la fase G_1 y deben ser duplicadas en momentos definidos de la división celular (Archer, Inchaustegui et al. 2011). Brevemente, al finalizar la etapa G_1 el kinetoplasto ya se ha duplicado y el cuerpo pro-basal ha evolucionado en un cuerpo basal maduro. Durante la fase S el ADN nuclear se replica, mientras los kinetoplastos comienzan a separarse, cada uno con su cuerpo basal y pro-basal. También se inicia la formación del flagelo nuevo. Al comienzo de la fase G_2/M los kinetoplastos ya están distinguiblemente distanciados y se produce la división nuclear, previa formación del huso mitótico. El flagelo nuevo continúa elongándose y al final de la etapa G_2/M se produce la citocinesis.

Con el objetivo de evaluar si la velocidad de crecimiento se encontraba afectada en alguna fase particular del ciclo celular, ambos cultivos transgénicos fueron sincronizados. La hidroxurea (HU) inhibe a la ribonucleótido-reductasa, una enzima involucrada en la síntesis del deoxinucleótido trifosfato (dNTP). Este compuesto ha sido utilizado para sincronizar diversos tipos celulares (Davis, Ho et al. 2001), dentro de los cuales se encuentran otros kinetoplastos como *Crithidia fasciculata* (Cosgrove, Skeen et al. 1979; Pasion, Brown et al. 1994), *Leishmania tarentolae* (Simpson and Braly 1970), *Leishmania major* (Zick, Onn et al. 2005), *Leishmania infantum* (Soto, Quijada et al. 2000) y *Trypanosoma cruzi* (Galanti, Dvorak et al. 1994). En el caso de los parásitos procíclicos de *T. brucei*, los cultivos son incubados con 0,2 mM de HU durante 12 horas. Ha sido reportado que en estos microorganismos el arresto se produce al final de la fase S, en contraposición con otras células que se arrestan en la transición G_1/S . Tras la eliminación de este compuesto, los parásitos desarrestados permanecen sincronizados alrededor de 12 horas, pudiéndose identificar las distintas fases del ciclo celular mediante la tinción con yoduro de propidio, seguido del análisis por citometría de flujo. Durante las primeras 4 horas, los parásitos terminan de transitar la fase S e ingresan a la fase G_2/M . En las siguientes 4 horas (de 4 a 8 horas), los cultivos atraviesan la fase G_1 , lo que da comienzo a un nuevo ciclo. En las últimas

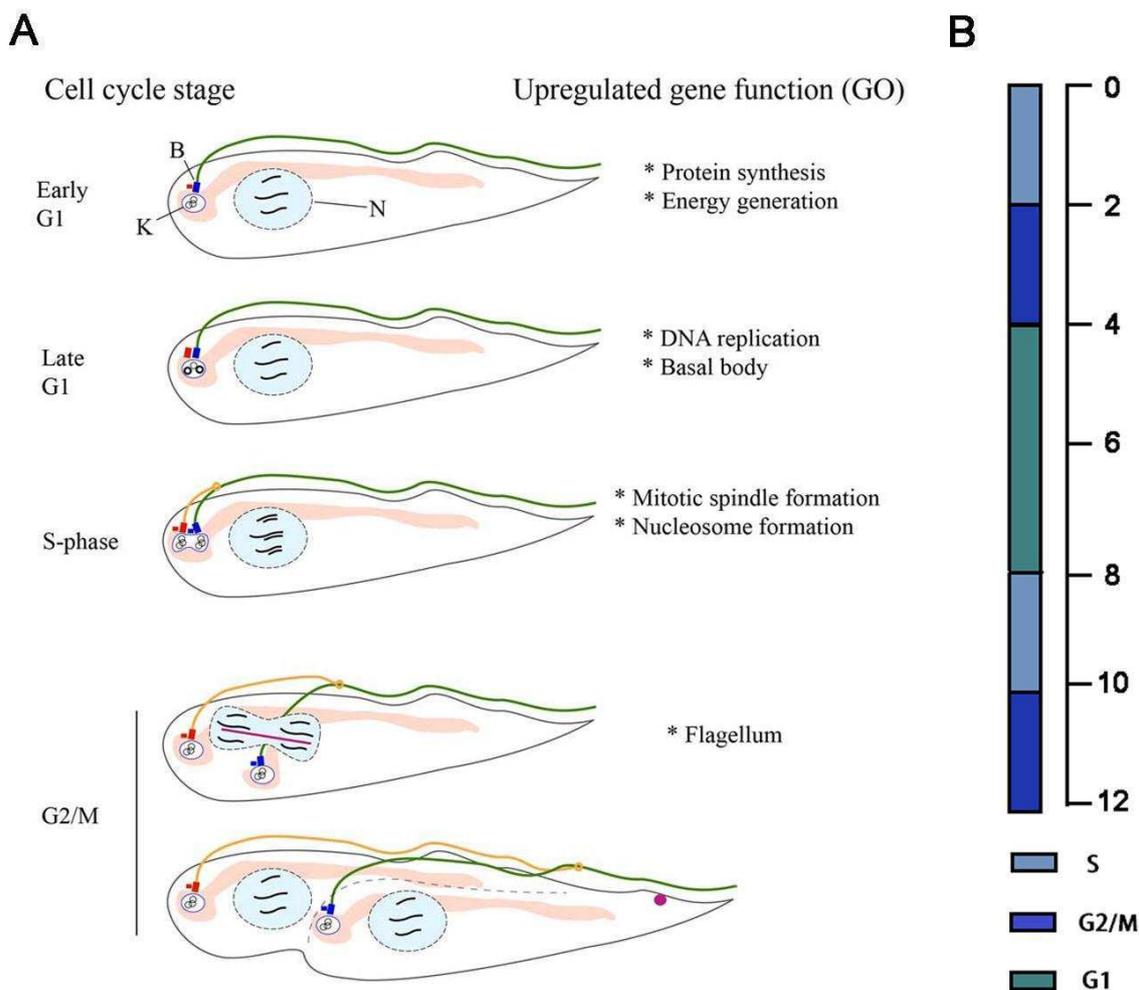


Figura 43. Ciclo celular en parásitos procíclicos de *T. brucei*. **A.** Diagrama extraído del trabajo “The Cell Cycle Regulated Transcriptome of *Trypanosoma brucei*” (Archer, Inchaustegui et al. 2011). Relación entre la formación de los componentes celulares y la expresión génica regulada por el ciclo celular. Derecha: resumen de las funciones de los genes up-regulados, como sugiere el análisis de GO. Izquierda: Representación gráfica de las células a lo largo del ciclo celular. K: kinetoplasto. N: Núcleo. B: Cuerpo basal (rectángulo azul) y cuerpo pro-basal (rectángulo rojo). La mitocondria se representa en rosa claro y el flagelo antiguo en verde, emergiendo desde el extremo posterior de la célula y atado a la cara dorsal a lo largo de toda su longitud. Al finalizar la fase G1, el cuerpo pro-basal (rectángulo rojo) se convierte en un cuerpo basal maduro que se localiza en la base del nuevo flagelo; el kinetoplasto ya se encuentra en la fase S. En esta fase, el nuevo flagelo (naranja) comienza a elongarse anclado al viejo flagelo por una estructura conectora móvil (círculo naranja), mientras se separan los kinetoplastos con los cuerpos basales. Tras la replicación del ADN, se forma un huso mitótico intranuclear (línea rosa) y las células entran en mitosis. Antes de la citocinesis, el Complejo de pasajeros cromosómicos se traslada desde el huso mitótico a la parte anterior de la célula (círculo rosa, diagrama inferior), desde donde se mueve con el surco citocinético hacia la zona posterior (línea punteada). **B.** Diagrama del tiempo en horas que dura cada etapa del ciclo celular. El tiempo de duplicación promedio es de 8 horas.

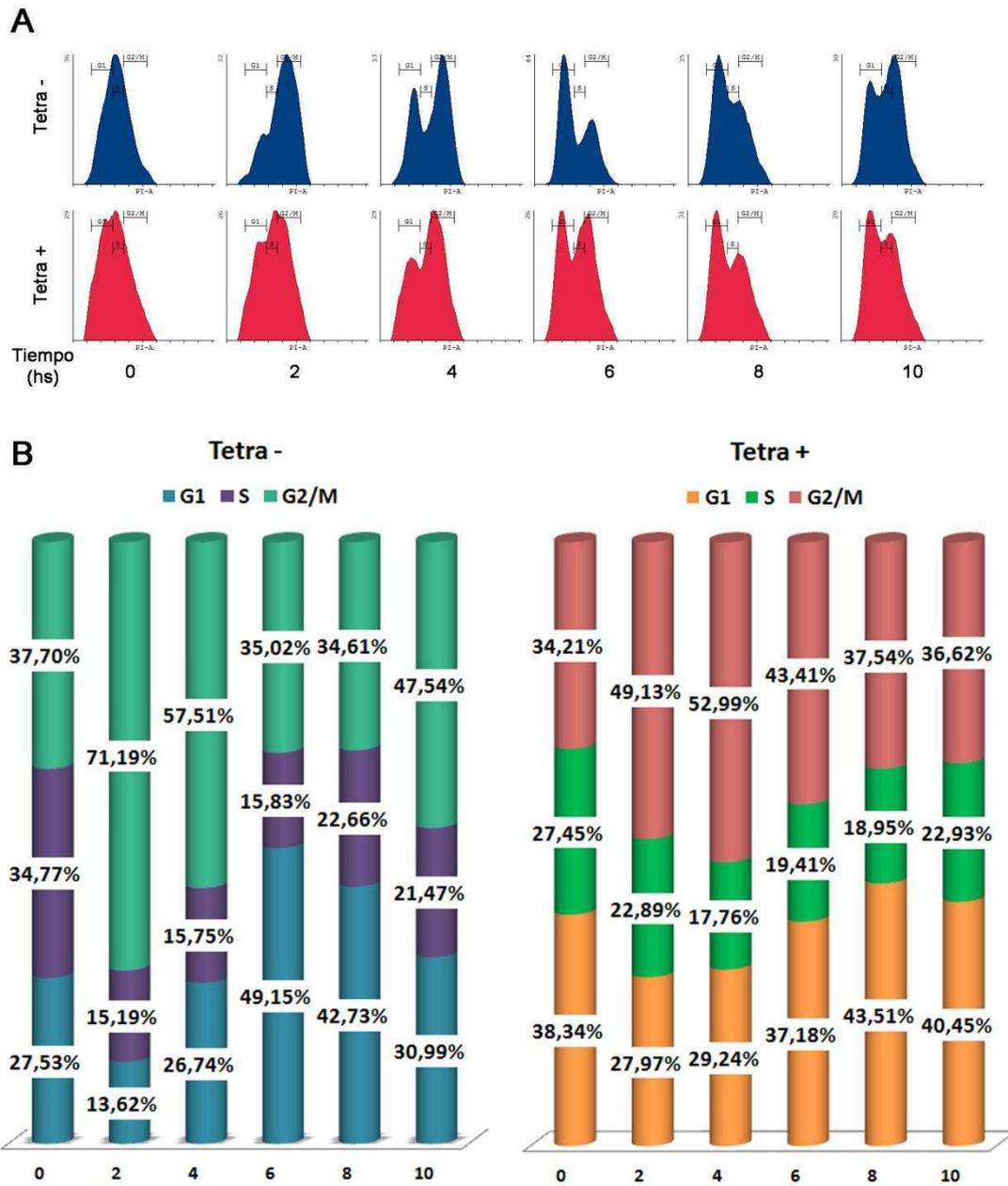


Figura 44. Ciclo celular de cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) sincronizados con hidroxIUrea. Cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) inducidos durante 3 días (tetra +) y no inducidos (tetra -) fueron sincronizados con 0,2 mM de hidroxIUrea durante 12 horas. Tras desarrestar los parásitos, se tomaron muestras cada dos horas. **A.** Histogramas que muestran el perfil de la progresión del ciclo celular monitoreada por citometría de flujo en función de la señal de fluorescencia del ioduro de propidio (IP). **B.** Los gráficos de barra muestran las subpoblaciones correspondientes a las fases G₁, S y G₂/M del ciclo celular a cada tiempo, expresadas como porcentajes.

horas (de 8 a 12 horas) los cultivos pierden gradualmente la sincronía mientras recorren las etapas S y G₂/M (Chowdhury, Zhao et al. 2008) (Fig. 43B). Luego de ser inducidos durante tres días, los cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP-eYFP (p2216-PARP) fueron sincronizados con el método descrito en el párrafo anterior. Tras su desarresto, los parásitos controles (no inducidos) presentaron una subpoblación mayoritaria en la fase S y G₂/M al tiempo 0. Esta última se incrementó a las 2 horas, disminuyendo la cantidad de parásitos que atravesaban las etapas G₁ y S. A partir de las 4 horas, la subpoblación de G₁ comenzó a aumentar, dando inicio a un nuevo ciclo. A partir de las 8 horas comenzó a incrementarse nuevamente la proporción de parásitos en la fase S, y más tarde en la G₂/M (Fig. 44 A y B).

A pesar que los cultivos inducidos presentaron, aunque retrasada, la misma tendencia que los cultivos controles; los mismos sufrieron una mayor acumulación de la subpoblación G₁ a las 0, 2 y 10 horas (Figura 44 A y B). Este experimento fue llevado a cabo tres veces de manera independiente y en todos los casos se obtuvo el mismo resultado. En la figura 44 se muestra el ensayo más representativo de los tres.

En el caso de los cultivos controles de los parásitos transgénicos cuya TbPARG se encontraba silenciada (p2T7-PARG), se observó un patrón similar al de los cultivos p2216-PARP no inducidos. Dentro de las primeras 2 horas se produjo un incremento de la proporción de parásitos en las fases S y G₂/M. A partir de las 3 horas esta tendencia cambió, comenzando a aumentar la subpoblación G₁, para llegar a su punto culmine a las 6 horas. A las 7 horas fue la cantidad de parásitos atravesando la fase S y, sobre todo, G₂/M la que se incrementó; algo que no había sido percibido en el experimento anterior por obtener las muestras a mayores intervalos de tiempo. A las 8 horas se comenzaron a incrementar las subpoblaciones de las fases G₁ y S (Fig. 45 A y B).

Los cultivos transgénicos p2T7-PARG inducidos también parecieron haber sufrido un retraso en el avance de la transición G₁/S, dando como resultado un aumento de la subpoblación G₁ respecto al cultivo control a las 7 y 8 horas. Hasta las 6 horas, sin embargo, no se observaron diferencias apreciables entre ambos cultivos (Fig. 45 A y B).

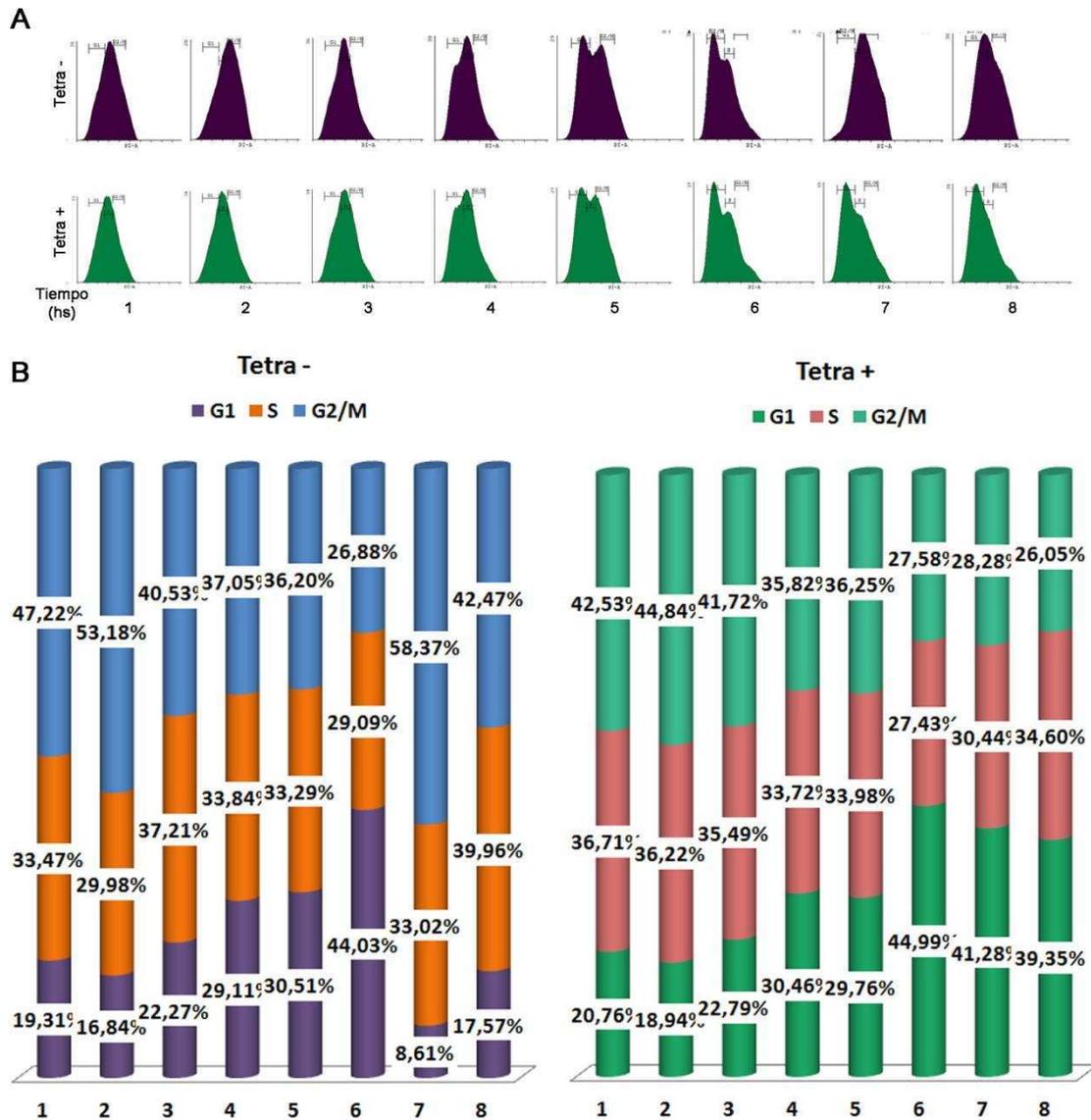


Figura 45. Ciclo celular de cultivos transgénicos silenciados para TbPARG (p2T7-PARG) sincronizados con hidroxIUrea. Cultivos transgénicos silenciados para TbPARG (p2T7-PARG) inducidos durante 3 días (tetra +) y no inducidos (tetra -) fueron sincronizados con 0,2 mM de hidroxIUrea durante 12 horas. Tras desarrestar los parásitos, se tomaron muestras cada una hora. **A.** Histogramas que muestran el perfil de la progresión del ciclo celular monitoreada por citometría de flujo en función de la señal de fluorescencia del yoduro de propidio (IP). **B.** Los gráficos de barra muestran las subpoblaciones correspondientes a las fases G₁, S y G₂/M del ciclo celular a cada tiempo, expresadas como porcentajes.

La localización de la proteína heteróloga TbPARP-eYFP fue chequeada por inmunofluorescencia durante la progresión del ciclo celular de los parásitos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) sincronizados (Fig. 46); como también fue rastreada la ubicación de PAR (Fig. 47). Tanto la marca de la proteína como del

polímero fue reconocida en el núcleo de los parásitos inducidos a lo largo de todas las fases del ciclo. Asimismo, la señal de PAR también fue detectada dentro de esta organela en todas las etapas de los transfectantes p2T7-PARG inducidos, a diferencia de los cultivos controles donde el polímero se hallaba en sitios puntuales del citoplasma (Fig. 48). Una posible explicación que justificaría la localización nuclear del polímero residiría en la hidroxurea con la cual se sincronizaron los cultivos. La misma, al alterar la replicación del genoma y causar daños en el ADN, estimularía la activación de la TbPARP endógena. Al carecer estos parásitos de la enzima que degrada al polímero, el mismo persistiría en el núcleo por un tiempo más prolongado. Sin embargo, el retraso en la velocidad de la curva de crecimiento del cultivo debe obedecer a otras causas. Un trabajo publicado recientemente ha demostrado que el estrés replicativo provoca el detenimiento de las horquillas de replicación y, cuando esta interrupción es prolongada, el mismo se resuelve por recombinación homóloga; arrestándose el ciclo en la fase S. En este punto PARG juega un rol crítico controlando finamente los niveles de PAR producidos, y su ausencia es detrimental para la célula (Illuzzi, Fouquerel et al. 2014).

Previamente había sido observada una co-localización entre TbPARP y el cuerpo basal en parásitos *wild type*, además de la existencia de una señal de PAR puntual en la cercanía del kinetoplasto (Fig. 25, 26 y 27). En estos experimentos la presencia del polímero en esta zona fue reafirmada y, en efecto, se hizo evidente como éste acompaña la migración del kinetoplasto (Fig. 47, p2216-PARP tetra -).

Por último, si bien el polímero está presente en el núcleo de los parásitos transgénicos que sobre-expresan TbPARP y tienen silenciada a TbPARG durante todo el ciclo celular, éste solo parecería afectar su progresión en la transición de las fases G₁/S. En los tripanosomátidos fueron identificadas al menos 10 ciclinas y 11 kinasas relacionadas con Cdc2 (Hammarton, Kramer et al. 2007), algunas de las cuales desempeñan un papel en las transiciones G₁/S o G₂/M. Como se demostró anteriormente en los análisis de secuencia, TbPARP presenta una gran similitud con la proteína hPARP-3. Ha sido reportado que hPARP-3 influencia negativamente el ciclo celular en la frontera G₁/S, sin interferir con la duplicación del centrosoma (Diefenbach and Burkle 2005). En *Trypanosoma cruzi*, sin embargo, la inhibición de TbPARG provoca un detenimiento del ciclo en la transición S/G₂, viéndose aumentada la subpoblación S respecto al control a las 8, 10 y 12 horas luego del desarresto (Vilchez Larrea, Schlesinger et al. 2013).

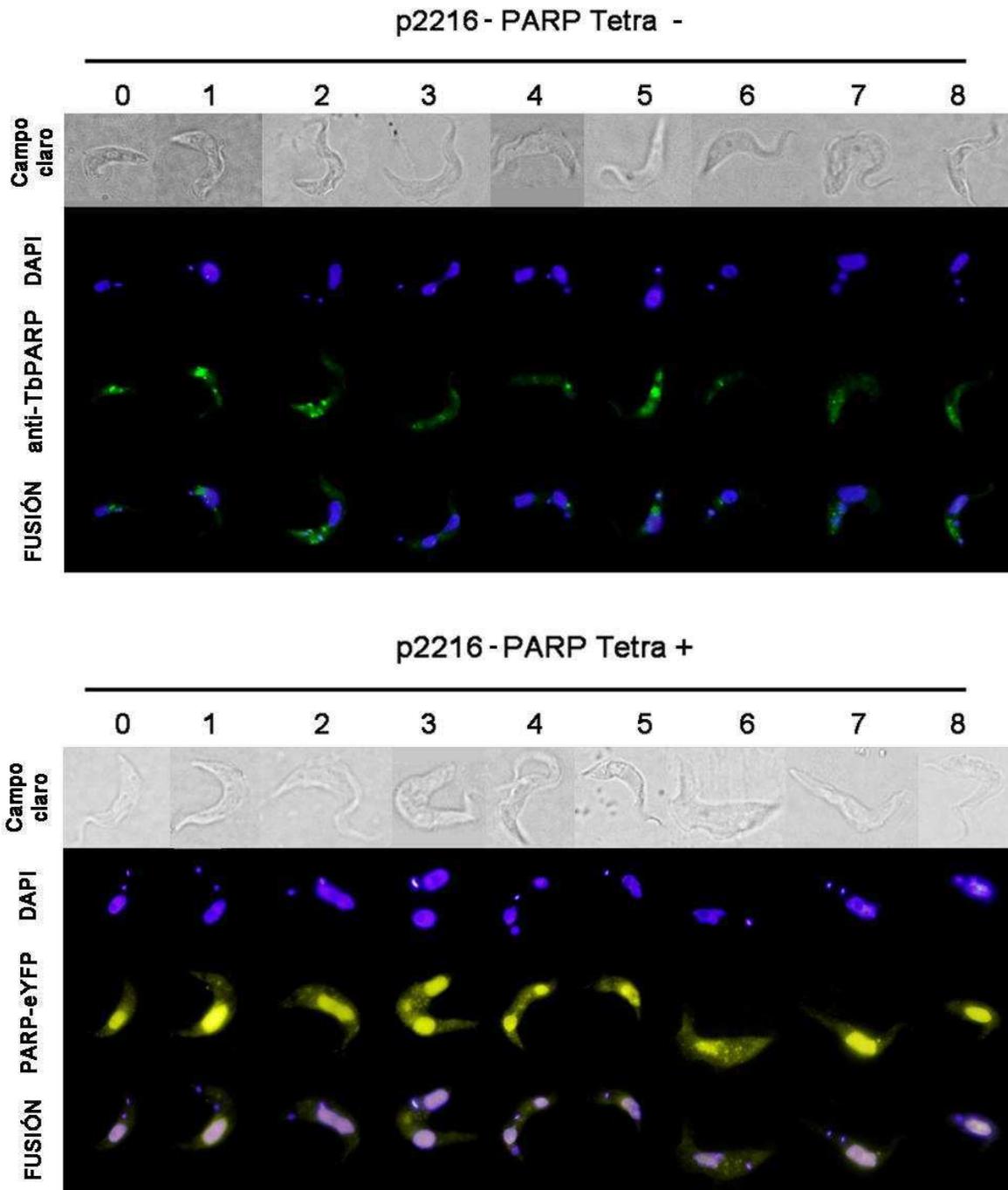


Figura 46. Inmunofluorescencia indirecta de cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) sincronizados con hidroxurea. Cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) inducidos durante 3 días (tetra +) y no inducidos (tetra -) fueron sincronizados con 0,2 mM de hidroxurea durante 12 horas. Tras desarrestar los parásitos, se tomaron muestras cada una hora. La localización subcelular de TbPARP fue detectada mediante anticuerpos anti-TbPARP (GeneScript) en el caso de los cultivos no inducidos y por la fluorescencia de la proteína TbPARP-eYFP en el caso de los cultivos inducidos. El DAPI marca al ADN nuclear y al kinetoplasto.

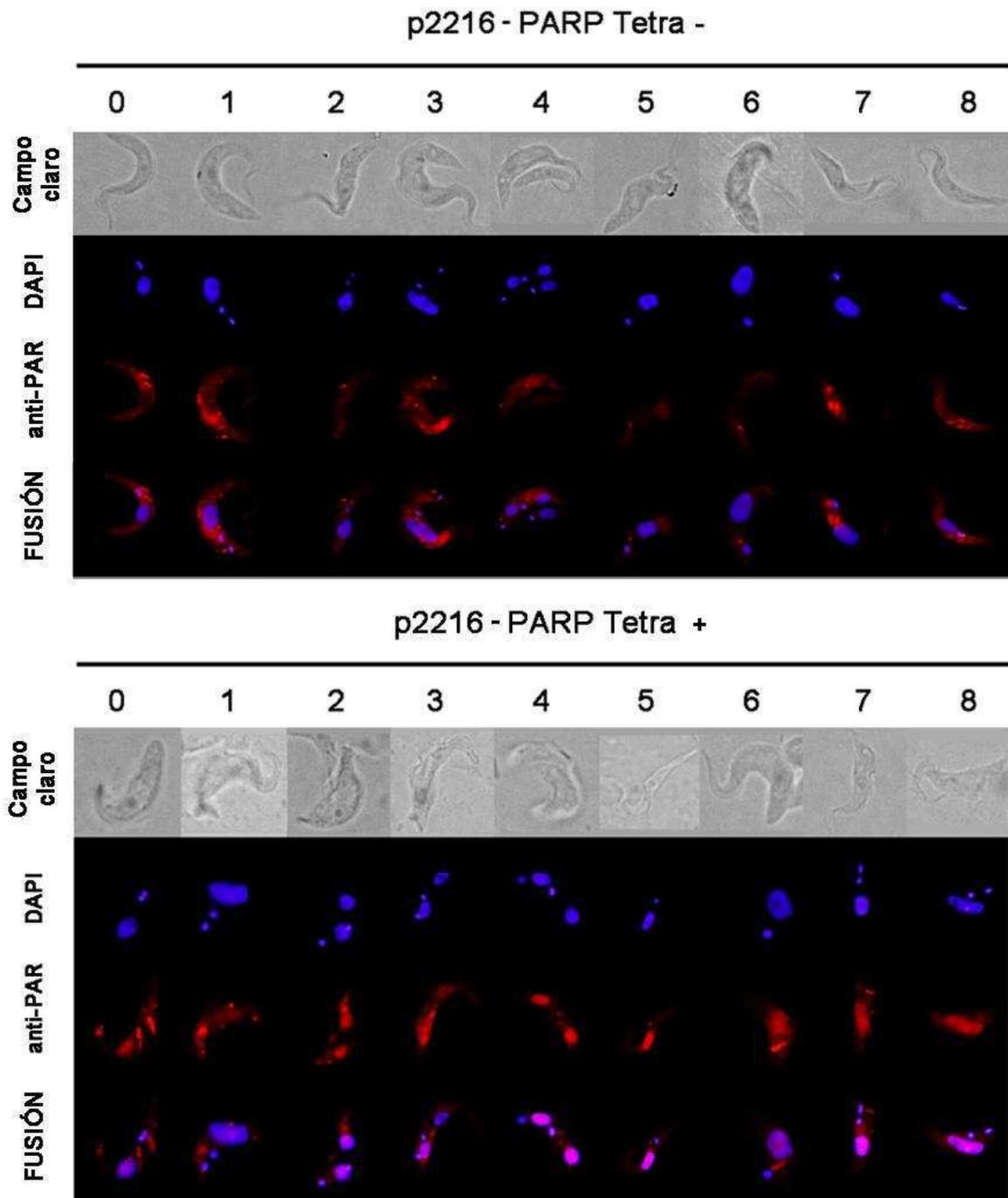


Figura 47. Inmunofluorescencia indirecta de cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) sincronizados con hidroxurea. Cultivos transgénicos sobre-expresantes de TbPARP (p2216-PARP) inducidos durante 3 días (tetra +) y no inducidos (tetra -) fueron sincronizados con 0,2 mM de hidroxurea durante 12 horas. Tras desarrestar los parásitos, se tomaron muestras cada una hora. La localización subcelular de PAR fue detectada mediante anticuerpos policlonales anti-PAR. El DAPI marca al ADN nuclear y al kinetoplasto.

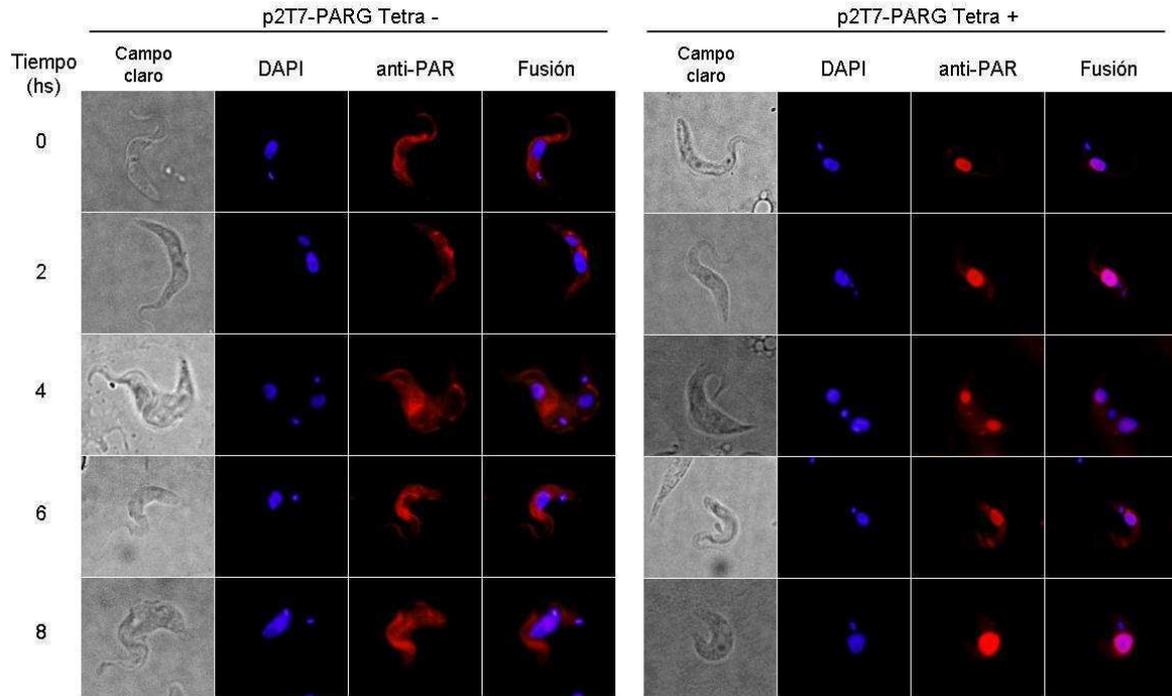


Figura 48. Inmunofluorescencia indirecta de cultivos transgénicos con la expresión de TbPARG silenciada (p2T7-PARG), sincronizados con hidroxurea. Cultivos transgénicos RNAi TbPARG (p2T7-PARG) inducidos durante 3 días (tetra +) y no inducidos (tetra -) fueron sincronizados con 0,2 mM de hidroxurea durante 12 horas. Tras desarrestar los parásitos, se tomaron muestras cada dos horas. La localización subcelular de PAR fue detectada mediante anticuerpos policlonales anti-PAR. El DAPI marca al ADN nuclear y al kinetoplasto.

A pesar de que los parásitos procíclicos carecen de un “checkpoint” entre la mitosis y la citocinesis (Akiyoshi and Gull 2013), la inhibición de la duplicación del cuerpo basal o de su segregación sí parecen arrestarla completamente. Esto podría tener alguna relación con la localización citoplasmática de TbPARP, situada en el mismo sitio que el cuerpo basal. Estudios adicionales deberán ser realizados para determinar si existe realmente un nexo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se caracterizaron funcionalmente las proteínas PARP y PARG involucradas en el metabolismo de PAR, denominadas TbPARP y TbPARG.

- ❖ Ambas proteínas son genes de copia única.
- ❖ Se demostró mediante ensayos de actividad *in vitro* que TbPARP presenta actividad. La misma es activada por ADN activado y su actividad es óptima como dímero a pH 7. No presenta una cinética de reacción Michaeliana y no requiere de Mg^{2+} como cofactor. Al igual que otras PARPs, esta enzima se auto-modifica, siendo blanco de su propia actividad.
- ❖ Los mejores inhibidores de TbPARP, de acuerdo a la medición de su actividad *in vitro*, son Olaparib, EB-47, 4-ANI y Veliparib.
- ❖ TbPARP y TbPARG presentan actividad funcional *in vivo*. Los mejores inhibidores de la actividad TbPARP *in vivo* son Olaparib y Rucaparib.
- ❖ La presencia de PAR se incrementa a medida que el cultivo aumenta su densidad, así como también se acumula en el núcleo tras el tratamiento con un agente genotóxico. La desaparición del polímero se produce alrededor de los 60 minutos post-tratamiento, y reaparece a los 120 minutos post-tratamiento en cultivos de procíclicos.
- ❖ La cinética de aparición y desaparición de PAR estaría relacionada con la persistencia del daño genómico y la funcionalidad de ambas enzimas (TbPARP y TbPARG) en el núcleo.
- ❖ La localización de TbPARG es nuclear, independientemente de la presencia de injurias genómicas.
- ❖ La localización de TbPARP es citoplasmática, y migra al núcleo tras el tratamiento con un agente de daño del ADN, donde lleva a cabo su actividad. El dominio N-terminal es el responsable y porta la señal de localización nuclear.
- ❖ En el citoplasma, TbPARP co-localiza con el cuerpo basal en cultivos de procíclicos.
- ❖ La localización extra-nuclear de PAR es adyacente a TbPARP y al cuerpo basal, y perpendicular al kineplasto en cultivos de procíclicos.
- ❖ La enzima TbPARP no es esencial para los parásitos procíclicos en condiciones normales, pero su ausencia les confiere resistencia ante un estrés genotóxico subletal (parásitos ARNi de TbPARP).

❖ La sobre-expresión de TbPARP produce un enlentecimiento de alrededor del 50% en la curva de crecimiento de los parásitos procíclicos transgénicos. Tanto TbPARP como PAR están presentes en el núcleo a lo largo de todo el ciclo celular, pero solo se retrasa la transición de la fase G₁/S, aumentándose la subpoblación G₁.

❖ El silenciamiento de TbPARG produce un enlentecimiento de alrededor del 50% en la curva de crecimiento de los parásitos procíclicos transgénicos. PAR muestra señal en el núcleo a lo largo de todo el ciclo celular, pero solo se retrasa la transición de la fase G₁/S, aumentándose la subpoblación G₁. Por lo que la acumulación de PAR en el núcleo podría estar cumpliendo una función en el ciclo celular tener un efecto detrimental para la célula.

❖ El H₂O₂ estimula la muerte celular por un mecanismo de apoptosis en parásitos silvestres.

❖ La sobre-expresión de TbPARP induce un aumento de la citotoxicidad a concentraciones subletales de H₂O₂ de los parásitos procíclicos transgénicos, promoviendo la vía necrótica de muerte celular.

❖ El silenciamiento de TbPARG también induce un aumento de la citotoxicidad a concentraciones subletales de H₂O₂ de los parásitos procíclicos transgénicos, promoviendo la vía necrótica de muerte celular.

Por lo tanto el metabolismo de PAR alterado con la acumulación de polímero en el núcleo genera un retraso en la progresión del ciclo celular y un aumento en la sensibilidad frente al estrés oxidativo, sugiriendo un papel para estos polímeros en vías de señalización u otras señales que participan en estos procesos metabólicos.

PERSPECTIVAS

- ❖ Dilucidar si un menor tamaño de TbPARP corresponde a un mecanismo funcional de control de la actividad o de la localización de la proteína. El constructo (pTriTryp) que genera a la proteína recombinante con *tags* en ambos extremos ya ha sido obtenido y restan hacer los experimentos *in vivo*.
- ❖ Determinar el dominio responsable de la interacción con el ADN activado (Nterm y/o WGR).
- ❖ Dilucidar el mecanismo de translocación al núcleo de TbPARP y si interacciona con transportinas.
- ❖ Determinar posibles modificaciones de TbPARP y TbPARG que puedan servir de control de su función.
- ❖ Realizar el PARiloma de los parásitos procíclicos en condiciones normales y de estrés, e identificar las proteínas modificadas diferencialmente.
- ❖ A partir del punto anterior, demostrar la interacción de TbPARP mediante inmunoprecipitación con posibles proteínas involucradas en la señalización y reparación del ADN tras el tratamiento genotóxico o del ciclo celular..
- ❖ Profundizar las vías de muerte celular tras el tratamiento con H₂O₂ en parásitos transgénicos con el metabolismo de PAR alterado, midiendo la disfunción mitocondrial con Rhodamina 123 y la morfología de la célula.
- ❖ Profundizar el estudio sobre el arresto del ciclo celular en parásitos con acumulación de polímero en el núcleo. Observar si este detenimiento se produce a fines de la fase G₁ o en la frontera de la fase G₁/S. Determinar si el cuerpo basal y el kinetoplasto están implicados en este retraso en las fases. Verificar si hay síntesis en el ADN con BrdU.

Evaluar mediante ARN de interferencia de TbPARP si la ausencia de esta proteína produce alguna modificación en el cambio de expresión de VSG, ya que durante este proceso se producen rupturas transcientes en el ADN, pudiendo estar involucrado el metabolismo de PAR.

BIBLIOGRAFÍA

- Abazov, V. M., B. Abbott, et al. (2009). "Search for charged higgs bosons decaying into top and bottom quarks in pp[over] collisions." *Phys Rev Lett* **102**(19): 191802.
- Affar, E. B., M. Germain, et al. (2001). "Caspase-3-mediated processing of poly(ADP-ribose) glycohydrolase during apoptosis." *J Biol Chem* **276**(4): 2935-2942.
- Akiyoshi, B. and K. Gull (2013). "Evolutionary cell biology of chromosome segregation: insights from trypanosomes." *Open Biol* **3**(5): 130023.
- Alsford, S., D. J. Turner, et al. (2011). "High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome." *Genome Res* **21**(6): 915-924.
- Ame, J. C., E. Fouquerel, et al. (2009). "Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells." *J Cell Sci* **122**(Pt 12): 1990-2002.
- Ame, J. C., C. Spenlehauer, et al. (2004). "The PARP superfamily." *Bioessays* **26**(8): 882-893.
- Andrabi, S. A., N. S. Kim, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18308-18313.
- Archer, S. K., D. Inchaustegui, et al. (2011). "The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*." *PLoS One* **6**(3): e18425.
- Banasik, M., H. Komura, et al. (1992). "Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase." *J Biol Chem* **267**(3): 1569-1575.
- Beausoleil, S. A., M. Jedrychowski, et al. (2004). "Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33): 12130-12135.
- Blenn, C., F. R. Althaus, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing protects against H₂O₂-induced cell death." *Biochem J* **396**(3): 419-429.
- Bond, C. S. and A. W. Schuttelkopf (2009). "ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**(Pt 5): 510-512.
- Bonicalzi, M. E., J. F. Haince, et al. (2005). "Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when?" *Cell Mol Life Sci* **62**(7-8): 739-750.
- Botta, D. and M. K. Jacobson (2010). "Identification of a regulatory segment of poly(ADP-ribose) glycohydrolase." *Biochemistry* **49**(35): 7674-7682.
- Burkle, A. and L. Virag (2013). "Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes." *Mol Aspects Med* **34**(6): 1046-1065.
- Clayton, C. and M. Shapira (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias." *Mol Biochem Parasitol* **156**(2): 93-101.
- Cosgrove, W. B., M. J. Skeen, et al. (1979). "Effects of hydroxyurea on *Crithidia fasciculata*." *J Protozool* **26**(4): 643-648.
- Curtin, N. J. (2005). "PARP inhibitors for cancer therapy." *Expert Rev Mol Med* **7**(4): 1-20.
- Chowdhury, A. R., Z. Zhao, et al. (2008). "Effect of hydroxyurea on procyclic *Trypanosoma brucei*: an unconventional mechanism for achieving synchronous growth." *Eukaryot Cell* **7**(2): 425-428.
- D'Amours, D., S. Desnoyers, et al. (1999). "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions." *Biochem J* **342** (Pt 2): 249-268.
- Davis, P. K., A. Ho, et al. (2001). "Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells." *Biotechniques* **30**(6): 1322-1326, 1328, 1330-1321.
- Dethoua, M., R. Nzoumbou-Boko, et al. (2013). "Evaluation of trypanocidal drugs used for human African trypanosomiasis against *Trypanosoma lewisi*." *Parasite* **20**: 39.
- Diefenbach, J. and A. Burkle (2005). "Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism." *Cell Mol Life Sci* **62**(7-8): 721-730.

- Dreesen, O. and G. A. Cross (2006). "Telomerase-independent stabilization of short telomeres in *Trypanosoma brucei*." *Mol Cell Biol* **26**(13): 4911-4919.
- Duszenko, M., K. Figarella, et al. (2006). "Death of a trypanosome: a selfish altruism." *Trends Parasitol* **22**(11): 536-542.
- Erdelyi, K., P. Bai, et al. (2009). "Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells." *FASEB J* **23**(10): 3553-3563.
- Ersfeld, K. (2011). "Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*." *Res Microbiol* **162**(6): 626-636.
- Fernandez Villamil, S. H., R. Baltanas, et al. (2008). "TcPARP: A DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*." *Int J Parasitol* **38**(3-4): 277-287.
- Field, M. C. and M. Carrington (2009). "The trypanosome flagellar pocket." *Nat Rev Microbiol* **7**(11): 775-786.
- Gagne, J. P., X. Moreel, et al. (2009). "Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase." *J Proteome Res* **8**(2): 1014-1029.
- Galanti, N., J. A. Dvorak, et al. (1994). "Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida." *Exp Cell Res* **214**(1): 225-230.
- Gluenz, E., M. L. Povelones, et al. (2011). "The kinetoplast duplication cycle in *Trypanosoma brucei* is orchestrated by cytoskeleton-mediated cell morphogenesis." *Mol Cell Biol* **31**(5): 1012-1021.
- Griffin, R. J., S. Srinivasan, et al. (1998). "Resistance-modifying agents. 5. Synthesis and biological properties of quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)." *J Med Chem* **41**(26): 5247-5256.
- Haikarainen, T., M. Narwal, et al. (2014). "Evaluation and Structural Basis for the Inhibition of Tankyrases by PARP Inhibitors." *ACS Med Chem Lett* **5**(1): 18-22.
- Haince, J. F., M. E. Ouellet, et al. (2006). "Dynamic relocation of poly(ADP-ribose) glycohydrolase isoforms during radiation-induced DNA damage." *Biochim Biophys Acta* **1763**(2): 226-237.
- Hammarton, T. C., S. Kramer, et al. (2007). "*Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis." *Mol Microbiol* **65**(5): 1229-1248.
- Hassler, M., G. Jankevicius, et al. (2011). "PARG: a macrodomain in disguise." *Structure* **19**(10): 1351-1353.
- Horn, D. and R. McCulloch (2010). "Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes." *Curr Opin Microbiol* **13**(6): 700-705.
- Hottiger, M. O., P. O. Hassa, et al. (2010). "Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases." *Trends Biochem Sci* **35**(4): 208-219.
- Huambachano, O., F. Herrera, et al. (2011). "Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity." *J Biol Chem* **286**(9): 7149-7160.
- Huber, A., P. Bai, et al. (2004). "PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1103-1108.
- Illuzzi, G., E. Fouquerel, et al. (2014). "PARG is dispensable for recovery from transient replicative stress but required to prevent detrimental accumulation of poly(ADP-ribose) upon prolonged replicative stress." *Nucleic Acids Res* **42**(12): 7776-7792.
- Jagtap, P. and C. Szabo (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* **4**(5): 421-440.
- Jagtap, P. G., G. J. Southan, et al. (2004). "The discovery and synthesis of novel adenosine substituted 2,3-dihydro-1H-isindol-1-ones: potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(1): 81-85.

- Jimenez-Ruiz, A., J. F. Alzate, et al. (2010). "Apoptotic markers in protozoan parasites." Parasit Vectors **3**: 104.
- Johansson, M. (1999). "A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues." Genomics **57**(3): 442-445.
- Jones, N. G., E. B. Thomas, et al. (2014). "Regulators of Trypanosoma brucei cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen." PLoS Pathog **10**(1): e1003886.
- Kanai, M., M. Miwa, et al. (1982). "Presence of branched portion in poly(adenosine diphosphate ribose) in vivo." J Biol Chem **257**(11): 6217-6223.
- Karlberg, T., M. Hammarstrom, et al. (2010). "Crystal structure of the catalytic domain of human PARP2 in complex with PARP inhibitor ABT-888." Biochemistry **49**(6): 1056-1058.
- Kaufmann, S. H. (1989). "Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note." Cancer Res **49**(21): 5870-5878.
- Kelly, S., J. Reed, et al. (2007). "Functional genomics in Trypanosoma brucei: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci." Mol Biochem Parasitol **154**(1): 103-109.
- Kofler, B., E. Wallraff, et al. (1993). "Purification and characterization of NAD⁺:ADP-ribosyltransferase (polymerizing) from Dictyostelium discoideum." Biochem J **293** (Pt 1): 275-281.
- Krissinel, E. and K. Henrick (2004). "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2256-2268.
- Lafon-Hughes, L., S. C. Vilchez Larrea, et al. (2014). "VERO cells harbor a poly-ADP-ribose belt partnering their epithelial adhesion belt." PeerJ **2**: e617.
- Langelier, M. F., A. A. Riccio, et al. (2014). "PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1." Nucleic Acids Res **42**(12): 7762-7775.
- Langelier, M. F., D. D. Ruhl, et al. (2010). "The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction." J Biol Chem **285**(24): 18877-18887.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Lehtio, L., A. S. Jemth, et al. (2009). "Structural basis for inhibitor specificity in human poly(ADP-ribose) polymerase-3." J Med Chem **52**(9): 3108-3111.
- Liu, B., Y. Liu, et al. (2005). "Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA." Trends Parasitol **21**(8): 363-369.
- Liu, B., H. Molina, et al. (2006). "Role of p38 in replication of Trypanosoma brucei kinetoplast DNA." Mol Cell Biol **26**(14): 5382-5393.
- Luo, X. and W. L. Kraus (2012). "On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1." Genes Dev **26**(5): 417-432.
- Marchetti, M. A., C. Tschudi, et al. (2000). "Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis." J Cell Sci **113** (Pt 5): 899-906.
- Matthews, K. R. (2005). "The developmental cell biology of Trypanosoma brucei." J Cell Sci **118**(Pt 2): 283-290.
- McNicholas, S., E. Potterton, et al. (2011). "Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 4): 386-394.

- Mendoza-Alvarez, H. and R. Alvarez-Gonzalez (1993). "Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular." J Biol Chem **268**(30): 22575-22580.
- Mendoza-Alvarez, H. and R. Alvarez-Gonzalez (2004). "The 40 kDa carboxy-terminal domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 forms catalytically competent homo- and heterodimers in the absence of DNA." J Mol Biol **336**(1): 105-114.
- Meneer, K. A., C. Adcock, et al. (2008). "4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1." J Med Chem **51**(20): 6581-6591.
- Meyer, R. G., M. L. Meyer-Ficca, et al. (2007). "Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity." Exp Cell Res **313**(13): 2920-2936.
- Miwa, M., M. Ishihara, et al. (1981). "The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 leads to 2) ribose-ribose linkage." J Biol Chem **256**(6): 2916-2921.
- Miyashiro, J., K. W. Woods, et al. (2009). "Synthesis and SAR of novel tricyclic quinoxalinone inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1)." Bioorg Med Chem Lett **19**(15): 4050-4054.
- Morales, J., L. Li, et al. (2014). "Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **24**(1): 15-28.
- Navarro, M., X. Penate, et al. (2007). "Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*." Trends Microbiol **15**(6): 263-270.
- Okayama, H., C. M. Edson, et al. (1977). "Purification and properties of poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase." J Biol Chem **252**(20): 7000-7005.
- Otto, H., P. A. Reche, et al. (2005). "In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs)." BMC Genomics **6**: 139.
- Pasion, S. G., G. W. Brown, et al. (1994). "Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle." J Cell Sci **107 (Pt 12)**: 3515-3520.
- Passos-Silva, D. G., M. A. Rajao, et al. (2010). "Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*." J Nucleic Acids **2010**: 840768.
- Patel, C. N., D. W. Koh, et al. (2005). "Identification of three critical acidic residues of poly(ADP-ribose) glycohydrolase involved in catalysis: determining the PARG catalytic domain." Biochem J **388**(Pt 2): 493-500.
- Pays, E., B. Vanhollebeke, et al. (2006). "The trypanolytic factor of human serum." Nat Rev Microbiol **4**(6): 477-486.
- Petzold, S. J., B. A. Booth, et al. (1981). "Purification and properties of poly(ADP-ribose) polymerase from lamb thymus." Biochemistry **20**(25): 7075-7081.
- Podesta, D., M. I. Garcia-Herreros, et al. (2004). "Purification and properties of poly(ADP-ribose)polymerase from *Crithidia fasciculata*. Automodification and poly(ADP-ribosyl)ation of DNA topoisomerase I." Mol Biochem Parasitol **135**(2): 211-219.
- Priotto, G., S. Kasparian, et al. (2009). "Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial." Lancet **374**(9683): 56-64.
- Putt, K. S. and P. J. Hergenrother (2004). "An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD(+): application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors." Anal Biochem **326**(1): 78-86.
- Robert, I., O. Karicheva, et al. (2013). "Functional aspects of PARylation in induced and programmed DNA repair processes: preserving genome integrity and modulating physiological events." Mol Aspects Med **34**(6): 1138-1152.

- Robinson, D. R. and K. Gull (1991). "Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle." Nature **352**(6337): 731-733.
- Ruf, A., G. de Murcia, et al. (1998). "Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling." Biochemistry **37**(11): 3893-3900.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.
- Schlicker, A., P. Peschke, et al. (1999). "4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer." Int J Radiat Biol **75**(1): 91-100.
- Schreiber, V., F. Dantzer, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 517-528.
- Schwede, A. and M. Carrington (2010). "Bloodstream form Trypanosome plasma membrane proteins: antigenic variation and invariant antigens." Parasitology **137**(14): 2029-2039.
- Simpson, L. and P. Braly (1970). "Synchronization of *Leishmania tarentolae* by hydroxyurea." J Protozool **17**(4): 511-517.
- Slade, D., M. S. Dunstan, et al. (2011). "The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase." Nature **477**(7366): 616-620.
- Slama, J. T., N. Aboul-Ela, et al. (1995). "Specific inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase by adenosine diphosphate (hydroxymethyl)pyrrolidinediol." J Med Chem **38**(2): 389-393.
- Soto, M., L. Quijada, et al. (2000). "Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control." Biochem J **346 Pt 1**: 99-105.
- Stephan, A., S. Vaughan, et al. (2007). "An essential quality control mechanism at the eukaryotic basal body prior to intraflagellar transport." Traffic **8**(10): 1323-1330.
- Stockdale, C., M. R. Swiderski, et al. (2008). "Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs." PLoS Biol **6**(7): e185.
- Taylor, J. E. and G. Rudenko (2006). "Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe?" Trends Genet **22**(11): 614-620.
- Thomas, H. D., C. R. Calabrese, et al. (2007). "Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial." Mol Cancer Ther **6**(3): 945-956.
- Ushiro, H., Y. Yokoyama, et al. (1987). "Purification and characterization of poly (ADP-ribose) synthetase from human placenta." J Biol Chem **262**(5): 2352-2357.
- van Zandbergen, G., C. G. Luder, et al. (2010). "Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection?" Trends Parasitol **26**(10): 477-483.
- Vaughan, S. and K. Gull (2008). "The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*." Biochem Soc Trans **36**(Pt 3): 421-424.
- Vilchez Larrea, S. C., G. D. Alonso, et al. (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerase plays a differential role in DNA damage-response and cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol **41**(3-4): 405-416.
- Vilchez Larrea, S. C., T. Haikarainen, et al. (2012). "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase interferes with *Trypanosoma cruzi* infection and proliferation of the parasite." PLoS One **7**(9): e46063.
- Vilchez Larrea, S. C., M. Schlesinger, et al. (2013). "Host cell poly(ADP-ribose) glycohydrolase is crucial for *Trypanosoma cruzi* infection cycle." PLoS One **8**(6): e67356.
- Villamil, S. F., D. Podesta, et al. (2001). "Characterization of poly(ADP-ribose) polymerase from *Crithidia fasciculata*: enzyme inhibition by beta-lapachone." Mol Biochem Parasitol **115**(2): 249-256.
- Virag, L., A. Robaszekiewicz, et al. (2013). "Poly(ADP-ribose) signaling in cell death." Mol Aspects Med **34**(6): 1153-1167.
- Welburn, S. C., M. A. Barcinski, et al. (1997). "Programmed cell death in trypanosomatids." Parasitol Today **13**(1): 22-26.

- Welburn, S. C., C. Dale, et al. (1996). "Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro." Cell Death Differ **3**(2): 229-236.
- Westergaard, G. G., N. Bercovich, et al. (2010). "Analysis of a nuclear localization signal in the p14 splicing factor in *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol **40**(9): 1029-1035.
- Wickstead, B., K. Ersfeld, et al. (2002). "Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **125**(1-2): 211-216.
- Wirtz, E., S. Leal, et al. (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 89-101.
- Ying, W., M. B. Seigny, et al. (2001). "Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12227-12232.
- Yoshihara, K., T. Hashida, et al. (1978). "Bovine thymus poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase." J Biol Chem **253**(18): 6459-6466.
- Zahradka, P. and K. Ebisuzaki (1984). "Poly(ADP-ribose) polymerase is a zinc metalloenzyme." Eur J Biochem **142**(3): 503-509.
- Zick, A., I. Onn, et al. (2005). "Assigning functions to genes: identification of S-phase expressed genes in *Leishmania major* based on post-transcriptional control elements." Nucleic Acids Res **33**(13): 4235-4242.