



*UGR* | Universidad  
de Granada



**CSIC**  
**ipbln**

**Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina**

**Análisis funcional de las quinasas TOR4 y  
AMPK $\alpha$ 1 como reguladores de la quiescencia en  
*Trypanosoma brucei***

Memoria presentada por **Manuel Alejandro Saldivia  
Concepción** para optar al título de Doctor  
por la Universidad de Granada

**Granada, 2015**

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales  
Autor: Manuel Alejandro Saldivia Concepción  
ISBN: 978-84-9125-373-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/41299>



Universidad de Granada



El doctorando **Manuel Alejandro Saldivia Concepción** y el director de la tesis **Miguel Ángel Navarro Carretero** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Noviembre de 2015

Director/es de la Tesis

Fdo.: Miguel A. Navarro C.

Doctorando

Fdo.: Manuel A. Saldivia C.



**He hecho de esta tesis mi gigante**

*brucei\_torment*



## RESUMEN

## GLOSARIO

## INTRODUCCIÓN

<b>I. <i>Trypanosoma brucei</i> y la enfermedad del sueño</b>	<b>1</b>
a. La enfermedad del sueño	1
b. <b><i>Trypanosoma brucei</i></b>	<b>3</b>
1.- Ciclo de vida y diferenciación de <i>T. brucei</i>	5
2.- Mecanismos reguladores de la diferenciación	7
a. Moléculas señalizadoras	<b>8</b>
a.1.- Fosfatasa mediadora de las rutas de señalización en la diferenciación de tripanosomátidos.	8
a.2. - Quinasas como sensores de la disponibilidad de nutrientes	9
b.- Reguladores genéticos	10
c.- Proteínas hipotéticas	11
d.- Componentes de los sitios de expresión (ES)	11
e.- Integración de los componentes	12
<b>II. Regulación del crecimiento celular mediante mTOR</b>	<b>14</b>
a. Conservación evolutiva de la ruta de señalización mTOR	15
b. Estructura de las quinasas mTOR	15
c. Estructura de los complejos mTOR	16
d. <b>Complejo mTOR de tipo 1 (mTORC1)</b>	<b>18</b>
• Raptor	18
• LST8	18
• PRAS40 (proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa)	18
• Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein)	19
• Complejo Tti1/Tel2	19
e. <b>Complejo mTOR de tipo 2 (mTORC2)</b>	<b>20</b>
• Rictor (proteína acompañante de TOR insensible a rapamicina)	20
• mSin1	21
• Protor 1/2 ( <i>protein observed with Rictor-1</i> )	21
f. <b>mTORC1 como regulador central del crecimiento y el metabolismo celular</b>	<b>21</b>
i. Síntesis de proteínas	23
ii. Síntesis de lípidos	24
iii. Metabolismo y biogénesis mitocondrial	25
iv. Autofagia	25
g. <b>Complejo mTORC2</b>	<b>26</b>
i. Supervivencia celular, metabolismo y proliferación	26
ii. Organización del citoesqueleto.	27
<b>III. mTOR en tripanosomátidos</b>	<b>27</b>
a. Señalización mediante TOR en <i>T. brucei</i>	28
<b>IV. AMPK</b>	<b>35</b>

a. Estructura general de los complejos AMPK en mamíferos	36
i. Subunidad catalítica $\alpha$ (AMPK $\alpha$ )	36
ii. Subunidad $\beta$ (AMPK $\beta$ ): el sitio de anclaje del complejo	38
iii. Subunidad $\gamma$ (AMPK $\gamma$ )	39
b. Regulación de los complejos AMPK	40
i. Regulación mediante fosforilación.	40
ii. Activación de AMPK mediante 5'AMP	42
iii. Regulación de AMPK mediante quinasas	43
• LKB1 ( <i>Liver kinase B1</i> )	43
• CaMKK ( <i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent Protein kinase kinase</i> )	44
• TAK1 ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i> )	44
iv. Regulación de AMPK mediante fosfatasas	45
c. Eventos fisiológicos moduladores del estado de activación de AMPK	46
i. Ejercicio y la contracción muscular	46
ii. Ligandos extracelulares	47
iii. Estrés y regulación de AMPK	48
iv. Regulación farmacológica de AMPK	50
d. Substratos de AMPK e implicaciones fisiológicas	51
e. Implicación de AMPK en el metabolismo de proteínas, crecimiento y ciclo celular	53
i. AMPK y el crecimiento celular	53
ii. AMPK y el control metabólico	54
• Síntesis de proteínas	54
• Degradación de proteínas y autofagia	54

## **RESULTADOS** **57**

<b>1. TbTOR4 como represor de la diferenciación en <i>T.brucei</i></b>	<b>57</b>
1.1.- TbTOR4 forma un complejo TORC4 en <i>T. brucei</i>	57
1.2.- La reducción parcial de TbTOR4 regula la expresión de genes asociados a la diferenciación hacia formas <i>stumpy</i> .	60
1.3.- El uso de análogos de 5'AMP y compuestos hidrolizables de cAMP reducen la expresión de TbTOR4 induciendo la diferenciación en <i>T. brucei</i>	62
<b>2.- TbAMPK en la regulación de la diferenciación en <i>T.brucei</i></b>	<b>65</b>
2.1.- Caracterización de los complejos AMPK en <i>T. brucei</i>	65
2.2.- Herramientas moleculares para el análisis de la regulación de AMPK $\alpha$ en <i>T. brucei</i>	68
2.3.- Análisis funcional de TbAMPK $\alpha$ en <i>T.brucei</i>	69
2.4.- La activación de TbAMPK $\alpha$ 1 se asocia con el desarrollo de formas similares a <i>stumpy</i>	71
2.5.- TbAMPK $\alpha$ 1 se encuentra regulada durante la diferenciación en cepas pleomórficas.	76
2.6.- La inhibición TbAMPK $\alpha$ 1 reduce la diferenciación hacia la forma <i>stumpy</i> durante la infección en ratón.	78
2.7.- Reguladores de la activación de TbAMPK $\alpha$ 1	80
2.7.1.- GSK3 $\beta$ en la regulación de los complejos AMPK en <i>T. brucei</i>	80
2.7.2.- TbTOR4 y el metabolismo oxidativo en la regulación de los complejos AMPK en <i>T. brucei</i>	82

<b>DISCUSION</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>101</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>103</b>

# GLOSARIO

**4E-BP:** proteína ligada al factor eucariótico de iniciación 4E, involucrada en la síntesis de proteínas.

**5'-AMP:** Adenosín monofosfato

**ACC1:** Del inglés *Acetyl-CoA carboxylase*

**ADN :** Ácido desoxirribonucleico

**AICAR:** 5-aminoimidazol-4-carboxamida 1-b-D-ribofuranosido

**Akt/PKB:** Familia de proteínas con importante rol en la señalización celular en mamíferos

**AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**CaMKK:** Del inglés *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent Protein kinase kinase*

**cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico

**Complejo TSC1/TSC2:** núcleo de integración de la señalización de factores de crecimiento y Del estado energético celular. Este complejo funciona como un regulador negativo de la actividad de mTORC1.

**DhPhos:** fosfatasa dual específica

**Dominio AID:** Del inglés *Auto-Inhibitory Domain* (Dominio autoinhibitorio)

**Dominio CBS:** Del inglés *Cystathionine  $\beta$ -Synthase*

**Dominio FRB:** Del inglés *FKBP-rapamycin-binding (FRB) domain*

**Dominio GBD:** Del inglés *Glycogen-binding domain* (dominio de unión a glicógeno)

**Dominio PDZ:** PDZ es un acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas - proteína de densidad post-sináptica (PSD95), una supresora de

tumores en *Drosophila* (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (zo-1) - que fueron en las primeras en las cuales se descubrió el dominio.

**DYRK:** Del inglés *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*

**eIF4E:** Factor eucariótico de inicio de la traducción 4E, promueve el inicio de la traducción dependiente Del CAP.

**Epimastigotes:** formas de *T. brucei* en las que cuerpo basal se encuentra en posición anterior al núcleo, con un flagelo largo conectado a lo largo Del cuerpo celular.

**ES:** sitio de expresión de *T. brucei* donde se transcriben la VSG y los ESAGs a partir de un promotor de ARN Pol I.

**ESAGs:** Genes asociados al sitio de expresión

**ESB:** Cuerpo asociado al VSG-ES activo

**Fase G1 Del ciclo celular:** Durante esta fase la célula comprueba las condiciones externas e internas y decide si continuar con el ciclo celular o no, cuando la célula queda detenida en fase G1 en forma quiescente se dice que está en fase G0.

**Glc7:** fosfatasa de tipo 1 ortóloga de PP1 en levaduras, actúa como antagonista de SNF1 mediante interacción con otras proteínas como Reg1.

**GSH:** Glutación, principal antioxidante de las células.

**HA:** Del inglés *Human influenza virus hemagglutinin epitope*

**kDa:** abreviatura de kiloDalton

**Knock-out:** inactivación génica mediante técnicas de biología molecular

**LKB1:** Del inglés *liver kinase B1*

**LST8:** Del inglés *Lethal with Sec Thirteen*, subunidad común a todos los complejos de tipo mTORC.

**MAPK/ERK:** Del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*

**mARN:** ARN mensajero

**MEK:** MAP quinasa quinasa (MAPKKK), enzimas con actividad quinasa que fosforila a las MAPK

**mSin1:** proteína que interacciona con la MAP quinasa activada por estrés 1.

**mTOR:** Del inglés *mechanistic target of rapamycin* (objetivo mecanicista de la rapamicina)

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NIMA:** Del inglés *Never in mitosis A* o también llamadas NEK

**PIKK:** familia de las quinasa relacionadas con las fosfatidil inositol quinasa

**PRAS40:** sustrato rico en prolina de Akt/PKB de 40 kDa.

**Procíclica:** forma adaptada al insecto de *T. brucei* que expresa procíclica en su cubierta.

**Raptor:** proteína adaptadora de mTORC1

**RBPs:** proteínas de unión a ARN

**RDK1 y RDK2:** Del inglés *repressor of differentiation kinases*. Involucradas en la diferenciación hacia la forma procíclica de *T. brucei*.

**Reg1:** proteína que junto con Glc7 se encargan de inactivar a SNF1 en levaduras.

**Rictor:** Proteína acompañante de TOR insensible a rapamicina, ortólogo mamífero de AVO3 de levaduras.

**ROS:** especies reactivas Del oxígeno

**SIF:** factor soluble inductor de la diferenciación hacia formas *stumpy* en cepas pleomórficas.

**SK61:** quinasa de la proteína 6 ribosomal, uno de los principales sustratos de mTORC1 para el control de la síntesis de proteínas.

**Slender:** forma proliferativa sanguínea alargada de *T. brucei*

**SNF1:** Del inglés *Sucrose Non Fermenting kinase 1*, AMPK en mamíferos.

**Stumpy:** forma no proliferativa (quiescente) rechoncha de *T. brucei*

**TbPTP1:** fosfatasa de residuos de tirosina en *T. brucei*

**THA:** Tripanosomiasis humana africana

**Tripomastigotes metacíclicos:** forma infectiva de *T. brucei* no proliferativa que se ubica en las glándulas salivares de la mosca.

**TRYP:** Triparredoxina peroxidasa

**TRYR:** Tripanotión reductasa

**TRYX:** Triparredoxina

**Ttis:** Del inglés *TELO2 Interacting Protein 1*, actúan como reguladores de la respuesta de daño al ADN y necesarias para estabilizar la expresión proteica de la familia PIKK.

**ULK1/Atg1:** Del inglés *unc-51 like autophagy activating kinase 1*, es una proteína involucrada en el proceso de autofagia en respuesta a la privación nutricional.

**VSG:** Glicoproteína variable de superficie

**YAK:** quinasa de doble especificidad de sustrato perteneciente a la familia DYRK que actúa como supresor de la diferenciación en mamíferos.

**ZFK:** Del inglés *Zinc finger Kinase*



## RESUMEN

La Tripanosomiasis Humana Africana (HAT) o Enfermedad del sueño es causada por protozoos parásitos pertenecientes al género *Trypanosoma*, que son transmitidos a su hospedador a través de su vector artrópodo la mosca tse-tse. El ciclo de vida de estos parásitos alterna entre formas altamente proliferativas y formas quiescentes, como mecanismo de adaptación al entorno de su hospedador y el mantenimiento de la infección. La transición en el desarrollo de estos parásitos responde a diversos factores, tales como la densidad celular y las condiciones propias del entorno de acogida. Estas particularidades biológicas convierten a *Trypanosoma brucei* en un sistema modelo excelente para estudiar las vías de señalización que rigen el desarrollo celular.

Durante muchos años el único dato existente sobre el mecanismo de diferenciación de *T. brucei* era la existencia de un factor soluble capaz de inducir la transición hacia formas quiescentes del parásito en el torrente sanguíneo del hospedador mamífero. No obstante, tanto el mecanismo de acción o la identidad química de esta molécula aún permanecen desconocidos (Reuner, Vassella et al. 1997). En la última década se han identificado algunos de los componentes involucrados en el desarrollo de estos parásitos, cobrando importancia el estudio de aquellos que se asocian directamente a las respuestas metabólicas adaptativas (Mony and Matthews 2015).

En la mayoría de los organismos, las dos proteínas que orquestan el equilibrio entre adaptación nutricional y energética son mTOR y AMPK respectivamente (Kim, Kundu et al. 2011). Las rutas de señalización de tipo mTOR en *T. brucei* han sido estudiadas por nuestro laboratorio con anterioridad. Así, el crecimiento de estos parásitos es coordinado a través de cuatro proteínas TbTOR distintas, que se asocian formando complejos proteicos independientes, siendo los complejos TbTORC1 y TbTORC2 los encargados de la regulación temporal y espacial del crecimiento respectivamente (Barquilla, Crespo et al. 2008, Barquilla and Navarro 2009, Barquilla and Navarro 2009). Sin embargo, a pesar de la importancia biológica de los procesos asociados a ambos complejos, no

existe evidencia biológica sobre su participación en la diferenciación de *T. brucei*.

Estudios preliminares de nuestro laboratorio, apuntaban a que otra proteína de tipo mTOR, que denominamos TbTOR4 estaba involucrada en el proceso de diferenciación. Por ello, la primera parte de esta tesis doctoral se centró en la caracterización funcional de TbTOR4 y en conocer implicación en el desarrollo del parásito.

A través de espectrometría de masas, y posteriormente ensayos de co-inmunoprecipitación se demostró que TbTOR4 se une a proteínas como TbMVP-1, TbArmtor y LST8 (común en todos los complejos mTOR) para formar un nuevo complejo que denominamos TbTORC4.

Por otra parte, se observó que la reducción parcial de la expresión de TbTOR4 regula la expresión de genes asociados a la diferenciación hacia formas *stumpy*, lo que apoya los estudios preliminares que asociaban a esta quinasa al desarrollo de quiescencia en *T. brucei*. Nuestros resultados ponen de manifiesto una complejidad inesperada en la señalización de mTOR, donde TbTORC4 regula negativamente la diferenciación de estos parásitos.

Durante años distintos estudios han sugerido que tanto cAMP como 5'-AMP podrían estar involucrados en la diferenciación de *T. brucei*. Para determinar si esto podría afectar la regulación de la ruta asociada a TbTOR4, se analizó la expresión de esta proteína tras incubar los parásitos con distintas dosis y tipos de análogos de estos nucleótidos. Así, se demostró que los productos de degradación de cAMP, y de forma más relevante el 5'-AMP es capaz de reducir la expresión de TbTOR4 y de inducir la diferenciación de cepas monomórficas de *T. brucei*.

Este resultado pone de manifiesto la importancia del equilibrio energético dentro del desarrollo de estos parásitos. De hecho, en la mayoría de los organismos las respuestas al desbalance ATP/AMP están mediadas por AMPK, por lo que posteriormente nos enfocamos en caracterizar los complejos AMPK en *T. brucei*.

Análisis *in silico* del genoma de *T. brucei*, y estudios mediante espectrometría de masas y co-inmunoprecipitación de las subunidades de TbAMPK indican que en *T. brucei* existen dos complejos AMPK conservados a nivel estructural y funcional.

Para estudiar la regulación funcional de TbAMPK se emplearon dos estrategias de activación de esta quinasa, una de ellas farmacológica, empleando un activador alostérico, y otra molecular mediante la expresión de una versión truncada catalíticamente activa de esta quinasa. Es importante destacar que ambas aproximaciones mostraron que la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 induce la diferenciación hacia la forma *stumpy* en cepas monomórficas.

Por otra parte, utilizando un modelo murino de diferenciación *in vivo* de cepas pleomórficas se demostró que la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 ocurre durante el desarrollo hacia la forma quiescente, y que la inhibición de TbAMPK  $\alpha$ 1 retrasa el proceso de diferenciación en *T. brucei*.

Finalmente, los resultados expuestos en esta tesis plantean la primera evidencia de un vínculo entre el estrés oxidativo y la actividad TbAMPK $\alpha$ 1 en el equilibrio de la quiescencia, proliferación y diferenciación de *T. brucei*. Estos datos proponen, pues, un modelo novedoso mediante el cual la homeostasis energética y la regulación mitocondrial son moduladas a través de una nueva cascada de señalización TOR4-AMPK $\alpha$ 1, fundamental en la biología de la transición entre proliferación y quiescencia del parásito.

# INTRODUCCIÓN

## I. *Trypanosoma brucei* y la enfermedad del sueño

### a. La enfermedad del sueño

La Tripanosomiasis humana africana (THA) o enfermedad del sueño es causada por son protozoos pertenecientes al género *Trypanosoma*. Se transmiten al ser humano por la picadura de la mosca tsetse (del género *Glossina*) infectada por otras personas o animales que albergan los parásitos patógenos humanos.

Esta enfermedad es endémica en 36 países del África subsahariana donde existe la mosca tsetse que puede transmitirla. En 2009, tras sostenidos esfuerzos de lucha contra la enfermedad, el número de casos notificados se redujo a menos de 10.000 (9.878) por primera vez en 50 años. Esta tendencia se mantuvo hasta 2012, año en que se notificaron 6.314 casos. Según estimaciones, el número real de casos es actualmente de 20.000. Se calcula que la población expuesta al riesgo de esta enfermedad es de unos 65 millones de personas (OMS 2014).

Las dos subespecies involucradas en la enfermedad en humanos son: *Trypanosoma brucei rhodesiense* presente en 13 países de África oriental y del sur, responsable del 2% de los casos reportados, causando **infección aguda** y *Trypanosoma brucei gambiense* en el África occidental y central, responsable de 98% de los casos reportados, causando **infección crónica** (OMS 2014). Por otra parte, en África subsahariana, *T. brucei brucei* causa el Nagana que afecta severamente la ganadería. Estas especies son morfológicamente indistinguibles entre sí, aunque su separada distribución geográfica facilita el diagnóstico en la práctica. (Ver figura 1)

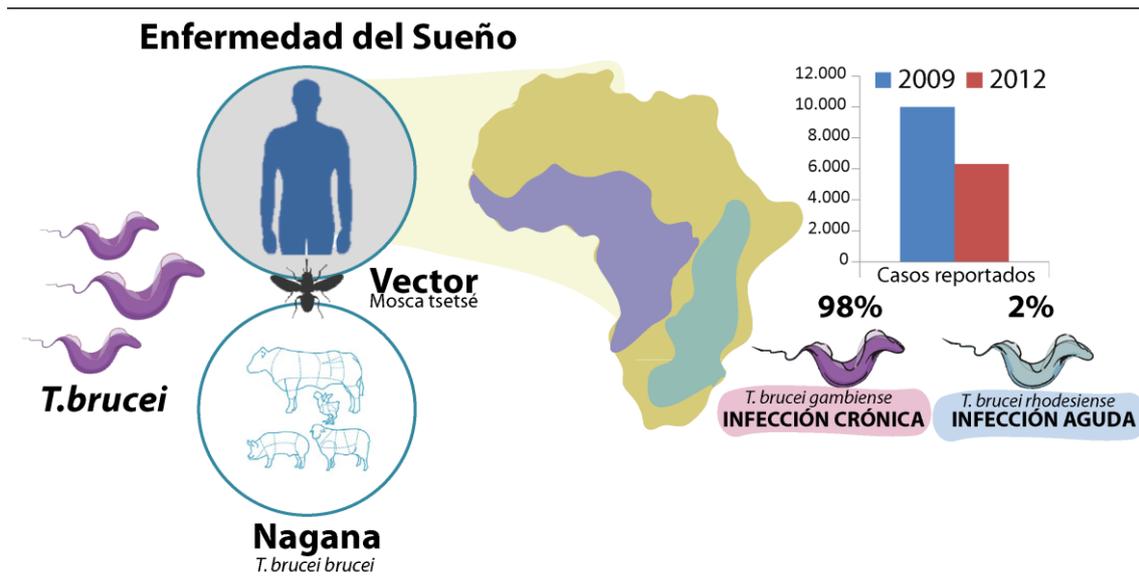


Figura 1. **Distribución geográfica de la Enfermedad del sueño**

Datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

El curso de la enfermedad del sueño incluye diversas etapas. Tras la picadura de la mosca, los tripanosomas se propagan inicialmente por el sistema hemolinfático, donde presentan una serie de síntomas inespecíficos como fiebre, inflamación de los ganglios linfáticos, dolor muscular y articular, cefalea e irritabilidad. Una vez que el parásito consigue atravesar la barrera hematoencefálica y se disemina por el líquido cefalorraquídeo, apareciendo entonces los signos y síntomas más evidentes de la enfermedad: cambios de comportamiento, confusión, trastornos sensoriales y falta de coordinación y coma. En la actualidad, no existe vacuna o tratamiento profiláctico contra la THA, y el tipo tratamiento depende de la fase en que se encuentre la enfermedad, siendo el diagnóstico temprano de la enfermedad mediante punción lumbar, un factor asociado al éxito del tratamiento.

Durante la primera etapa de la enfermedad, los tratamientos utilizados son la Pentamidina y Suramina, este tratamiento es poco tóxico y bastante eficaz. Sin embargo, la evaluación de los resultados del tratamiento requiere un seguimiento del paciente durante meses, debido a que el parásito puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo (e indetectable mediante pruebas de laboratorio), y la enfermedad puede reaparecer después del tratamiento.

El progreso de la enfermedad a fase neurológica complica el tratamiento y las posibilidades de éxito ya que pocos tratamientos combinan eficacia y capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el tratamiento en esta etapa consiste en el uso de Melarsoprol, Eflornitina y Nifurtimox. En 2009, se introdujo un tratamiento mediante la combinación de estos dos últimos. Todos estos fármacos presentan problemas de toxicidad, dificultad de administración, y generación de tolerancia, por lo que actualmente la industria biofarmacéutica concentra sus esfuerzos en el estudio de la biología del parásito, con el objetivo de reorientar las dianas terapéuticas y conseguir un tratamiento que sea efectivo y seguro para el paciente (Ferrins, Rahmani et al. 2013, Eperon, Balasegaram et al. 2014).

### **b. *Trypanosoma brucei***

Los tripanosomas africanos, agentes causales de la enfermedad del sueño en humanos y de la Nagana en el ganado bovino, son protozoos parásitos extracelulares pertenecientes a la familia Trypanosomatidae cuyo ciclo vital se desarrolla entre su hospedador mamífero y el vector insecto, la mosca tse-tsé.

*Trypanosoma brucei* posee la estructura celular típica de organismos eucariotas, pero presenta algunas características distintivas:

- Presenta una organización del ADN mitocondrial en una gran masa alargada asociada al cuerpo basal del flagelo que se conoce como **cinetoplasto** (de Souza 2008, Motta 2008).
- El metabolismo de las formas sanguíneas del parásito está basado en la glucosa, pero la mayoría de las enzimas de la glicolisis se encuentran empaquetadas en un orgánulo denominado **glicosoma**, y no distribuida en el citoplasma como ocurre en la mayoría de los eucariotas (Michels, Bringaud et al. 2006).
- El citoesqueleto de la célula está formado principalmente por una malla de microtúbulos interconectados, en contraposición al citoesqueleto de la célula eucariota habitual en el que se combinan éstos con filamentos de actina e intermedios. Este citoesqueleto flexible permite a los

tripanosomátidos desarrollar una amplia variedad de formas durante su ciclo vital (Gull 1999).

- La superficie del parásito se encuentra recubierta por una capa densa de proteínas organizadas en dímeros denominada glicoproteína variable de superficie (**VSG**), cuya función está relacionada a la respuesta antigénica del hospedador (Pays 2005). (Ver figura 2)

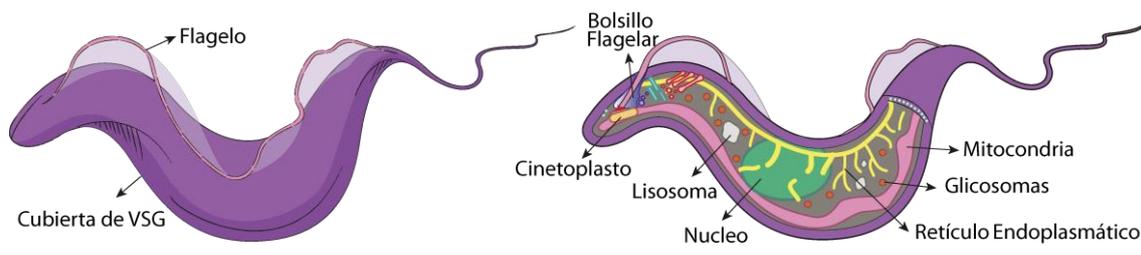


Figura 2.- **Características biológicas de la forma sanguínea de *T. brucei***

Adaptado de Overath y Engstler 2013

Además, los tripanosomátidos poseen un metabolismo redox basado en un ditiol de bajo peso molecular, denominado **tripanotión** [N1-N8-bis (glutationil) espermidina], un ditiol formado por dos moléculas de glutatión (GSH) unidas covalentemente a una molécula de espermidina (Krauth-Siegel and Comini 2008). *T. brucei* carecen de glutatión reductasa (GR) y tiorredoxina reductasa (TrxR), dos enzimas que gobiernan la homeostasis redox en las células de mamíferos (Krauth-Siegel and Comini 2008). En su lugar, los tripanosomátidos poseen un metabolismo de tioles donde la eliminación de peróxido de hidrogeno y otros peróxidos es llevado a cabo mediante el sistema de peroxidasas de tripanotión dependiente de NADPH, cuyos componentes son la tripanotión reductasa (**TRYR**), el tripanotión, la triparredoxina (**TRYX**) y las triparredoxina peroxidasa (**TRYP1** y **TRYP2**) (Tetaud, Giroud et al. 2001).

Aunque inicialmente el interés sobre estos parásitos atendía a razones de salud pública, el descubrimiento de estas características junto a otras peculiaridades de *T. brucei*, como la transcripción policistrónica, el mecanismo de *trans-splicing*, la edición exhaustiva del ARN mitocondrial, y la

endocitosis/exocitosis han convertido a *T. brucei* en un organismo modelo interesante para el estudio de mecanismos de señalización celular.

### 1.- Ciclo de vida y diferenciación de *T. brucei*

La capacidad de las células de evaluar su entorno y responder a los cambios en él es fundamental para su supervivencia. El control de la densidad celular y su regulación es necesaria para asegurar la disponibilidad de nutrientes y espacio, previniendo la acumulación de desechos metabólicos tóxicos. Esta capacidad celular de sensar su densidad crítica, se conoce como “**quorum sensing**”, un proceso que requiere diversas moléculas señalizadoras que sirvan de indicadores de la densidad celular y transmitan esa información rápidamente al interior celular, generando una respuesta. Este mecanismo de respuesta asociado a la densidad celular, con frecuencia conlleva el desarrollo de quiescencia (usualmente acompañada de cambios morfológicos y metabólicos) para promover la supervivencia celular bajo condiciones donde los recursos son escasos (Mony and Matthews 2015).

*T. brucei* posee un ciclo de vida complejo debido a que alterna entre su hospedador mamífero y su vector artrópodo, debiendo adaptarse a las condiciones nutricionales propias de cada uno de ellos. Las formas tripomastigote se caracterizan por el pleomorfismo, es decir, la diferenciación poblacional en diferentes morfotipos (Ver figura 3). De esta forma, en el torrente sanguíneo de su hospedador mamífero, cuando los parásitos alcanzan una densidad que compromete su viabilidad, se someten a una transición entre formas alargadas proliferativas, denominadas “**Slender**”, a formas más achatadas que no se dividen llamadas “**Stumpy**”, preadaptadas para su próximo hospedador, la mosca tse-tsé (Fenn and Matthews 2007).

Este proceso es importante para el ciclo de vida del parásito, debido a que si la forma *slender* inhibe su diferenciación a *stumpy*, la parasitemia descontrolada

provocaría la muerte del hospedador, como es el caso de las cepas adaptadas al laboratorio “monomórficas”, que tras el paso durante años por animales, han perdido la capacidad de diferenciarse y controlar su proliferación dentro del hospedador (Turner 1990).

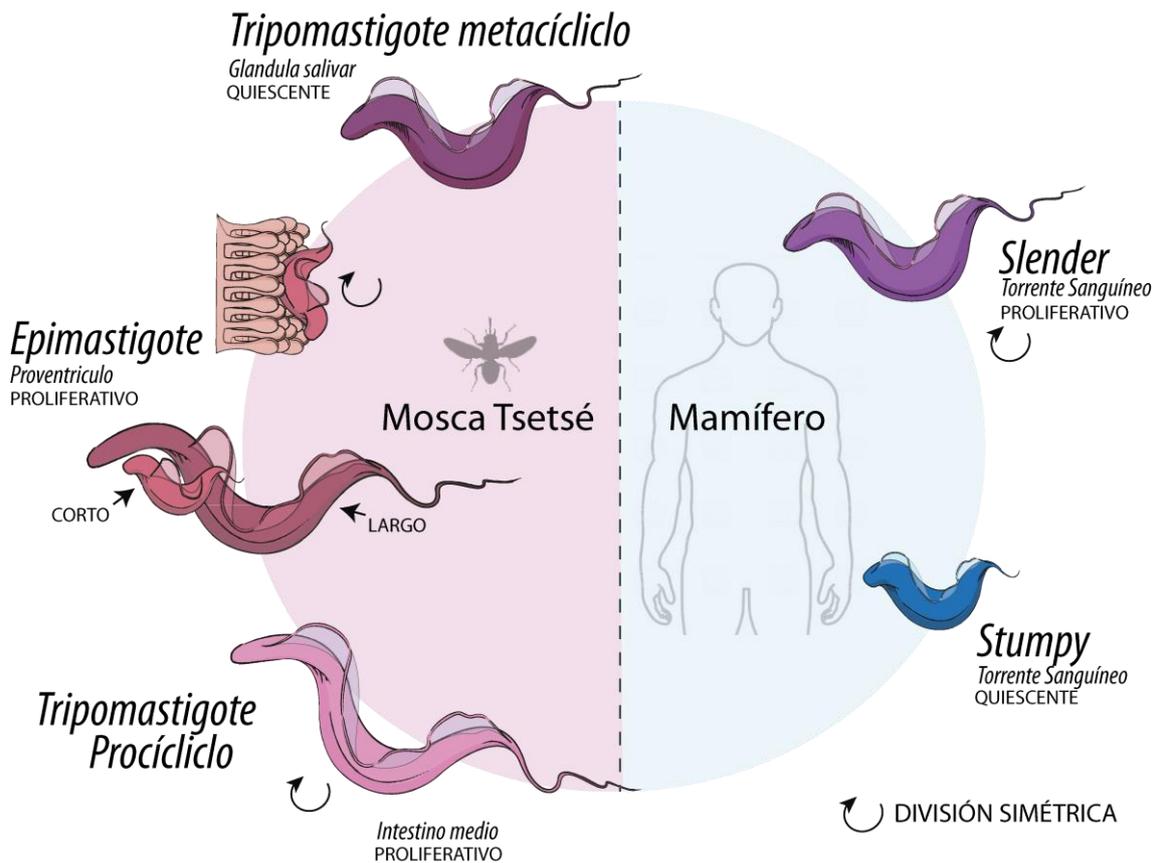


Figura 3. **Ciclo de vida de *T. brucei***

Adaptado de Gerasimos Langousis y Kent L. Hill 2014

Aparte de los cambios morfológicos visibles, la diferenciación hacia la forma *stumpy* implica también varios cambios fisiológicos en el parásito, como la expresión de proteínas de membrana, la reactivación mitocondrial y la adquisición de resistencia a las fluctuaciones de pH, las cuales aseguran su supervivencia durante la picadura por la mosca tse-tsé, y al posterior desarrollo de la forma **tripomastigote procíclica** en el intestino medio del insecto. La transición hacia *stumpy* es por lo tanto vital para el control de la parasitemia, así como para la transmisión eficiente del parásito a la mosca y propagación de la infección.

Una vez en el intestino de la mosca, la forma procíclica se multiplica por fisión binaria, y al alcanzar cierta densidad, dejan de dividirse y migran hacia las glándulas salivares. Una vez allí, los tripomastigotes procíclicos se someten a una amplia reestructuración acoplado a una división asimétrica, para generar un **epimastigote largo** y un **epimastigote corto** ambos proliferativos. El epimastigote corto se adhiere a las células epiteliales próximas a la glándula salival, se replica nuevamente por división asimétrica convirtiéndose en **tripomastigotes metacíclicos** no proliferativos que vuelven a ser infectivos, y que se encuentran libres en el lumen de las glándulas salivales para que una vez que la mosca se alimente de otro hospedador, la saliva que acompaña a la picadura permita la instrucción de estas formas, que posteriormente en el torrente sanguíneo se diferencian nuevamente a formas sanguíneas proliferativas, cerrando así el ciclo (Sharma, Gluenz et al. 2009, Dyer, Rose et al. 2013).

## **2.- Mecanismos reguladores de la diferenciación**

La progresión de la infección de *T. brucei* en su hospedador mamífero sigue un patrón en forma de curva, al menos en sus inicios, cuando las formas *slender* se dividen activamente en fase logarítmica hasta llegar a un pico máximo de parasitemia, que se acompaña por una parada del ciclo celular en fase G1/G0 y la posterior diferenciación a formas *stumpy*. Esta transición dependiente de la densidad celular, es similar a los mecanismos de “*quorum sensing*” observado en organismos procariotas y que esencialmente comprende tres componentes principales: una **molécula señalizadora**, un **receptor** que reciba la señal, y **moduladores** que retransmitan la señal, disparando una serie de cambios que finalmente conlleven a la diferenciación (Rico, Rojas et al. 2013) .

En el caso de los tripanosomas africanos, las células detectan el aumento en su número, y en consecuencia detienen la división celular. Además, esto les asegura que la parasitemia no agotará al hospedador. El estudio de cepas pleomórficas *in vitro* permitió la identificación de un factor soluble de bajo peso molecular denominado “**SIF**” (*Stumpy Induction Factor*), que funciona como molécula señalizadora en la inducción de la diferenciación, descartando así la

contribución del hospedador, y remarcando que este proceso es algo intrínseco del parásito (Reuner, Vassella et al. 1997, Vassella, Reuner et al. 1997).

A pesar de la identificación de SIF, se desconoce su identidad química y mecanismo de acción, lo que dificulta la caracterización de los mecanismos que controlan el proceso de diferenciación de *T. brucei*. Sin embargo, durante los últimos años se han identificado algunos de los componentes en distintos niveles de la señalización, y se describen a continuación:

#### **a. Moléculas señalizadoras**

##### **a.1.- Fosfatasa mediadoras de las rutas de señalización en la diferenciación de tripanosomátidos.**

La fosforilación de proteínas juega un papel importante en el control y la regulación de las funciones celulares en células eucariotas. Esta modificación ocurre mayormente en residuos de serina (Ser) o treonina (T), lo que hace que las fosfatasa de serina/treonina (PP) sean proteínas claves en el control de estos mecanismos celulares. En este sentido, en *T. brucei* se ha descrito que la fosfatasa de tirosina **TbPTP1** previene la diferenciación de formas *stumpy* a procíclica (Szoor, Wilson et al. 2006), mediante la desfosforilación de otra fosfatasa llamada **TbPIP39** (Szoor, Ruberto et al. 2010). Recientemente, se identificaron otras dos fosfatasa implicadas en la diferenciación de formas sanguíneas a *stumpy*: una fosfatasa dual específica (**DsPhos**) y la fosfatasa **PP1** (Mony, MacGregor et al. 2014).

Glc7 es el ortólogo de PP1 en levaduras, y está implicada en la señalización mediada por glucosa mediante su interacción de diversas proteínas reguladoras (por ejemplo Reg1). Glc7 es capaz de inactivar a SFN1 (AMPK en mamíferos), que a su vez transmite la señal de disminución de glucosa (Ruiz, Xu et al. 2011). En tripanosomas, algunos miembros de la familia PP1 tienen efecto directo sobre el desarrollo de *T. brucei*. De esta manera, la inhibición de los miembros de esta familia frena la progresión hacia la forma *stumpy*, mientras que su sobreexpresión conlleva una parada en el ciclo celular en fase G1 (Mony, MacGregor et al. 2014). La coincidente identificación de una subunidad de AMPK en la búsqueda de moléculas reguladoras de

diferenciación en *T. brucei*, sugiere que PP1 puede estar actuando de forma similar al observado en levaduras.

## **a.2. - Quinasas como sensores de la disponibilidad de nutrientes**

Hasta los inicios de esta tesis doctoral, se conocía muy poco sobre la implicación de quinasas que tuviesen un rol directo en el proceso de diferenciación hacia la forma *stumpy*. Sin embargo, se han identificado algunas quinasas que actúan como reguladoras negativas de la diferenciación, cuya pérdida de función genera quiescencia. Este es el caso de la quinasa **ZFK** (por Zinc Finger Kinase), cuya inhibición *in vitro* en cepas pleomórficas reduce la proliferación e incluso aumenta la tasa de diferenciación de formas *slender* a *stumpy* (Vassella, Kramer et al. 2001). En células de mamíferos, se ha estudiado las rutas de señalización mediada por la familia de quinasas MAPK/ERK en procesos de diferenciación y ciclo celular (Anjum and Blenis 2008). Esta ruta, se conforma por un conjunto de tres quinasas (MAPKKK, MAPKK, y MAPK) que secuencialmente se activa unas a otras, formando parte de un complejo sistema de señalización celular (Gustin, Albertyn et al. 1998). Dentro de esta ruta, la quinasa que se encuentra al principio de la cascada es la MAPKKK (**MEK**), y en tripanosomas, se ha encontrado una proteína (**Tb927.2.2720**) que posee un dominio MEK, y cuya inhibición molecular hace que las cepas pleomórficas sean insensibles al SIF (datos no publicados por el laboratorio de K. R. Matthews). Debido a que estas quinasas en otros eucariotas, tienen un papel importante en la transmisión de señales extracelulares, es posible que Tb927.2.2720 esté muy cercano a un receptor de SIF, hasta ahora no descubierto.

En *T. brucei*, el *knock-out* de otro homólogo de esta ruta, llamado **TbMAPK5** activa la diferenciación hacia la forma *stumpy*, incluso en modelos *in vivo* (Domenicali Pfister, Burkard et al. 2006). Sin embargo, las funciones tanto de ZFK como de TbMAPK5 han sido observadas solo en cepas pleomórficas, y no en cepas monomórficas. Lo que sugiere que en las cepas monomórficas, alguno de los componentes de estas rutas ha sido suprimido o no responde a estas cascadas de señalización.

Las proteínas de la familia DYRK son quinasas de doble especificidad, altamente conservadas entre organismos. Uno de los miembros de esta familia, la quinasa **YAK** actúa como supresor de la proliferación (Lee, Paik et al. 2011). El homólogo de YAK en *T. brucei* (Tb927.10.15020), tiene una función comparable en la inhibición del ciclo celular, y además su inhibición molecular conlleva un aumento en la proliferación y la retención de formas *slender*, previniendo así la formación de la forma *stumpy* (Mony, MacGregor et al. 2014).

Otras proteínas implicadas en el ciclo celular son las pertenecientes a la familia NIMA (*Never in mitosis A*) o **NEK** (Fry, O'Regan et al. 2012). En tripanosomas, esta familia de proteínas es bastante amplia, y sus funciones en el control del ciclo celular se mantienen conservadas. Además, la inhibición de estas quinasas retrasan la diferenciación hacia formas *stumpy*, aunque el fenotipo es menos fuerte comparado con otras quinasas descritas (Jones, Thomas et al. 2014).

Durante los últimos años se han identificado otras quinasas involucradas en pasos posteriores de la diferenciación hacia la forma procíclica, como es el caso de **RDK1** y **RDK2** (por *repressor of differentiation kinase*). La inhibición de ambas quinasas en cepas monomórficas, promueve la diferenciación de formas sanguíneas a procíclicas (Jones, Thomas et al. 2014).

### **b.- Reguladores genéticos**

Los moduladores finales en cualquier ruta de señalización son los que inducen la expresión génica y el cambio de la traducción en función al estímulo recibido y las necesidades celulares. En este sentido, las regulaciones post-transcripcionales han cobrado importancia en tripanosomátidos durante los últimos años, debido a que ciertas proteínas de unión a ARN (RBPs) tienen funciones importantes en varias fases del desarrollo del parásito (Clayton 2014, Kolev, Ullu et al. 2014). En *T. brucei* la proteína de unión a ARN **RBP7**, está expresada por dos genes casi idénticos: RBP7A (Tb927.10.12090) y RBP7B (Tb927.10.12100) es el único candidato que se ha demostrado experimentalmente que interfiere en la diferenciación hacia la forma *stumpy*. Esta proteína tiene una secuencia de motivo único de reconocimiento de ARN

(RRM) y, aunque su sobreexpresión conduce prematuramente la formación de formas *stumpy*, su inhibición molecular genera una respuesta retardada a SIF, impidiendo la diferenciación (Mony, MacGregor et al. 2014). Además, se han descrito otras RBPs implicadas en la transición de formas procíclicas a sanguíneas durante la metaciclogénesis (Kolev, Ramey-Butler et al. 2012).

### **c.- Proteínas hipotéticas**

El rol exacto de una proteína anotada en el genoma como “hipotética” es un reto dentro de la biología del tripanosoma, debido a que no se cuenta con información alguna sobre su probable función. Sin, embargo se han identificado dos proteínas hipotéticas, denominadas **HYP 1** (Tb927.11.6600) y **HYP 2** (Tb927.9.4080) capaces de regular la diferenciación a formas *stumpy* (Mony, MacGregor et al. 2014).

### **d.- Componentes de los sitios de expresión (ES)**

Durante los picos de parasitemia, las formas sanguíneas (*slender*) que emergen en cada nueva curva poseen una superficie antigénicamente distinta de la **glicoproteína variable de superficie** (VSG) anterior, lo que les permite proliferar y evadir la respuesta inmunológica del hospedador. El parásito alberga varios cientos de genes VSG agrupados en regiones subteloméricas, además de unos 15-20 **sitios de expresión (ES)** de los cuales sólo uno está activo en un momento dado (Pays, Lips et al. 2001). Además estos ES contienen además otros genes conocidos como genes asociados a los sitios de expresión (ESAGs). Aunque se cree que el control de ES y la diferenciación son en su mayoría eventos independientes, existen algunas evidencias de coordinación entre estos. En primer lugar, la transición *slender/stumpy* ha demostrado estar acompañada del silenciamiento del sitio de expresión activo (Amiguet-Vercher, Perez-Morga et al. 2004). Recientemente, se demostró que la depleción de tres ESAGs (ESAG1, 2 y 8) puede inducir el arresto del ciclo celular y la expresión del marcador específico de la forma *stumpy* PAD1 (Batram, Jones et al. 2014).

Una familia inusual de ESAGs es la familia de genes **ESAG9** (Florent, Raibaud et al. 1991). Estos genes son muy diversos y rara vez se encuentran como componentes de los sitios de expresión VSG convencionales; la mayoría de

copias de este gen se localizan dentro de las unidades de transcripción policistrónicas ubicadas dentro de regiones cromosómicas internas y sub-teloméricas (Barnwell, van Deursen et al. 2010). A pesar de las proteínas codificadas por genes ESAG9 son de función desconocida, se conoce que son secretadas por las formas sanguíneas del parásito, lo que podría ayudar a la infección o la cronicidad de transmisión (Barnwell, van Deursen et al. 2010). Lo más interesante es que la expresión de los genes ESAG9 varía según el desarrollo del parásito en el torrente sanguíneo de los mamíferos, expresándose únicamente la transición *slender/stumpy* (Jensen, Sivam et al. 2009, Barnwell, van Deursen et al. 2010).

#### **e.- Integración de los componentes**

Durante la última década, se ha proporcionado la primera visión molecular de como los tripanosomas son capaces de monitorear su entorno y diferenciarse a formas *stumpy* para preadaptarse para la transmisión a la mosca. Algunos investigadores han especulado que los tripanosomas poseen un mecanismo dual para controlar la diferenciación, que consta de mecanismos *pro-slender*, y otros *pro-stumpy*. Un conjunto de genes, agrupados dentro de la categoría “**Pro-slender**” (ZFK, MAPK5, PP1, DsPhos, etc) que se expresan constitutivamente y mantienen un estado proliferativo activo en el parásito. La forma *slender* se mantiene hasta que la acumulación de SIF induce una respuesta similar al estrés nutricional, lo que conlleva la represión del conjunto de proteínas “*pro-slender*” y la activación de los “*pro-stumpy*”.

Este giro de la balanza hacia el componente *pro-stumpy*, además afectar el ciclo celular, prepara al parásito para su próximo hospedador, reactivando las funciones mitocondriales requeridas para la fosforilación oxidativa y eliminando proteínas que ya no le son necesarias al parásito durante su paso por la mosca. Entre los mecanismos descritos como **pro-stumpy**, si bien se desconoce la caracterización química del SIF, los primeros estudios en diferenciación indicaban que la adición de medio condicionado (que contiene SIF) a cepas pleomórficas inducía un incremento en los niveles intracelulares de **cAMP** (Vassella, Reuner et al. 1997). Esto sugería que el cAMP podría actuar de mensajero secundario, retransmitiendo la señal de SIF. Posteriormente, se comprobó que eran los productos de degradación del cAMP

(por ejemplo **AMP** y adenosina) los que realmente inducían el proceso de diferenciación, incluso en cepas insensibles al SIF (Laxman, Riechers et al. 2006), sugiriendo que el desbalance energético es un factor desencadenante para el proceso de diferenciación de *T. brucei*.

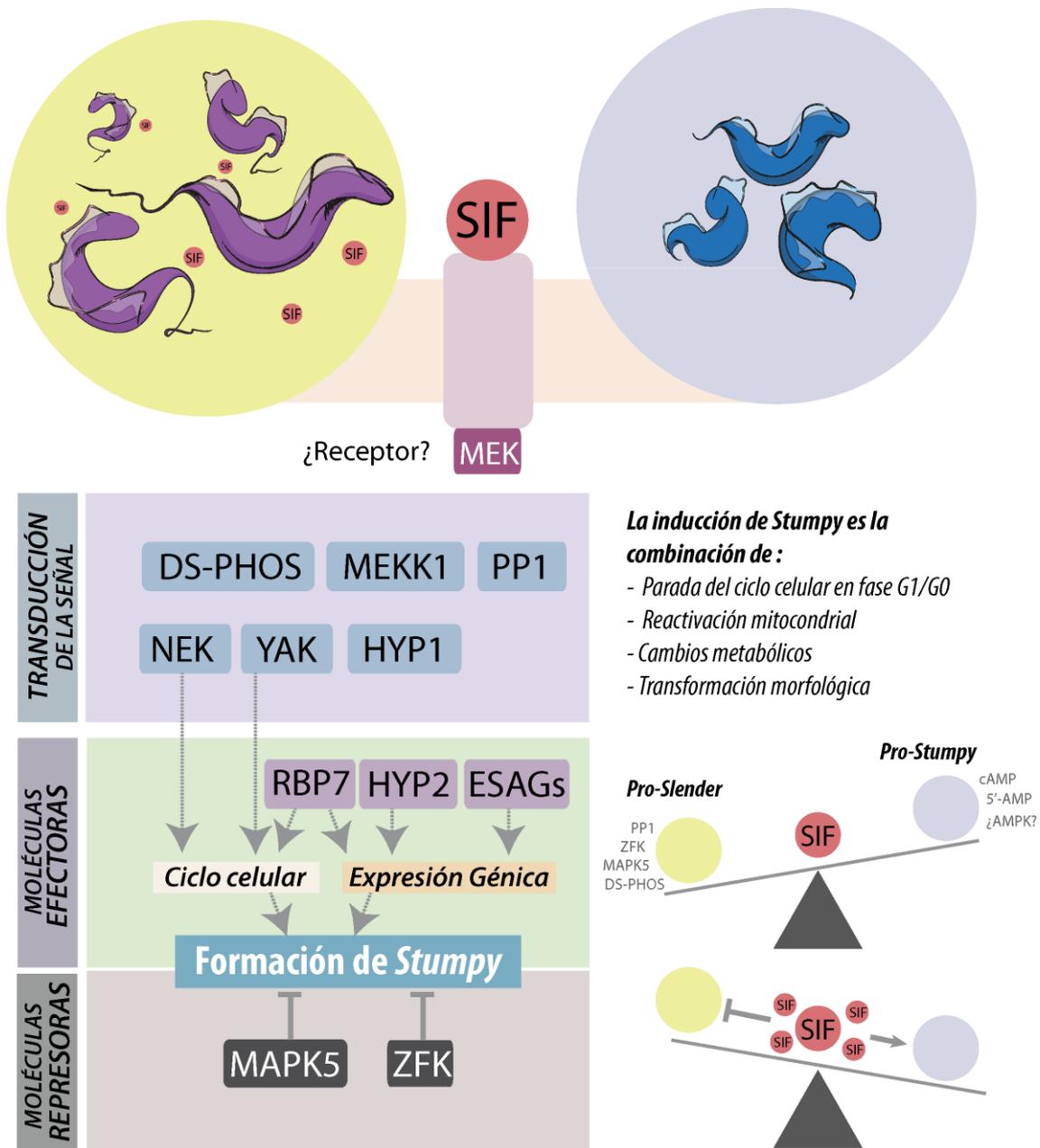


Figura 4. – **Reguladores descritos de la diferenciación de *T. brucei***  
Adaptado de Binny y Matthews 2014

Para llevarse a cabo el proceso de diferenciación, el parásito debe ser capaz de integrar las señales del entorno y traducirlas con el objetivo de mantener su viabilidad entre hospedadores. Este proceso involucra distintos mecanismos

celulares que consumen energía y debe ser regulado de manera que le permita reprogramar su metabolismo en función a sus propios requerimientos nutricionales y la disponibilidad de recursos del hospedador. En la mayoría de los organismos, las dos proteínas que orquestan el equilibrio entre adaptación nutricional y energética son **mTOR** y **AMPK** respectivamente, las cuales son el objetivo de esta tesis doctoral y describiremos a continuación.

## II. Regulación del crecimiento celular mediante mTOR

La mayoría de los organismos han desarrollado mecanismos para lograr una transición eficiente entre estados anabólicos y catabólicos, como estrategia para sobrevivir y crecer en ambientes donde la disponibilidad de nutrientes es variable. En mamíferos, un ejemplo de estos mecanismos son las rutas de señalización encabezadas por la proteína quinasa mTOR (originalmente llamada "*mammalian Target of Rapamycin*", recientemente tras un consenso se decidió renombrarla como "*mechanistic TOR*") (Laplante and Sabatini 2012).

Los primeros estudios en esta quinasa se realizaron en levaduras, donde se identificó como una proteína capaz de controlar el crecimiento celular, y con alta sensibilidad al macrólido antifúngico Rapamicina, de donde deriva su nombre. La inhibición de mTOR por parte de la Rapamicina, ocurre cuando el compuesto se une a una proteína denominada FKBP12 (*FK506-binding protein of 12 kDa*), y este complejo Rapamicina-FKB12 tiene alta afinidad para unirse a mTOR (Sabers, Martin et al. 1995) provocando su inhibición enzimática.

Es cada vez más evidente que mTOR tiene un gran impacto en la mayoría de procesos celulares básicos como el crecimiento y la proliferación. Esto ha hecho que desde su descubrimiento en levaduras a principios de los 90, esta quinasa se considere un regulador central del crecimiento, tanto espacial como temporal. Además, debido a que mTOR a nivel evolutivo se encuentra muy conservado, y gracias al uso clínico de la rapamicina y sus derivados, se ha abierto un campo prometedor por sus posibilidades como diana en terapias inmunosupresoras y antitumorales.

### **a. Conservación evolutiva de la ruta de señalización mTOR**

Sin duda, el descubrimiento de las propiedades inmunosupresoras de la rapamicina, y la posterior identificación de su quinasa diana en levaduras, fue el paso determinante en la identificación de las quinasas TOR. Inicialmente, TOR se descubrió mediante el análisis genético de mutantes de levaduras que presentaban resistencia a la inhibición del crecimiento por rapamicina. Así, los estudios en *Saccharomyces cerevisiae* permitieron la identificación de dos quinasas TOR, scTOR1 y scTOR2, además de la proteína scFKBP12 (Heitman, Movva et al. 1991).

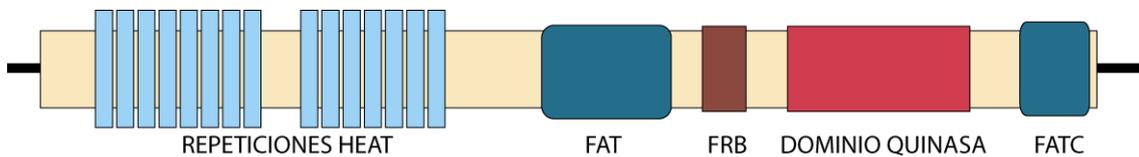
Los estudios en levaduras facilitaron el posterior descubrimiento de TOR en otros eucariotas superiores. A mediados de los 90, y aprovechando la capacidad de TOR para unir rapamicina, se identificó bioquímicamente su homólogo en mamíferos, mTOR (Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994). Posteriormente se identificaron los homólogos en moscas, gusanos y plantas, lo que sugiere que mTOR se conserva en todas las formas de vida eucariotas (van Dam, Zwartkruis et al. 2011).

### **b. Estructura de las quinasas mTOR**

De manera generalizada, la proteína mTOR es una quinasa de serina y treonina de gran tamaño (~280 kDa) que presenta en su extremo carboxilo una región con alta homología al dominio catalítico de la *fosfatidil inositol 3-quinasa* (PI3K), por lo que se les incluye dentro de la familia de las quinasas PIKK (por *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*). Las proteínas pertenecientes a esta familia se encuentran involucradas en diversos procesos celulares tales como el control del crecimiento celular, la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño al ADN.

A nivel estructural, las quinasas mTOR se mantienen conservadas en la mayoría de los organismos. En su extremo amino terminal encontramos repeticiones múltiples de una serie de dominios implicados en la mediación de interacciones proteína-proteína, denominadas **HEAT** (por *Huntington*, *Elongation factor 3 (EF3)*, *protein phosphatase 2A (PP2A)*, and the yeast kinase *TOR1*) (Andrade and Bork 1995). Este dominio es requerido en

levaduras para la unión de scTOR2 a la membrana plasmática y en mamíferos para su interacción con Raptor, de la cual hablaremos posteriormente (Kunz, Schneider et al. 2000, Kim, Sarbassov et al. 2003).



**Figura 5. Organización Estructural clásica de los dominios presentes en las quinasas mTOR**

Modificado de Qian Yang y Kun-Liang Guan 2007

Las quinasas mTOR también presentan un dominio denominado **FAT** (FRAP, ATM, TRRAP) poco conservado entre este tipo de quinasas PIKK, y un dominio de 33 aminoácidos denominado **FATC** (FRAP, ATM, TRRAP, C-terminal) bastante conservado. Se cree que ambos dominios son necesarios para la actividad catalítica de mTOR, ya que mutaciones en estos dominios alteran la fosforilación de algunos sustratos de mTOR como proteína quinasa S6 ribosomal (S6K1) y las proteínas de unión al factor iniciador de la traducción 4E (4E-BP) (Urano, Comiso et al. 2005).

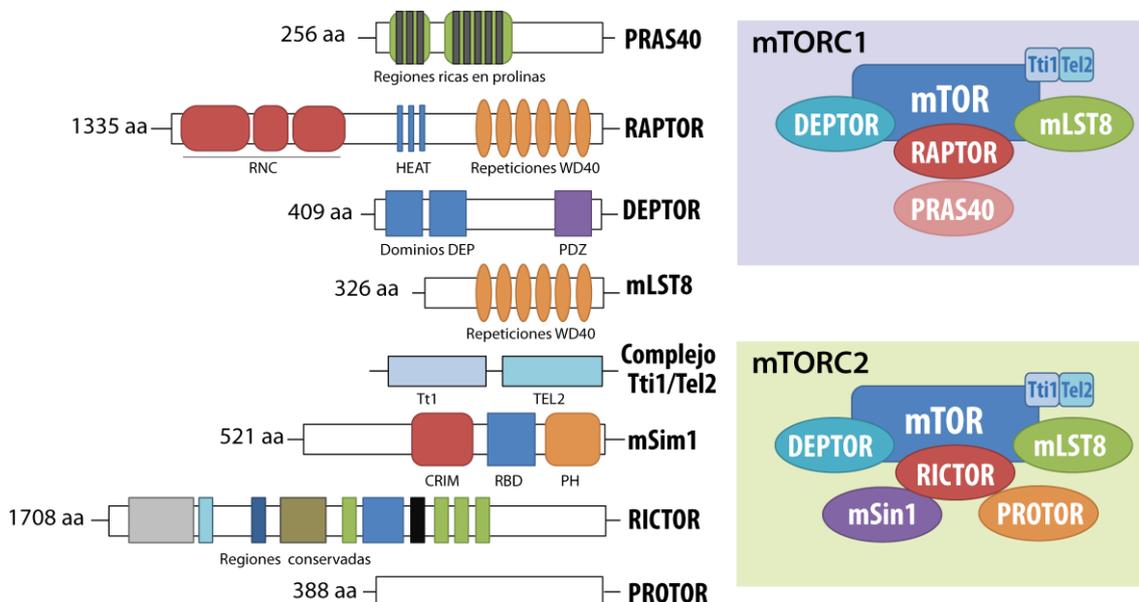
El dominio más característico de las quinasas mTOR es su sitio de unión al complejo FKBP12-Rapamicina, denominado **FRB** (*FKBP12-rapamycin binding domain*). Es un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos, identificado por primera vez en *S. cerevisiae*, en donde mutaciones puntuales en este dominio conferían resistencia a la rapamicina (Chen, Zheng et al. 1995).

### c. Estructura de los complejos mTOR

Como se mencionó anteriormente, *S. cerevisiae* posee dos proteínas TOR distintas, que conforman dos complejos multiprotéicos distintos (Loewith, Jacinto et al. 2002). Así, scTORC1 está formado por la unión de scTOR1 a Kog1, Lst8 y Tco89. Este complejo promueve la biogénesis y la toma de nutrientes bajo condiciones favorables del crecimiento. La inhibición TORC1 mediante la privación de nutrientes o el tratamiento con rapamicina conlleva la inhibición de síntesis de proteínas y autofagia. Por otra parte, el complejo

scTORC2 se encuentra formado por la unión de scTOR2 a Avo1-3, Bit61, and Lst8, es en gran medida insensible al tratamiento con rapamicina y regula los aspectos espaciales del crecimiento, como la organización del citoesqueleto (Wedaman, Reinke et al. 2003).

En mamíferos, mTOR actúa como la subunidad catalítica de dos complejos distintos: el complejo mTOR de tipo 1 (**mTORC1**), sensible a rapamicina, que se define por su interacción con la proteína Raptor ("*regulatory-associated protein of mTOR*"), y el complejo de tipo 2 (**mTORC2**) insensible a rapamicina, que se define por su interacción con Rictor ("*rapamycin-insensitive companion of mTOR*") (Loewith, Jacinto et al. 2002). Estos complejos proteicos son de gran tamaño, se ha descrito que mTORC1 y mTOR2 tiene al menos seis y siete componentes respectivamente. Ambos complejos comparten la subunidad catalítica mTOR, y además la proteína LST8 (también conocida como GβL). El resto de proteínas propias de cada complejo determina la especificidad de sustrato de mTOR y en consecuencia su funcionalidad (Kim, Sarbassov et al. 2003, Jacinto, Loewith et al. 2004).



**Figura 6.- Esquema representativo de los componentes de los complejos mTORC.** Modificado de David M. Sabatini 2011

#### **d. Complejo mTOR de tipo 1 (mTORC1)**

El complejo mTORC1 juega un papel fundamental en el crecimiento celular. En este sentido, mTORC1 es el encargado de integrar múltiples señales que provienen de los cambios dinámicos en el entorno extracelular, muchos de los cuales están relacionados con la disponibilidad de nutrientes, particularmente aminoácidos, que utiliza la célula para crecer y funcionar. A continuación se describen los principales componentes del complejo mTORC1.

- **Raptor**

Es una proteína adaptadora de 150 kDa cuya estructura se encuentra conservada de levaduras a humanos. Es esencial para el ensamblaje y localización del complejo mTORC1. A nivel de estructura, se compone de una zona amino terminal conservada (RNC), seguido de cuatro repeticiones HEAT en posición central y siete repeticiones WD40 en la región carboxilo terminal. La unión con Raptor - mTOR es sensible al uso de rapamicina y a la privación de nutrientes. Además, Raptor se une a S6K1 y 4E-BP, dos sustratos importantes mediante los cuales mTOR controla el crecimiento celular (Hara, Maruki et al. 2002).

- **LST8**

Es una proteína de 36 kDa común a ambos complejos mTOR. A nivel estructural posee 7 repeticiones WD40 e interacciona con el dominio catalítico de mTOR. Aunque no se conoce bien su mecanismo de acción, se sabe que la pérdida de LST8 no afecta la actividad de mTORC1 *in vivo* (Guertin, Stevens et al. 2006) . Por otra parte, la unión de LST8 a mTOR incrementa su actividad catalítica y en condiciones de privación de nutrientes estabiliza la unión de mTOR con Raptor, mediando así la inhibición de mTOR (Kim, Sarbassov et al. 2003).

- **PRAS40** (proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa)

Es una proteína de 40 kDa enriquecida en residuos de prolina que es capaz de inhibir a mTOR, mediante su unión a Raptor. Esta interacción con Raptor se

debilita por la insulina y en menor medida por los aminoácidos. Actúa como proteína de intersección entre las rutas de Akt y mTOR. PRAS40 compite con otros sustratos de mTORC1, por la unión a dicho complejo. Aunque al principio se pensaba que PRAS40 era sustrato mayoritario de Akt, estudios posteriores han demostrado que también es componente y sustrato de mTORC1: esto es debido a que posee un motivo estructural característico de proteínas fosforiladas por mTOR, denominado **TOS** (TOR signalling motif). De esta manera, la fosforilación de PRAS40 tanto por Akt como por mTORC1 provoca la disociación de PRAS40 del complejo mTORC1, lo que conlleva su activación. Por otra parte, la privación de insulina promueve la unión de PRAS40 a mTORC1, desplazando a S6K1 Y 4E-BP e impidiendo su fosforilación (Vander Haar, Lee et al. 2007, Wiza, Nascimento et al. 2012).

- **Deptor** (DEP domain-containing mTOR-interacting protein)

Es una proteína de 46 kDa, común a ambos complejos mTORC1 Y mTORC2 que se encuentra solo en organismos vertebrados. A nivel de estructura, esta proteína está compuesta por dominios **DEP** (*Dishevelled*, *Egl-10* and *Pleckstrin domain*) en su extremo amino terminal y un dominio **PDZ** en su extremo carboxilo. Funcionalmente, Deptor actúa como inhibidor dentro de la ruta de señalización de mTOR, al cual se une de forma directa. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Deptor inhibe la actividad de mTORC1 mientras aumenta la de mTORC2. Esto hace que Deptor esté involucrado en la regulación de la autofagia mediada por mTOR. Por otra parte, DEPTOR es sustrato de la ligasa E3 de ubiquitina SCF<sup>βTrCP</sup> lo que hace que sea rápidamente degradada por el proteasoma, promoviendo así una apropiada activación de mTOR y el mantenimiento de la proliferación celular (Zhao, Xiong et al. 2011, Zhang, Chen et al. 2013).

- **Complejo Tti1/Tel2**

Estas dos proteínas han sido descritas como reguladoras positivas de los complejos mTORC1 y mTORC2. Se ha descrito que **Tti1** se une de forma directa a mTOR en ambos complejos. Además, Tti1 se une a **Tel2** (*telomere maintenance 2*), una proteína involucrada en la regulación de la estabilidad de

otras PIKKs. A nivel funcional, tanto la depleción de Tti1 como de Tel2, desestabiliza los complejos mTOR, inhibiendo la fosforilación de sustratos de mTORC1 (S6K1 and 4E-BP1) y de mTORC2 (Akt), e incluso es capaz de inducir autofagia (Kaizuka, Hara et al. 2010).

#### **e. Complejo mTOR de tipo 2 (mTORC2)**

En un principio, mTORC2 se identificó como un complejo insensible al uso de rapamicina, debido a que el uso a corto plazo de ésta, no afectaba la actividad del complejo, o la fosforilación de Akt (Sarbasov, Guertin et al. 2005) . Sin embargo, estudios posteriores han demostrado, que al menos en algunas líneas celulares, el uso prolongado de rapamicina, si bien no afecta complejos TORC2 preexistentes, sí promueve la inhibición de nuevas proteínas mTOR, inhibiendo así la formación de nuevos complejos TOR (Sarbasov, Ali et al. 2006).

El complejo mTORC2 está formado por seis proteínas diferentes, algunas de las cuales son comunes al complejo mTORC1, como es el caso de la propia mTOR, LST8, Deptor y el complejo Tti1/Tel2. Además el complejo está formado por Rictor, mSin1 y Protor 1/2.

- **Rictor** (proteína acompañante de TOR insensible a rapamicina)

Tanto en mamíferos como sus ortólogos en *S. cerevisiae* (**AVO3**) y *S. pombe* (**Ste20**) son proteínas de andamiaje del complejo mTORC2. Es una subunidad reguladora similar a Raptor, pero insensible al uso de rapamicina o la privación de nutrientes. Aunque se encuentra conservado en la evolución, no presenta dominios de función conocida. Sin embargo se han identificados múltiples sitios de susceptibles de fosforilación, uno de ellos sustrato de S6K1 (sustrato de mTORC1): la fosforilación de Rictor por parte de S6K1 inhibe la fosforilación de Akt, afectando así la proliferación celular. Este mecanismo representa una vía de posible comunicación entre ambos complejos mTOR. Además, se ha descrito que el uso prolongado de rapamicina, causa la desfosforilación de Rictor, afectando la localización del complejo mTORC2 (Akcanat, Singh et al. 2007, Rosner and Hengstschlager 2008).

- **mSin1**

La proteína **mSin** en mamíferos, y sus ortólogos **AVO1** y **Sin1** en *S. cerevisiae* y *S. pombe* respectivamente, son proteínas de andamiaje que regulan tanto la estabilidad del complejo TORC2 como su actividad quinasa. Se han descrito hasta cinco isoformas distintas de mSin1, tres de las cuales son capaces de formar complejos TORC2 (Frias, Thoreen et al. 2006). Además, mSin1 y Rictor interaccionan de manera estable y al igual que Rictor, mSin1 regula positivamente la fosforilación de Akt y la organización de las fibras de actina en células de mamíferos (Yang, Inoki et al. 2006).

- **Protor 1/2** (*protein observed with Rictor-1*)

Tanto Protor-1 como su isoforma Protor-2 son proteínas que se unen a Rictor de manera firme, formando así parte del complejo TORC2. Además, la estabilidad de Protor 1/2 depende de la expresión de Rictor. A nivel funcional, si bien la depleción de estas isoformas parece no afectar unión de otros componentes de TORC2, la depleción de Protor-1 afecta la fosforilación de SGK1 (*serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*), un sustrato de mTORC2 importante en la respuesta celular frente al estrés (Pearce, Huang et al. 2007, Pearce, Sommer et al. 2011).

#### **f. mTORC1 como regulador central del crecimiento y el metabolismo celular**

El complejo mTORC1 es el mejor caracterizado de los dos complejos mTOR. Una característica importante de esta ruta es el número y la diversidad de señales que es capaz de reconocer y controlar. La ruta mTORC1 integra señales de al menos cinco de las principales señales extracelulares e intracelulares: factores de crecimiento, el estrés, los niveles de energía, oxígeno y aminoácidos. Todo esto para controlar procesos celulares importantes, como la síntesis de proteínas, síntesis de lípidos, y la autofagia (Laplante and Sabatini 2012).

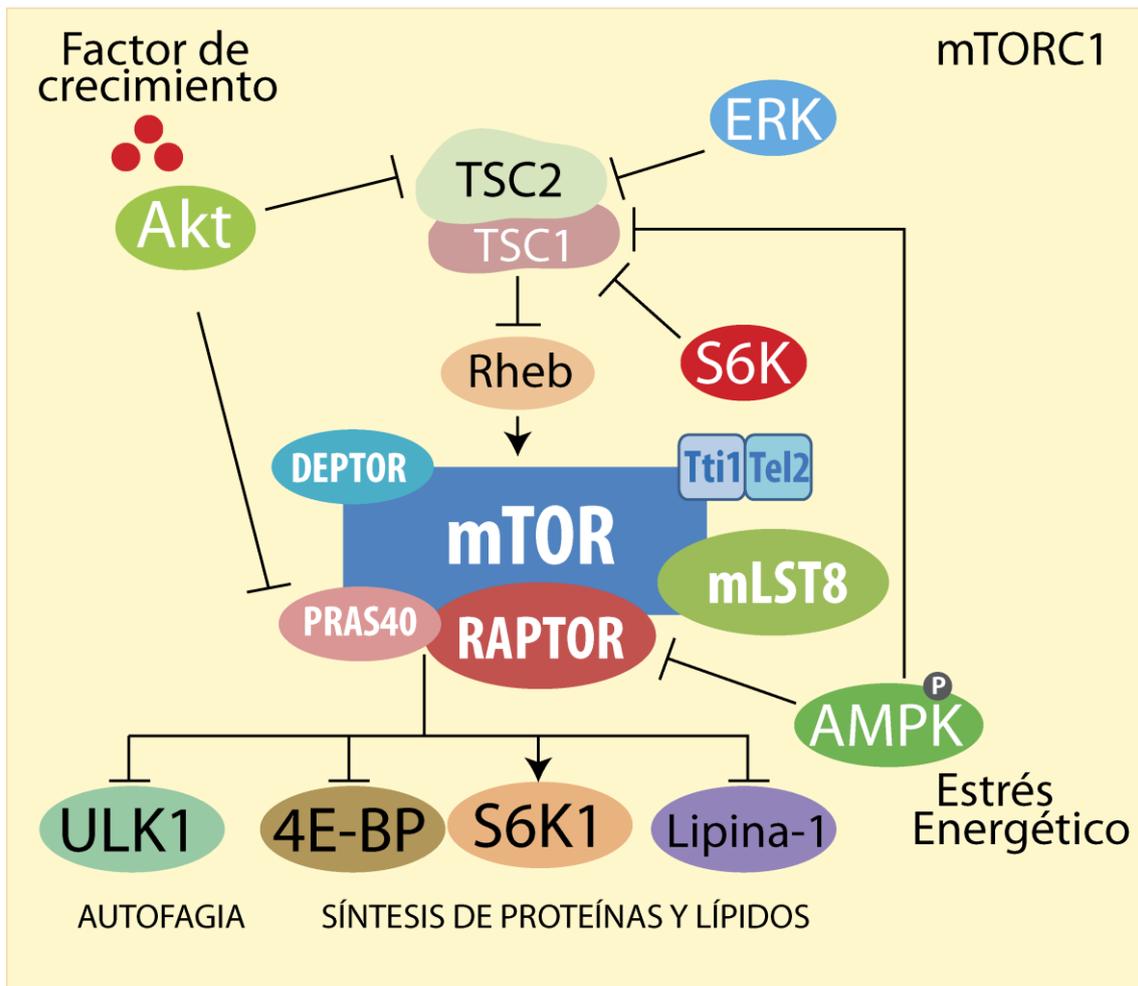


Figura 7. **Regulación y funciones de mTORC1**

Adaptado de Laplante y Sabatini 2012

Según sea el estímulo precedente, el complejo mTORC1 puede regularse mediante diversas formas, siendo la ruta de señalización Akt una de las mejor caracterizadas (Ver figura 7). Una vez que algún factor de crecimiento afecta en el entorno celular, Akt puede regular mTORC1 mediante fosforilación directa o indirectamente al fosforilar e inhibir los complejos de esclerosis tuberosa 1 y 2 **TSC1/TSC2** (también conocidos como hamartina y tuberina respectivamente) (Manning and Cantley 2003). Además, la quinasa Akt puede regular la actividad de mTORC1 de manera independiente a TSC1/2 mediante la fosforilación de PRAS40, causando su disociación de Raptor, previniendo así su capacidad de activar a 4E-BP y S6K1 (Vander Haar, Lee et al. 2007).

Se han descrito que otras proteínas como la quinasa regulada por señales extracelulares **ERK1/2** (por Extracelular signal-regulated kinases) y la quinasa

ribosomal S6 (**S6K1**) son capaces de fosforilar directamente el complejo TSC1/2 e inhibir indirectamente mTORC1 (Roux, Ballif et al. 2004, Ma, Chen et al. 2005).

Además de los factores de crecimiento otros tipos de estrés señalizan, al menos en parte, a través de TSC1/TSC2, siendo la privación de oxígeno y energía y el daño al ADN las rutas mejor caracterizadas.

El estado energético celular afecta la actividad de mTORC1, de manera que una disminución en la disponibilidad de glucosa se traduce en una inhibición del complejo, y por tanto de sus procesos asociados. Así, mTOR es un detector del suministro de energía, esta regulación energética ocurre a través de **AMPK** (quinasa activada por AMP) que en casos de privación de oxígeno y energía es capaz de inhibir a mTORC1 indirectamente mediante la fosforilación de Raptor, o del complejo TSC1/TSC2 (Shaw 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, mTORC1 coordina el balance entre los procesos anabólicos y catabólicos con el fin de mantener la viabilidad celular. Los principales procesos asociados al complejo mTORC1 se encuentran descritos a continuación.

#### **i. Síntesis de proteínas**

El complejo mTORC1 regula positivamente la síntesis de proteínas mediante varios mecanismos efectores. De manera generalizada, mTORC1 promueve la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de 4E-BP1 y de S6K1. Cuando 4E-BP1 está desfosforilado se une al factor de inicio de la traducción y reprime su actividad. La fosforilación de 4E-BP1 previene su unión a eIF4E, permitiendo que eIF4E promueva la iniciación de la traducción dependiente del CAP (Gingras, Raught et al. 2001).

Por otra parte, el aumento de la actividad de S6K1 mediada por mTORC1 promueve un incremento en la biogénesis del ARN mensajero, el inicio de la

traducción y elongación dependiente del CAP, y la traducción de proteínas ribosomales. Esto ocurre a través de la regulación de la actividad de muchas proteínas, como la SKAR (*S6K1 aly/REF-like target*), la Proteína de la muerte celular programada 4 (*PDCD4*), la quinasa del Factor 2 de Elongación en eucariotas (eEF2K) y la proteína ribosomal S6 (Ma and Blenis 2009).

Por otra parte, la activación de mTORC1 promueve la síntesis de proteínas orquestando la regulación de la transcripción del ARN ribosomal mediante la ARN-polimerasa de tipo I (ARN pol I). Esto ocurre debido a que mTORC1 regula la actividad del factor de iniciación de la transcripción IA (TIF-IA) y de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A), dos factores reguladores que censan la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Mayer, Zhao et al. 2004).

## ii. Síntesis de lípidos

La regulación de síntesis de lípidos es requerida para el crecimiento celular y la proliferación. Se ha demostrado que mTORC1 regula positivamente la actividad de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides **SREBP**, y el receptor de peroxisoma-proliferador- activado gamma (PPAR $\gamma$ ), dos factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la homeostasis de lípidos y colesterol (Kim and Chen 2004, Porstmann, Santos et al. 2008). Además, la inhibición de mTORC1 mediante rapamicina, reduce la fosforilación de la proteína Lipina-1, una fosfatasa del ácido fosfátidico involucrada en la síntesis de glicerolípidos y en la co-activación de muchos factores de transcripción asociados al metabolismo de los lípidos como PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  y PGC1- $\alpha$  (Huffman, Mothe-Satney et al. 2002).

La ruta de señalización mTORC1 es capaz de integrar y regular el metabolismo de los lípidos, mediante la regulación de rutas anabólicas, que comprenden la lipogénesis, adipogénesis y la esterificación de ácidos grasos, y rutas catabólicas, que incluyen la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación (Soliman 2011).

### **iii. Metabolismo y biogénesis mitocondrial**

La inhibición de mTORC1 con rapamicina, disminuye el potencial de membrana mitocondrial, la consumición de oxígeno, los niveles de ATP y altera de manera significativa el fosfoproteoma mitocondrial (Schieke, Phillips et al. 2006). Se ha demostrado que el tratamiento con rapamicina desacopla la unión de mTOR con Bcl-xl (una proteína de membrana mitocondrial), impidiendo que Bcl-xl sea fosforilado por mTOR en el residuo de serina 62 (Ser42), afectando el metabolismo mitocondrial. Existen evidencias que indican que la unión de mTOR con la mitocondria sirve de interruptor celular para alternar el metabolismo glucídico y respiratorio (Ramanathan and Schreiber 2009).

### **iv. Autofagia**

Cuando la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento es limitado, las células deben ajustar su metabolismo para sobrevivir. Una respuesta celular temprana es la inhibición del crecimiento celular y la inducción de autofagia, para optimizar el uso limitado de energía. La autofagia es el secuestro de componentes intracelulares dentro de vesículas de membrana de doble capa denominadas autofagosomas y que posteriormente se transportan para su degradación en los lisosomas. Algunos estudios han demostrado que la inhibición de mTORC1 induce autofagia, mientras que la activación la reduce (Codogno and Meijer 2005). De manera general, el complejo mTORC1 controla la autofagia mediante la regulación de un complejo de proteínas compuesto por Atg1/ULK1, ATG13 y FIP200 (Ganley, Lam du et al. 2009). En condiciones favorables para la célula, mTORC1 se encuentra reprimiendo la autofagia mediante la fosforilación y posterior represión de ULK1 y ATG13 (Hosokawa, Hara et al. 2009).

Por otra parte, la activación de la autofagia a través de mTOR puede ser indirectamente inducida mediante AMPK. En casos de privación de nutricional y energética, AMPK es capaz de fosforilar tanto a Raptor como al complejo TSC1/2, conllevando la inactivación de mTOR y la posterior inducción de autofagia (Gwinn, Shackelford et al. 2008). Por otra parte, AMPK es capaz de promover autofagia mediante la fosforilación directa de ULK1 en los residuos

de serina 317 y 777, mientras que en suficiencia nutricional, mTOR se fosforilando a ULK1 en el residuo de serina 757, inhibiendo la interacción entre ULK1 y AMPK (Kim, Kundu et al. 2011).

### **g. Complejo mTORC2**

Se conoce relativamente poco sobre la biología del complejo TORC2, en comparación a lo que existe descrito con mTORC1. Esto puede deberse a varias razones, entre las cuales destaca el fenotipo de temprana letalidad cuando se inhiben algunos de los componentes de TORC2 en ratones; además no se conoce ningún inhibidor específico de mTORC2 que permita estudiar sus funciones al detalle. Sin embargo, durante los últimos años, se han demostrado que este complejo es importante en varios procesos biológicos, que incluyen supervivencia celular, metabolismo, proliferación y organización del citoesqueleto (Ver figura 8) (Laplante and Sabatini 2009).

### **i. Supervivencia celular, metabolismo y proliferación**

Estos tres procesos celulares están estrechamente asociados a la activación de la quinasa Akt, que los regula de forma positiva mediante la fosforilación de varias moléculas efectoras (Manning and Cantley 2007). En este sentido, mTORC2 es capaz de fosforilar Akt promoviendo su activación (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Además se sabe que mTORC2 promueve la activación de SGK1, involucrada en el crecimiento celular y transporte de iones (Garcia-Martinez and Alessi 2008).

Por otra parte, se conoce que el complejo mTORC2 controla la reprogramación metabólica en células de glioblastoma, mediante la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos, glutamina y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) principalmente a través de Akt y c-Myc. Estas proteínas promueven la captación de glucosa, la glicolisis, y el efecto Warburg para generar suficiente ATP y macromoléculas necesarias para el crecimiento tumoral (Wu, Bi et al. 2014).

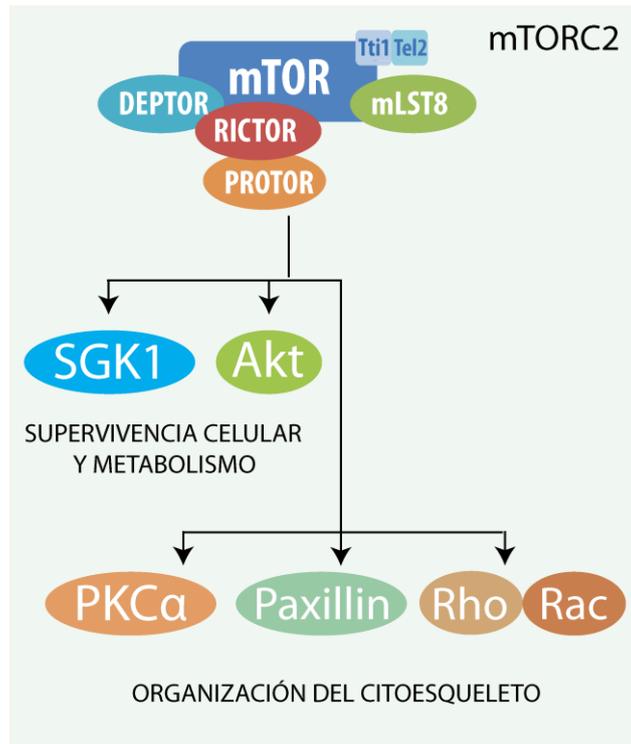


Figura 8. **Funciones descritas de mTORC2**  
Adaptado de Laplante y Sabatini 2012

## ii. Organización del citoesqueleto.

El silenciamiento de los componentes de mTORC2 afecta la polimerización de actina y perturba la morfología celular (Jacinto, Loewith et al. 2004). Esto parece estar asociado a que mTORC2 promueve la fosforilación de la proteína quinasa C (PKC $\alpha$ ), de la proteína adaptadora Paxillin, de la GTPasa RhoA y Rac1, involucradas en la organización del citoesqueleto (Sarbasov, Ali et al. 2004).

## III. mTOR en tripanosomátidos

Como mencionamos anteriormente, *Trypanosoma brucei* posee un ciclo celular que alterna entre su vector artrópodo y su hospedador mamífero. La adaptación es un mecanismo clave en este complejo cambio de hospedador. Este proceso involucra cambios particulares en la expresión de genes con el fin de completar con éxito los cambios metabólicos y morfológicos característicos en cada fase (Queiroz, Benz et al. 2009, Siegel, Hekstra et al. 2010).

La adaptación cobra importancia durante el curso de la infección en mamíferos, donde en el torrente sanguíneo, el parásito debe pasar de formas infectivas proliferantes a otras en estado de quiescencia. Esto ocurre, por una parte para adaptar su metabolismo celular a las condiciones nutricionales que se encontrara en el intestino de la mosca, y por otra parte, para evitar el agotamiento del hospedador mamífero y seguir el curso de la infección.

Las respuestas fisiológicas de las células a estímulos externos e internos se rigen por genes y proteínas que interactúan en redes complejas cuyas propiedades dinámicas son imposibles de entender por el razonamiento intuitivo solo (Tyson, Chen et al. 2003). En este sentido, en tripanosomátidos, los procesos asociados al cambio de hospedador deben ser finamente controlados mediante cascadas de señalización que coordinen procesos como síntesis de proteínas, crecimiento celular, autofagia y diferenciación, la mayoría de estos procesos orquestados mediante las rutas que controla mTOR en la mayoría de los organismos.

#### **a. Señalización mediante TOR en *T. brucei***

La mayoría de los eucariotas coordinan el crecimiento celular a través de una sola quinasa TOR. Sin embargo, algunos microorganismos, como los tripanosomátidos, expresan proteínas TOR adicionales, manteniendo la estructura clásica de los dominios quinasa TOR. Así, el crecimiento celular en tripanosomas es coordinado a través de cuatro quinasas TOR distintas, lo que constituye el complejo TOR más amplio descrito en eucariotas (Barquilla, Crespo et al. 2008). A nivel de homología, los datos existentes sugieren que TbTOR1 y TbTOR2 son ortólogos de las quinasas mTOR en otros eucariotas, mientras que las otras dos quinasa TbTOR son duplicaciones génicas generadas en tripanosomátidos (Ver figura 9) (Barquilla, Saldivia et al. 2012).

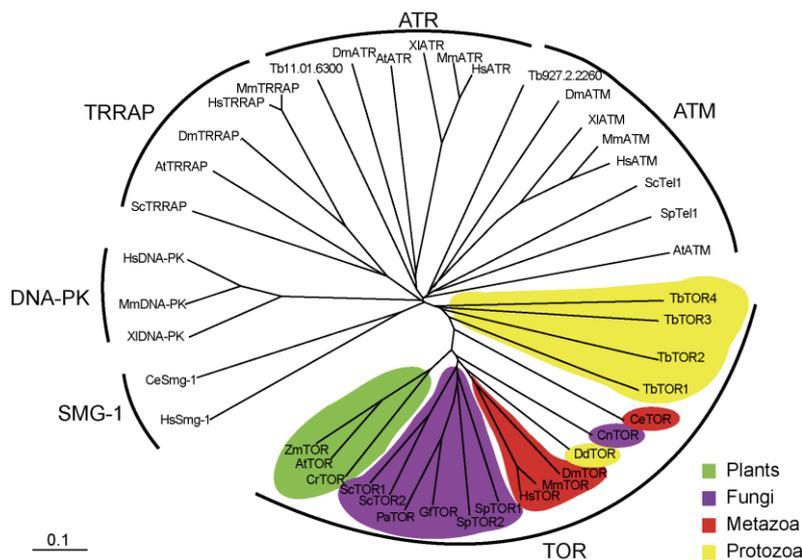


Figura 9. Representación gráfica del grado de homología existente entre las PIKK presentes en *T. brucei* con proteínas homologas de eucariotas. (Fuente: (Barquilla, Saldivia et al. 2012)

A nivel estructural, tanto **TbTOR1** y **TbTOR2** presentan la estructura clásica descrita en otras quinasas mTOR, mientras que **TbTOR3** (anteriormente llamado TOR-like1) presenta un dominio extra PDZ. Por otra parte, **TbTOR4** mantiene la estructura clásica de las quinasas mTOR pero carece del dominio conservado FRB (Ver figura 10). Además, cada uno de estos parálogos de TOR se une a un set distinto de proteínas, para formar hasta cuatro complejos TOR distintos. Todo ello sugiere que estos nuevas quinasas podrían tener roles adicionales a aquellas reguladas por TORC1 o TORC2 en otros organismos, lo cual tiene sentido considerando el complejo vida de los parásitos protozoarios (Barquilla, Crespo et al. 2008, Barquilla and Navarro 2009) .

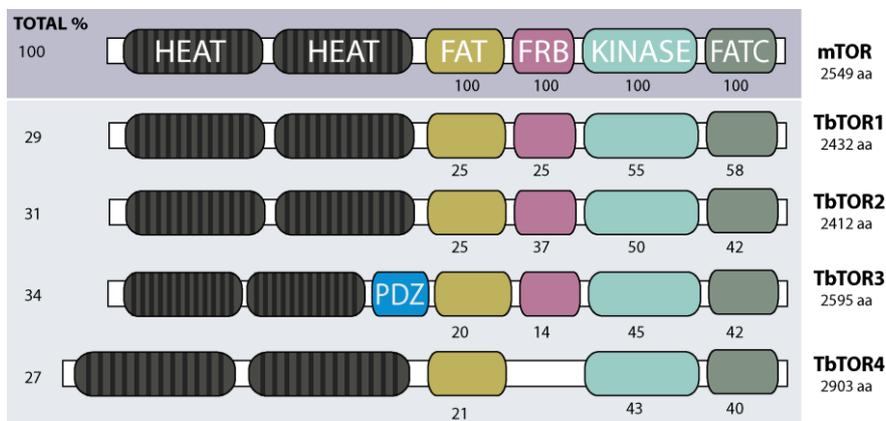


Figura 10. Representación esquemática de los dominios encontrados en las quinasas TbTOR (adaptado de (Barquilla, Crespo et al. 2008)

Las dos primeras quinasas TOR descritas en tripanosomas, fueron TbTOR1 y TbTOR2, las cuales controlan aspectos distintos del crecimiento celular, mediante la señalización de sus respectivos complejos (Ver figura 11).

A nivel celular, **TbTOR1** se encuentra localizada en el núcleo y regula aspectos temporales del crecimiento celular. Esto lo hace mediante la formación del complejo TORC1, junto con el homólogo de Raptor y LST8 en *T. brucei* (TbRaptor y TbLST8) respectivamente. La ausencia de TbTOR1 regula distintos aspectos de la biología en el parásito. Por una parte, afecta la localización nucleolar de la ARN-polimerasa I, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Además la ausencia de actividad del complejo TORC1 conlleva cambios en el tamaño celular, parada en el ciclo celular en fase G1 y la aparición de vesículas asociadas a procesos de autofagia (Barquilla and Navarro 2009), tal y como ocurre en otros eucariotas (Jung, Ro et al. 2010).

La polarización del crecimiento celular es un proceso con una regulación muy precisa, ya que resulta esencial para la viabilidad celular en un gran número de organismos. En *T. brucei*, la quinasa **TbTOR2** tiene un papel importante en la polarización del citoesqueleto de actina, proceso requerido para el funcionamiento adecuado de otros procesos como la endocitosis, división celular y la citocinesis en el parásito.

A nivel celular, TbTOR2 se encuentra asociado al retículo endoplásmico y a membranas mitocondriales, donde probablemente forma un complejo TORC2, mediante la unión con otras proteínas, como TbAVO3 y LST8 (Barquilla and Navarro 2009).

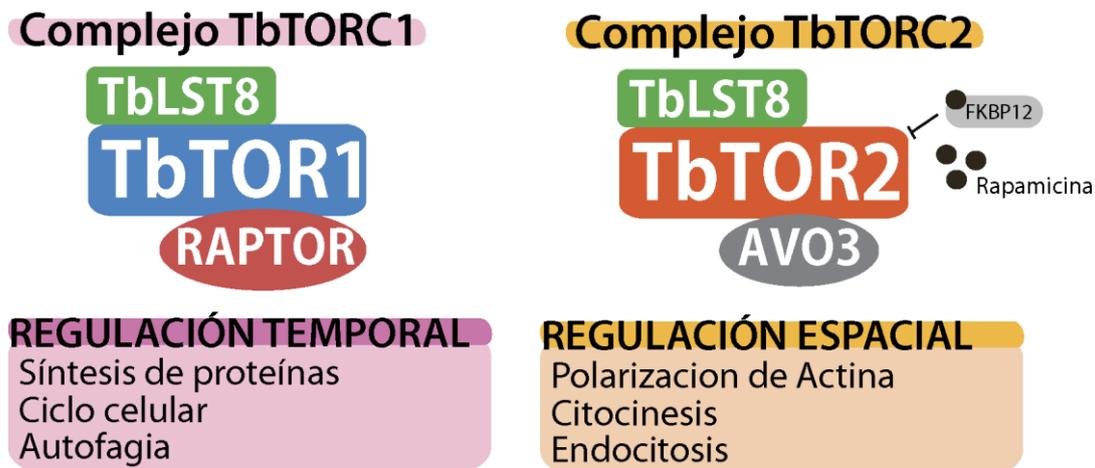


Figura 11. **Comparación funcional y estructural entre los complejos TbTORC1 y TbTORC2.** Basado en datos de Barquilla y Navarro 2009

A pesar de que la función de los complejos TORC1 Y TORC2 parecen estar conservadas en *T. brucei*, la rapamicina afecta potencialmente la proliferación celular mediante la inhibición exclusiva de TORC2, contrario a lo que ocurre en levaduras y mamíferos. Esto es debido a que el dominio de unión a rapamicina (FRB) de TbTOR1 carece de los residuos necesarios para la unión del fármaco a la quinasa, que han sido descritos en levaduras y humanos: esto explica por qué la rapamicina no afecta la actividad de TbTOR1 (Saldivia, Barquilla et al. 2013). Además, la disrupción del complejo TORC2 en *T. brucei* luego de un tratamiento prolongado sin afectar la actividad de TbTOR1, lo que descarta que la inactivación de TORC2 ocurra como consecuencia de la inhibición a largo plazo de TORC1, como se ha observado en otros organismos (Hong, Park et al. 2013).

Durante años se ha sugerido que los eucariotas ancestrales poseían un sola quinasa mTOR, y que la evolución hizo presión selectiva hacia la ganancia o pérdida de miembros de la familia mTOR a través del reino eucariota. Al igual que ocurre con tripanosomátidos, en levaduras también existe duplicación de las quinasas TOR (Shertz, Bastidas et al. 2010), lo contrario ocurre en otros organismos como *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum* y *Theileria*

*parva* cuyo genoma no presenta ninguno de los componentes de las rutas de señalización mTOR (van Dam, Zwartkruis et al. 2011).

Las funciones clásicas de mTOR parecen conservadas en *T. brucei*; sin embargo, los genes codificantes para las proteínas reguladoras de mTOR en otros eucariotas, parecen estar perdidas en el genoma de estos tripanosomátidos. Este es el caso del receptor del factor de la insulina y el complejo TSC/Rheb (Bateman and McNeill 2004, Duran and Hall 2012). De manera similar, la proteína quinasa S6 ribosomal (S6K), un efector de TORC1 ampliamente estudiado en mamíferos (Fenton and Gout 2011), no ha logrado ser identificada mediante homología de secuencia en *T. brucei*, y las quinasas pertenecientes a la familia AGC están pobremente representadas en tripanosomátidos en comparación con el genoma humano (Parsons, Worthey et al. 2005).

Sorprendentemente, los tripanosomátidos son los únicos eucariotas cuyos genomas codifican dos parálogos adicionales de las quinasas mTOR, denominados TbTOR3 y TbTOR4 (Barquilla, Crespo et al. 2008). Ambas quinasas conservan la estructura clásica de las quinasas PIKK y presentan características únicas no descritas anteriormente para las quinasas mTOR.

La quinasa **TbTOR3** se encuentra localizada en gránulos citoplasmáticos dispersos a través del citosol, que se relocalizan en la periferia celular durante condiciones de estrés hiperosmótico. Esta proteína posee un dominio de interacción proteína-proteína PDZ, y esta quinasa está directamente implicada en la respuesta osmótica a través del control de los niveles de polifosfatos y el tamaño de los acidocalcisomas (de Jesus, Tonelli et al. 2010). Los acidocalcisomas son orgánulos ácidos que almacenan calcio, entre sus funciones se encuentran el depósito de cationes y fosforo, el metabolismo del polifosfatos, la homeostasis del calcio, mantenimiento del pH intracelular y la regulación osmótica (Vonlaufen, Kanzok et al. 2008).

La inhibición de TbTOR3 causa una inhibición progresiva de la proliferación celular, lo que lleva a la producción de parásitos alargados que se encuentran

detenidos en la fase S/G<sub>2</sub> del ciclo celular. Además de *T. brucei*, esta quinasa también se encuentra en *Leishmania*, donde su ablación conlleva defectos en la regulación osmótica, y además son incapaces de replicarse en infecciones *in vitro* en macrófagos, o de establecer una infección en modelos *in vivo* (Madeira da Silva and Beverley 2010). A pesar de que TbTOR3 posee similitud de dominios con respecto a las otras mTOR descritas en tripanosomátidos, no forma un complejo junto las proteínas clásicas de unión a otros mTOR, como TbLST8, TbRaptor o TbAVO3 (Barquilla, Crespo et al. 2008), lo que sugiere que TbTOR3 es una inusual quinasa TOR que no se ensambla en complejos convencionales TORC.

Finalmente, la quinasa **TbTOR4** es una proteína que se encuentra distribuida en el citoplasma celular y que mantiene la estructura característica de las quinasas mTOR, pero no presenta el dominio de unión a la rapamicina. Esto es debido a que, al igual como ocurre con TbTOR1 Y TbTOR3, el dominio FRB está pobremente conservado y no puede unirse al complejo TbFKBP12-Rapamicina. Al principio de esta tesis, se conocía poco acerca esta quinasa en *T. brucei*, cuya funcionalidad es en parte objeto de esta tesis doctoral y será explicada en detalle en capítulos posteriores.

El desarrollo y mantenimiento de los organismos depende de una correcta coordinación entre la proliferación celular y la diferenciación. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la reducción parcial de la expresión de TbTOR4, afecta el crecimiento de los parásitos, induciendo una parada irreversible del ciclo celular en fase G1. En otros eucariotas, la inhibición de mTORC1 afecta el crecimiento celular, afectando tanto la progresión del ciclo celular como al tamaño celular (Soulard, Cohen et al. 2009).

La relación entre la progresión del ciclo celular y el desarrollo es compleja y se caracteriza por dependencia mutua. En *T. brucei*, la reducción de TbTOR4 no afecta de forma significativa el tamaño celular, en contraste con la inhibición de TbTOR1 (Ver figura 12), lo que sugiere que TbTORC4 regula la proliferación celular en lugar de crecimiento celular. La dinámica de los cambios descritos en

el ciclo celular tras la inhibición de TbTOR4, es similar a la observada en la transición hacia formas quiescentes, donde, como mecanismo preadaptativo tiene lugar una parada irreversible del ciclo celular en fase G1 (Shapiro, Naessens et al. 1984). Este resultado sugiere que TbTOR4 podría estar regulando la respuesta adaptativa durante la diferenciación hacia formas quiescentes de *T. brucei*.

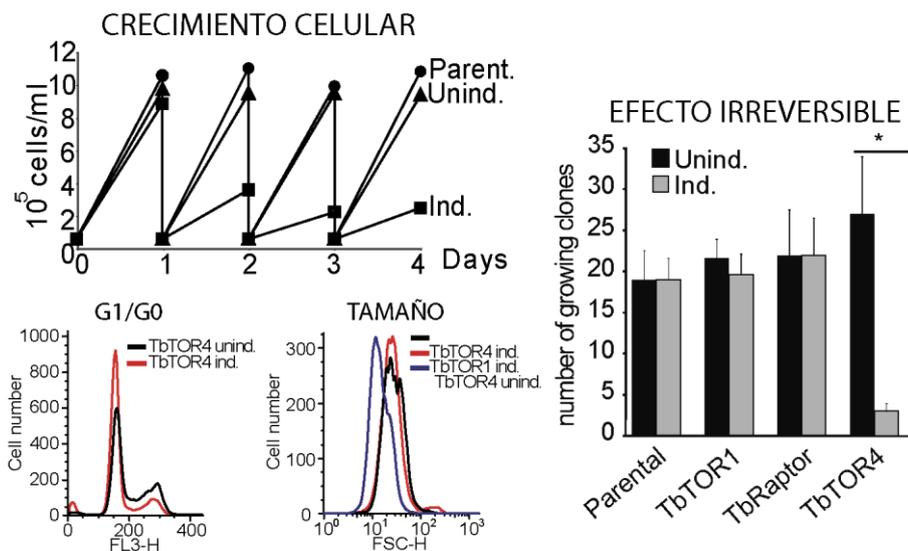


Figura 12. **Efectos del silenciamiento de TbTOR4 sobre el crecimiento de *T. brucei*** Modificado de Barquilla y Saldivia 2012

Uno de los eventos biológicos más importantes durante la adaptación de *T. brucei* al entorno nutricional es la reactivación mitocondrial (Priest and Hajduk 1994). Esta activación permite el uso de prolina como fuente de ATP, necesario para la supervivencia de la forma *stumpy* en el intestino medio de la mosca tsé-tsé (Vassella, Reuner et al. 1997). En este sentido, la inhibición de TbTOR4 en cepas proliferativas monomórficas genera un incremento de la actividad NADPH, restaurando la capacidad oxidativa mitocondrial del parásito (Ver Figura 13).

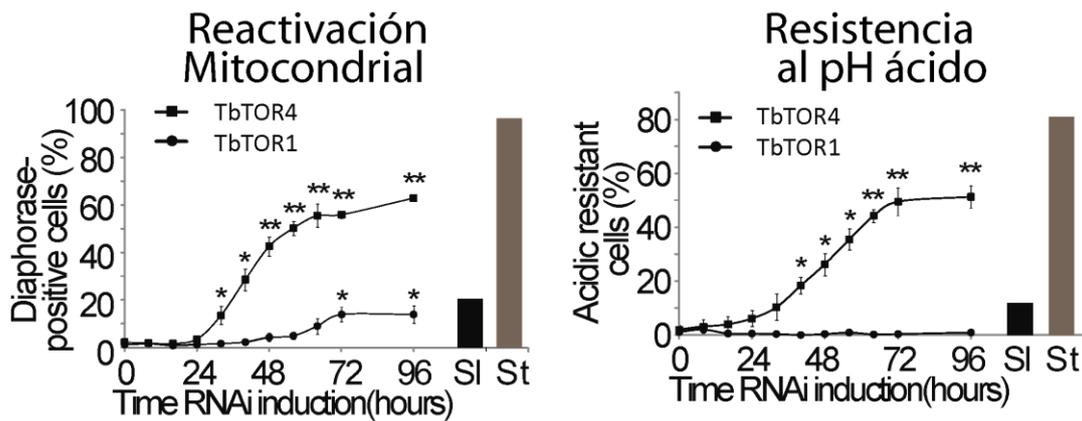


Figura 13. **El silenciamiento de TbTOR4 restaura capacidad oxidativa mitocondrial de *T.brucei* e incrementa su capacidad de resistencia a las fluctuaciones de pH** Modificado de Barquilla y Saldivia 2012

Cabe destacar que la transición *slender-stumpy* incluye además la capacidad del parásito de lidiar con el cambio repentino del entorno extracelular. En particular cuando estos parásitos se encuentran en el intestino de la mosca tse-tse, donde deben resistir a la actividad proteolítica y pH ácido típico de este entorno celular (Nolan, Rolin et al. 2000). De esta forma, la inhibición de TbTOR4 en cepas sanguíneas conlleva un incremento en la resistencia a las fluctuaciones de pH extracelular (Ver figura 13). Este resultado, junto con la activación mitocondrial, pone en evidencia la participación de TbTOR4 durante el desarrollo y diferenciación de *T. brucei*.

El estudio de esta quinasa en *T. brucei*, puede ayudar en el descubrimiento de nuevas funciones de las quinasas TOR. Particularmente, aquellas relacionadas a las respuestas adaptativas que median la proliferación y el desarrollo de estos parásitos, las cuales podrían ser extrapoladas y aportar información sobre los mecanismos de crecimiento celular incontrolado típico de células tumorales.

#### IV. AMPK

AMPK es un complejo proteico heterotrimérico con actividad quinasa de serina y treonina. Básicamente se encuentra compuesto por la conjugación de tres subunidades proteicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que juntas forman una enzima funcional (Ver

figura 14). La subunidad  $\alpha$  posee actividad catalítica, mientras que las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  se encargan de regular la actividad del complejo (Hardie 2007). Los genes que codifican cada subunidad se encuentran funcionalmente conservados en todos los eucariotas y cada subunidad se encuentra codificada por dos o tres genes distintos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ;  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ) dando lugar a múltiples combinaciones que junto a las variantes en el procesamiento (mediante *splicing*) y el uso de promotores alternativos, conducen a un amplio abanico de complejos AMPK distintos (Carling 2004).

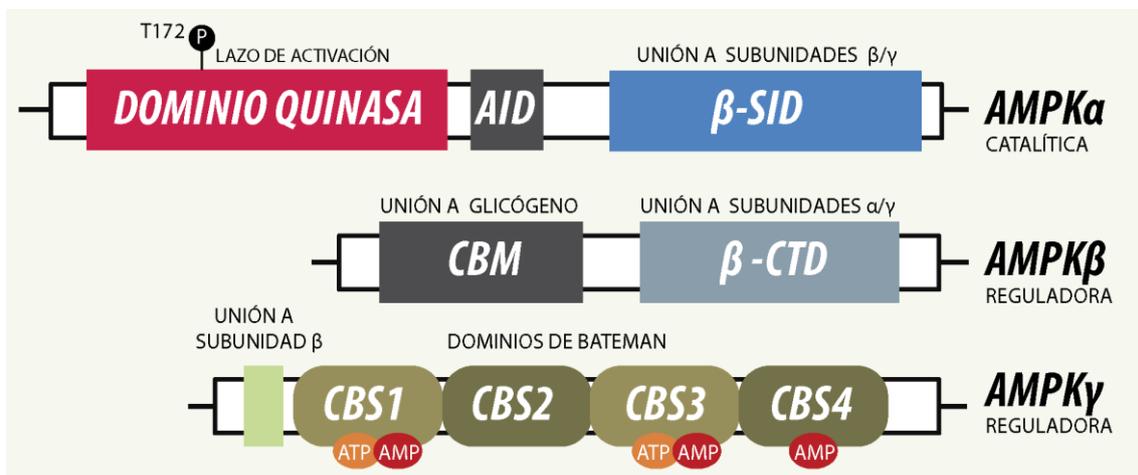


Figura 14. **Estructura general del complejo AMPK**  
Modificado de Hardie 2012

Estas tres subunidades son necesarias para que este complejo sea estable y funcional. La composición predominante del complejo es dependiente de tejido donde se exprese, a pesar de esta plasticidad, el trímero  $\alpha_1\beta_1\gamma_1$  es el más extendido en la mayoría de tipos celulares (Hardie and Sakamoto 2006).

### a. Estructura general de los complejos AMPK en mamíferos

#### i. Subunidad catalítica $\alpha$ (AMPK $\alpha$ )

En mamíferos, AMPK $\alpha_1$  y AMPK $\alpha_2$  presentan un peso molecular aproximado de 63 kDa, y además poseen un 84% similitud de secuencia. AMPK $\alpha_1$  tiene 548 aminoácidos (aa) y AMPK $\alpha_2$  552 aa y están codificadas por los genes *PRKAA1* y *PRKAA2* respectivamente.

A nivel estructural, esta subunidad posee en su extremo amino un dominio catalítico serina/treonina convencional donde se localiza el residuo de treonina-172 (T172) dentro del llamado “lazo de activación”, ampliamente conservado entre especies y que representa el principal marcador biológico de la quinasa, debido a que la actividad de la AMPK está regulada por la fosforilación de este residuo (Ver Figura 14).

La región carboxilo terminal, aunque evolutivamente menos conservada, es esencial para la regulación de la quinasa. Por una parte, contiene un dominio de auto-inhibición (AID por sus siglas en inglés “*Auto-Inhibitory Domain*”), cuyo mecanismo de acción ha sido recientemente descrito (Pang, Xiong et al. 2007, Chen, Jiao et al. 2009). El resto de este extremo se caracteriza por contener el sitio de unión a las subunidades reguladoras  $\beta/\gamma$ , siendo este el principal mecanismo mediante el cual AMPK es capaz de regular su actividad en casos de desequilibrio energético (Chen, Xin et al. 2013). Debido a esto, la expresión de una versión truncada de AMPK $\alpha$  que carezca de este sitio de unión a las subunidades reguladoras, es capaz de mantener una actividad constitutiva tras ser fosforilada en T172, o cuando esta treonina es reemplazada por ácido aspártico (T172D) (Sanz 2008).

En mamíferos, la localización celular de las subunidades AMPK $\alpha$  parece estar asociada a la isoforma que se exprese. En general, los complejos AMPK que presentan la isoforma  $\alpha 1$  se expresan ubicuamente en el organismo, en fracciones citoplasmáticas. Sin embargo, los complejos que contienen la subunidad  $\alpha 2$  son predominantes en músculo esquelético, corazón e hígado, manteniendo una localización tanto citoplasmática como nuclear. (Salt, Celler et al. 1998, Woods, Azzout-Marniche et al. 2000, Witczak, Sharoff et al. 2008). Además, la localización de estas isoformas puede variar dependiendo de la situación metabólica a la que se enfrente la célula. Por ejemplo, en células de músculo esquelético, la subunidad  $\alpha 2$  es capaz de moverse del citoplasma al núcleo tras el ejercicio, mientras que la carencia de glucosa es capaz de traslocar ambas isoformas al núcleo en células tumorales (Witczak, Sharoff et al. 2008). Estas características particulares en cuanto a la localización y

especificidad de sustrato, sugiere que ambas isoformas pueden desarrollar funciones independientes (Schimmack, Defronzo et al. 2006).

## ii. Subunidad $\beta$ (AMPK $\beta$ ): el sitio de anclaje del complejo

Se han descrito dos isoformas de AMPK $\beta$ , AMPK $\beta$ 1 y AMPK $\beta$ 2. En humanos, AMPK $\beta$ 1 es una proteína de 270 aa (38 kDa) que se encuentra codificada por el gen *PRKAB1*, mientras que AMPK $\beta$ 2 presenta 272 aa (34 kDa) codificada por el gen *PRKAB2*. Ambas proteínas presentan un 71% de homología de secuencia y difieren solamente en el extremo amino terminal (Thornton, Snowden et al. 1998).

Estructuralmente, la comparación entre especies de estas isoformas revela que poseen un dominio de unión a glucógeno (GBD, por *Glycogen-binding domain*) y un dominio  $\beta$ -CTD, que ocupa la región carboxilo terminal, y que le sirve de anclaje a AMPK $\alpha$  y AMPK $\gamma$ . Estos dos dominios también se encuentran conservados en los 3 ortólogos existentes en *Saccharomyces cerevisiae* (Sanz 2008).

Tanto AMPK $\beta$ 1 como AMPK $\beta$ 2 se distribuyen por el núcleo y citoplasma. Sin embargo, modificaciones post-traduccionales en diversos residuos tienen consecuencias a nivel funcional y de localización. De esta manera, la adición de un ácido mirístico al residuo de glicina 2 en ambas isoformas, permiten su localización a nivel de membranas, y su eliminación hace que se distribuya más homogéneamente y por consecuencia existe un incremento en la actividad de la AMPK (Witczak, Sharoff et al. 2008). Por otra parte, la fosforilación de AMPK $\beta$ 1 en serina 24 y 182 evita su localización nuclear. Se ha observado igualmente que tras situaciones estresantes ambas isoformas pueden traslocarse al núcleo (Sanz 2008).

Estas evidencias indican que la subunidad AMPK $\beta$  es capaz de regular el estado de fosforilación del complejo AMPK, por lo que estas subunidades pueden ser vistas como nuevas dianas terapéuticas en el desarrollo de drogas que activan los complejos AMPK que contengan isoformas específicas de AMPK $\beta$  (Sanz, Rubio et al. 2013).

### iii. Subunidad $\gamma$ (AMPK $\gamma$ )

En humanos, la subunidad reguladora AMPK $\gamma$  presenta múltiples isoformas codificadas por los genes *PRKAG1*, *PRKAG2* y *PRKAG3*, que generan las subunidades AMPK $\gamma$ 1 331 aa (37 kDa), AMPK $\gamma$ 2 564 aa (63kDa) y AMPK $\gamma$ 3 492 aa (55 kDa) respectivamente.

A nivel estructural, a pesar de que la región amino terminal no se encuentra conservada entre las isoformas, la región carboxilo terminal presenta cuatro repeticiones en tándem de un dominio CBS (*Cystathionine  $\beta$ -Synthase*), muy conservadas desde su ortólogo en *Saccharomyces cerevisiae* denominado SNF4, que tiene 322 aa (36kDa) (Bateman 1997, Sanz 2008). Estas repeticiones CBS se encuentran agrupadas por parejas: CBS1-CBS2 y CBS3-CBS4, generando los denominados dominios de Bateman, capaces de unir tanto nucleótidos de adenina como AMP y ATP (Bateman 1997). Los 25 aa anteriores al primer dominio CBS están implicados en la interacción con AMPK $\beta$  y en la formación de un complejo AMPK activo y estable.

Se han descrito hasta diez mutaciones puntuales distintas en el gen que codifica para la isoforma  $\gamma$ 2, localizadas tanto en el dominio Bateman amino terminal como en el dominio carboxilo terminal, causan en humanos una enfermedad cardiaca hereditaria denominada “Síndrome Wolff-Parkinson-White”, la cual normalmente está asociada con cardiomiopatía hipertrófica (Scott, Hawley et al. 2004).

Mediante estudios cristalográficos se ha demostrado que estas repeticiones poseen una hendidura central donde los nucleótidos de adenina pueden unirse al residuo de ácido aspártico que es responsable en la unión del ligando (Oakhill, Scott et al. 2012). En los mamíferos, la subunidad AMPK $\gamma$ 1 se organiza de la siguiente manera: el sitio CBS2 parece estar vacío, CBS4 es un sitio de unión hermética a AMP, mientras que los sitios CBS1 y 3 representan los sitios reguladores donde se pueden unir AMP y ATP de forma competitiva. La unión de AMP a CBS1 parece ser el responsable de la activación alostérica de AMPK, mientras que la unión al sitio 3 parece modular los estados de fosforilación de la T172 (Xiao, Sanders et al. 2011) .La afinidad de unión de

AMP de las diferentes isoformas varía siendo la afinidad por AMP de AMPK $\gamma$ 1 mayor que la de AMPK $\gamma$ 2 y AMPK $\gamma$ 3 (Sanz 2008).

Con respecto a su localización dentro de la célula, si bien las diversas isoformas de AMPK $\gamma$  se distribuyen tanto en el núcleo como en el citoplasma, la isoforma AMPK $\gamma$ 1 parece presentar una localización nuclear más acentuada que las otras dos isoformas.

Durante muchos años se ha intentado identificar las señales que activan los ortólogos de AMPK en levaduras y plantas, los cuales no pueden ser activados de forma alostérica por AMP (Wilson, Hawley et al. 1996). De manera similar a los mamíferos, la subunidad  $\gamma$  en levaduras y plantas contiene cuatro repeticiones CBS a las cuales se pueden unir los nucleótidos de adenina. Esto sugiere que si bien los nucleótidos pueden ser los señales que desencadenan la activación de AMPK en estos organismos, estos solo operan afectando el estado de fosforilación de la quinasa y no mediante los mecanismos alostéricos de activación (Hardie, Ross et al. 2012).

## **b. Regulación de los complejos AMPK**

### **i. Regulación mediante fosforilación.**

La fosforilación del residuo conservado de treonina presente en el dominio catalítico es esencial para la actividad del complejo AMPK tanto en plantas (SnRK $\alpha$ 1<sup>T175</sup>, SnRK $\alpha$ 2<sup>T176</sup>), levaduras (SNF1<sup>T210</sup>) y mamíferos (AMPK $\alpha$ <sup>T172</sup>). (McCartney and Schmidt 2001, Baena-Gonzalez, Rolland et al. 2007, Crozet, Jammes et al. 2010).

La fosforilación de este residuo de treonina y consecuente activación del complejo surge en respuesta a diversos estímulos metabólicos celulares (Ver figura 15). Así, en levaduras la privación de glucosa conlleva el paso de un estado inactivo/desfosforilado de SNF1<sup>T210</sup> a otro fosforilado, con la consecuente activación del complejo (McCartney and Schmidt 2001). En mamíferos, el complejo AMPK se activa frente a estrés metabólico que comprometa la producción de ATP o que incremente el consumo de ATP, siendo la fosforilación en T172 el principal marcador de activación de esta

actividad (Stein, Woods et al. 2000). Sin embargo, en plantas no se han observado diferencias en los niveles de fosforilación de este residuo durante situaciones estresantes. Esto puede sugerir la presencia de otros residuos adicionales susceptibles a ser fosforilados u otros mecanismos que controlen la actividad del complejo SnRK durante condiciones de estrés (Rodrigues, Adamo et al. 2013). Sin embargo, mediante estudios de fraccionamiento celular, se ha demostrado que el estrés promueve la fosforilación de SnRK sólo cuando está ensamblada dentro del complejo junto a las otras subunidades reguladoras (Nunes, Primavesi et al. 2013).

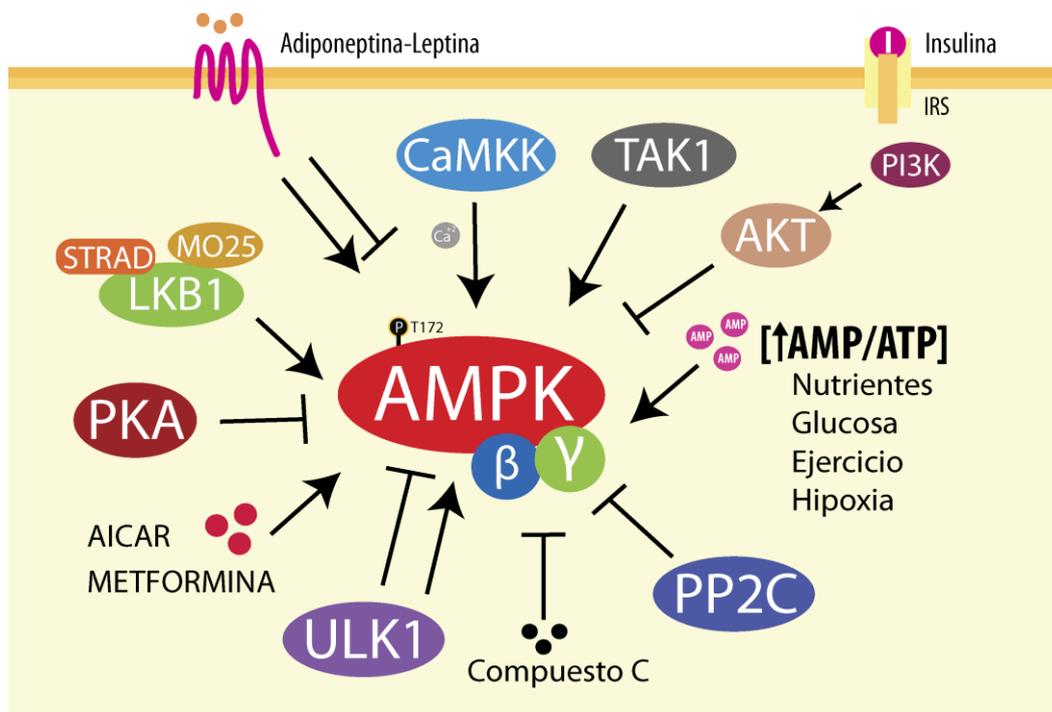


Figura 15. Principales mecanismos de regulación de la actividad de AMPK en mamíferos Modificado de Maria M. Mihaylova 2011

Adicionalmente a la fosforilación en T172, se han descrito otros sitios susceptibles a ser fosforilados tanto en las subunidades AMPK $\alpha$  como en AMPK $\beta$ , aunque en la mayoría de los casos se desconoce la relevancia funcional de esta fosforilación. Por ejemplo, la fosforilación en AMPK $\alpha$  en el residuo de serina 485 (S485) reprime la fosforilación en T172, y en consecuencia la actividad de AMPK en respuesta a la activación de las quinasas Akt/PKB mediante tratamiento con insulina, como respuesta a la señalización mediada por el mensajero secundario cAMP (Horman, Vertommen

et al. 2006). Además, PKA es capaz de inhibir la actividad de AMPK mediante la fosforilación del residuo de serina 173 (S173), para promover generación de energía mediante la lipólisis (Djouder, Tuerk et al. 2010).

Las tres subunidades AMPK pueden ser inhibidas mediante la fosforilación mediada por la serina/treonina quinasa Atg1/ULK1, un regulador esencial de la autofagia. Considerando que AMPK controla los procesos de autofagia mediante la activación de esta quinasa, esta inhibición de AMPK mediante Atg1/ULK1 ocurre como un mecanismo de regulación en retroalimentación negativa para resetear AMPK tras la activación de la autofagia (Loffler, Alers et al. 2011) .

## **ii. Activación de AMPK mediante 5'AMP**

AMPK actúa como detector del estado energético celular, debido a que se activa en respuesta a un desequilibrio en la relación AMP/ATP intracelular generado tras el consumo de ATP por algún tipo de estrés o privación nutricional. La activación del complejo se encuentra mediada mayoritariamente por la unión de AMP a los dominios CBS de la subunidad AMPK $\gamma$ .

De manera fisiológica, la relación AMP/ATP celular es mínima e incrementa cuando el consumo de ATP supera a su síntesis. Cuando esto ocurre, la relación ADP/ATP aumenta y la reacción catalizada por la adenilato quinasa ( $2ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$ ) se desplaza a la derecha, incrementando drásticamente la cantidad de AMP en el interior celular (Hardie and Hawley 2001).

Hasta la fecha, la regulación de AMPK mediante nucleótidos de adenina se ha estudiado ampliamente en diversos organismos. De manera general, la activación de AMPK mediante 5'-AMP ocurre de dos formas distintas. Por un lado, la unión de AMP desencadena un mecanismo alostérico de activación que conlleva un cambio conformacional del complejo, haciendo que AMPK sea un mejor sustrato para la quinasa que la fosforila. La magnitud de este efecto puede variar entre las isoformas de AMPK, pero suele ser de cinco veces o inferior. Por otra parte, la unión de AMP hace que AMPK se convierta en peor sustrato para ser desfosforilado/inactivado por sus fosfatasas específicas,

manteniendo así su actividad (Hardie and Sakamoto 2006, Sanz 2008, Witczak, Sharoff et al. 2008).

### iii. Regulación de AMPK mediante quinasas

La fosforilación de AMPK mediante quinasas se describió inicialmente en levaduras. Así, las quinasas que se encargan de fosforilar a SNF1 son Elm1, Sak1 y Tos3. En mamíferos, la fosforilación en T172 y la consecuente activación de AMPK se encuentra mediada por quinasas como LKB1, CaMKK $\alpha$ , CaMKK $\beta$  y TAK1 (Crozet, Margalha et al. 2014) (ver figura 15).

- **LKB1** (*Liver kinase B1*)

Es una serina-treonina quinasa de 48 kDa que presenta homología de secuencia y estructura con las tres quinasas de *Saccharomyces* capaces de fosforilar SNF1. En mamíferos, se expresa mayoritariamente en músculo esquelético e hígado y existe como un complejo junto a dos subunidades accesorias, STRAD (STE20-related adaptor protein) y MO25 (mouse protein 25). La estabilidad de LKB1 depende la unión a estas subunidades y solo así es capaz de activar a AMPK por fosforilación del residuo T172 de la subunidad AMPK $\alpha$ . A nivel estructural, STRAD es una pseudo-quinasa mientras que MO25 se encarga de estabilizar la interacción de LKB1 y STRAD. Además de activar LKB1, la unión de MO25 y STRAD parece localizar a LKB1 en el citoplasma (Kahn, Alquier et al. 2005).

Inicialmente LKB1 estaba considerado como un supresor tumoral, sugiriendo entonces que existía alguna relación entre AMPK y cáncer. Mutaciones en el gen que codifica para LKB1 se asocian con el desarrollo de una rara enfermedad genética humana denominada “síndrome de Peutz-Jeghers” (Jenne, Reimann et al. 1998). Además, se ha determinado que LKB1 está implicado en numerosos procesos celulares que incluyen metabolismo celular, progresión del ciclo celular, polaridad celular y embriogénesis, la mayoría debido a su capacidad de fosforilar AMPK y quinasas relacionadas a la misma (Alessi, Sakamoto et al. 2006).

A pesar de que LKB1 media la activación de AMPK en respuesta a tratamientos que bien elevan los niveles de AMP o le mimetizan, la actividad LKB1 es insensible a las variaciones de AMP, dado a que se parece estar constitutivamente activo. Por esto, la activación de AMPK ocurre una vez que el AMP se une a AMPK $\gamma$  en los dominios CBS, convirtiendo el complejo en un mejor sustrato para ser fosforilado por LKB1 (Kahn, Alquier et al. 2005).

- **CaMKK** ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent Protein kinase kinase)

Esta quinasa es capaz de activar a AMPK a consecuencia de un incremento en la concentración de calcio intracelular ( $Ca^{+2}$ ). Presenta dos isoformas con un 70% de homología de secuencia aminoacídica, CaMKK $\alpha$  y CaMKK $\beta$ . Aunque se ha observado la expresión en tejido muscular de CaMKK $\alpha$  (Witczak, Sharoff et al. 2008), las CaMKK se expresan mayormente en tejido neuronal, y como su nombre indica, responden a incrementos en la concentración de calcio tras la despolarización de la membrana responsable del impulso nervioso, sin que la relación AMP/ATP se vea afectada (Sanz 2008).

Sorprendentemente, no es el incremento en AMP lo que estimula la fosforilación de la T172 por las CaMKKs, sino un aumento en  $Ca^{+2}$  intracelular (Hardie and Sakamoto 2006). Tanto en células  $\beta$  pancreáticas como en tejidos neuronales ambas isoformas participan de la misma manera en la fosforilación y activación de AMPK (Hawley, Pan et al. 2005). Además, las CaMKK pueden activar *in vitro* a AMPK en células que carecen LKB1 en humanos y a su ortólogo en levaduras (Hurley, Anderson et al. 2005). Por otra parte, la inhibición farmacológica de CaMMK suprime casi en su totalidad la actividad de los complejos AMPK en fibroblastos procedentes de ratones LKB1<sup>-/-</sup> (Woods, Dickerson et al. 2005).

- **TAK1** (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*)

Su capacidad de activar AMPK se descubrió en estudios de complementación en levaduras que carecían de Elm1, Sak1 y Tos3, sugiriendo entonces que podría actuar como una quinasa reguladora de AMPK (Momcilovic, Hong et al. 2006). Es miembro de la familia MAPKKKK que se activa mediante

autofosforilación tras la unión con sus proteínas reguladoras TAB1 y TAB2 (*TAK1-binding proteins*) siendo capaz de activar AMPK tras la fosforilación del residuo T172 (Kanayama, Seth et al. 2004).

En mamíferos se expresa en diversos tejidos y puede ser activada por citoquinas y por agentes bioquímicos que aumenten la concentración de AMP intracelular. De esta manera, se ha observado que en células de músculo cardiaco que carecen de TAK1 el tratamiento con metformina no tiene efecto sobre la fosforilación de AMPK (Witczak, Sharoff et al. 2008). Por otra parte, tanto el tratamiento con citoquinas como la sobreexpresión de TAK1 puede inducir la activación de AMPK en mamíferos (Momcilovic, Hong et al. 2006). Aunque se conoce poco sobre los mecanismos que conllevan la fosforilación de AMPK mediante TAK1, se ha sugerido que TAK1 activa AMPK en condiciones donde se genere un desbalance oxidativo con acumulación de especies reactivas del oxígeno (Xie, Zhang et al. 2006, Chen, Shen et al. 2013).

#### **iv. Regulación de AMPK mediante fosfatasas**

Durante los últimos años, diversos estudios señalan que la desfosforilación es un proceso esencial en la regulación de los complejos AMPK en humanos, levaduras y plantas. La actividad de AMPK es dependiente de la fosforilación del residuo T172, por lo tanto su desfosforilación produce la inactivación del complejo. En levaduras, la inactivación del complejo ocurre tras la desfosforilación de SNF1<sup>210</sup> por la fosfatasa Glc7, que actúa sobre SNF1 una vez que se une a su subunidad reguladora Reg1 (Hedbacker and Carlson 2008, Rubenstein, McCartney et al. 2008). Por otra parte, la ausencia de Reg1 hace que el complejo SNF1 se encuentre constitutivamente activo (Sanz 2008).

En mamíferos, Glc7 es el ortólogo de fosfatasa de proteínas de tipo 1 (PP1). En este sentido, se ha descrito que AMPK puede ser desfosforilada en reacciones *in vitro* por PP1, PP2A, y la Proteína fosfatasas 2C (PP2C) (Davies, Helps et al. 1995), siendo PP1 y PP2C más eficientes desfosforilando AMPK que PP2A (Garcia-Haro, Garcia-Gimeno et al. 2010). De igual forma, tanto PP2C y PP1

son capaces de desfosforilar AMPK en ensayos *in vivo*, sugiriendo que este tipo de regulación podría depender del tejido y de las condiciones de la estimulación celular (Steinberg and Kemp 2009, Carling, Thornton et al. 2012).

La unión de AMP a la subunidad AMPK $\gamma$  dificulta el acceso de las fosfatasas al sitio T172 de AMPK $\alpha$ . En experimentos *in vitro* se ha visto que las fosfatasas PP1, PP2A, y PP2C son capaces de desfosforilar a T172. No obstante, esto no ha sido demostrado de manera directa *in vivo* (Sanders, Grondin et al. 2007, Sanz 2008).

### **c. Eventos fisiológicos moduladores del estado de activación de AMPK**

En mamíferos, la actividad de AMPK se regula en respuesta a las necesidades energéticas y nutricionales de la célula. Así, diversos estímulos como la contracción muscular, la presencia de ligandos extracelulares, y el estrés afectan el estatus energético celular de diversas maneras, y AMPK actúa como sensor-efector para restaurar el balance energético y metabólico.

#### **i. Ejercicio y la contracción muscular**

En condiciones fisiológicas, un estrés metabólico capaz de activar a AMPK es el ejercicio o la contracción del musculo esquelético, bien por el aumento en el consumo de ATP que conlleva o por el incremento del Ca<sup>+2</sup> necesario para la contracción muscular. El grado de activación de AMPK está asociado a la intensidad del ejercicio y se piensa que está inducido por cambios en la razón AMP/ATP y creatina/fosfocreatina (Richter and Ruderman 2009).

Además, el ejercicio es capaz de activar a AMPK en otros sitios como hígado y tejido adiposo, en consecuencia de la liberación a nivel muscular de interleucina 6 (IL-6) durante el ejercicio. Diversos estudios han comprobado que la IL-6 es capaz de activar *in vivo* e *in vitro* a AMPK, mediante un incremento en los niveles intracelulares de cAMP, y secundariamente un aumento del balance AMP/ATP (Ruderman, Keller et al. 2006, Kelly, Gauthier et al. 2009).

Durante el ejercicio, el desgaste de ATP a nivel muscular se ve compensado mediante la activación mediada por AMPK del metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos. Así, la activación de AMPK podría participar en algunos de los efectos beneficiosos del ejercicio, como son el incremento en la oxidación de ácidos grasos, el aumento de la biogénesis mitocondrial y en la toma de glucosa (Lantier, Fentz et al. 2014).

## **ii. Ligandos extracelulares**

La regulación de AMPK mediante ligandos extracelulares es parte de una respuesta conjunta ligando-receptor, con el fin de coordinar los requerimientos energéticos en todos los tejidos. Existen diversos tipos de ligandos, algunos de los cuales se unen a receptores que se encuentran acoplados a proteínas G. Estos receptores son proteínas transmembrana capaces de percibir moléculas extracelulares y activar las vías de transducción de señales y finalmente, las respuestas celulares (Kobilka 2007).

Muchas de estas interacciones ligando-receptor funcionan unidas a cascadas de señalización de inositol trifosfato (IP3), liberando calcio en el citoplasma y actuando mediante CaMKK (Towler and Hardie 2007).

Hay que tomar en cuenta que la naturaleza de estos ligandos extracelulares es diversa, y su acción sobre AMPK puede depender del tejido en el que se exprese, y mediante distintos mecanismos de acción. Por ejemplo, se sabe que el tejido adiposo también desempeña una función endocrina: las hormonas más importantes que produce son la leptina y adiponectina. La leptina activa AMPK en musculo esquelético e hígado pero la inhibe en hipotálamo y en músculo cardiaco (Kola, Boscaro et al. 2006). Por otra parte, la adiponectina aumenta la relación AMP/ATP permitiendo la activación de AMPK $\alpha$ , mientras que la resistina, otra hormona adipocítica, tiene efecto opuesto a la adiponectina (Sanz 2008).

Por su parte, la insulina es capaz de inhibir la actividad de AMPK sin que la relación AMP/ATP se vea afectada (Sanz 2008). En el contexto celular, la insulina se une a su receptor (INSR) y activa la ruta PI3K/Akt: Akt fosforila el residuo S485 de AMPK $\alpha$ 1 y S491 de AMPK $\alpha$ 2, y con ello disminuye la fosforilación de la T172 de ambas isoformas (Kovacic, Soltys et al. 2003)

### **iii. Estrés y regulación de AMPK**

La activación de AMPK puede ser inducida mediante una amplia gama de condiciones metabólicas entre las que destacan la ausencia de glucosa, la isquemia, el ejercicio, la hipoxia, el estrés oxidativo y el estrés hiperosmótico. A excepción de este último, que actúa a través de CaMKK (Sanz 2008), el resto parecen cursar con un aumento de la relación AMP/ATP (Kahn, Alquier et al. 2005, Hardie and Sakamoto 2006). Estudios posteriores han demostrado la activación de AMPK durante la hipoxia ocurre realmente por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que se generan durante el estrés oxidativo producto de la disminución del oxígeno (Emerling, Weinberg et al. 2009).

Estos eventos metabólicos llegan a comprometer el estado energético celular: AMPK actúa como sensor de este desequilibrio, y lo solventa mediante la inhibición de rutas anabólicas y otros procesos que estén consumiendo ATP, y a través de la activación de rutas catabólicas que generen ATP.

Especial interés ha despertado durante años la regulación de los complejos AMPK mediante la glucosa. El complejo AMPK es una pieza clave en la regulación del metabolismo glucídico a nivel de todo el organismo, y coordina para ello las acciones de múltiples tejidos periféricos, como son el músculo esquelético, el hígado, el tejido adiposo y las células  $\beta$  pancreáticas.

En levaduras, la privación de glucosa activa SNF1 y es rápidamente inactivada mediante la adición de glucosa (Hedbacker and Carlson 2008). Sin embargo, no se ha establecido claramente el mecanismo de acción. Inicialmente se pensaba que la privación de nutrientes originaba una depleción en el suministro de ATP, alterando la relación AMP/ATP y en consecuencia AMPK/SNF1 se

activaba (Hardie and Sakamoto 2006). No obstante, existen otros trabajos que señalan que la regulación de AMPK mediante glucosa puede ocurrir por mecanismos independientes a variaciones del balance AMP/ATP (Itani, Saha et al. 2003). En apoyo a esta idea, se ha determinado que la glucosa tiene un efecto activador directo sobre las fosfatasa PP1 y PP2A tanto en mamíferos como en levaduras (Ravnskjaer, Boergesen et al. 2006, Castermans, Somers et al. 2012). De hecho, algunos aminoácidos que utiliza el cuerpo para sintetizar glucosa como la leucina o glutamina son capaces de inhibir AMPK (Gleason, Lu et al. 2007).

En eucariotas, la regulación de AMPK mediante glucosa parece ser bastante compleja. Aunque la glucosa regula la actividad de AMPK en diversos tejidos, es de vital importancia en células  $\beta$ -pancreáticas e hipotalámicas, donde AMPK es capaz de detectar cambios en los niveles de glucosa y regular el transporte de la misma mediante los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2 y GLUT4 (Abbud, Habinowski et al. 2000, Xi, Han et al. 2001, Bolsoni-Lopes, Festuccia et al. 2014)

El glucógeno, una de las principales reservas de glucosa en el organismo, es capaz de unirse a la subunidad AMPK $\beta$  induciendo la inhibición alostérica de la actividad AMPK. Además, la proximidad de la AMPK a las reservas de glucógeno le permite efectuar cambios rápidos en el metabolismo del glucógeno en respuesta a cambios en las demandas metabólicas. Este hecho sugiere que AMPK puede ser responsable no sólo de detectar la energía disponible inmediatamente, sino también la que el organismo mantiene en reserva (McBride, Ghilagaber et al. 2009).

La regulación en diversos niveles de la captación/almacenaje de glucosa a través de la activación de AMPK, genera un entorno metabólico que actualmente es utilizado para la prevención y tratamientos de enfermedades como la diabetes de tipo 2 (Long and Zierath 2006). La metformina, una de las drogas más comúnmente utilizada en el tratamiento de esta enfermedad, produce su efecto hipoglucémico activando a AMPK y reduciendo la producción de glucosa en el hígado, donde la activación de AMPK inhibe la síntesis tanto

de glucosa como de lípidos (Zhou, Myers et al. 2001). Por otra parte, en células pancreáticas se encuentra asociada con la disminución de la secreción de insulina, lo que evita la hipoglicemia durante el ayuno (Kim, You et al. 2015).

#### **iv. Regulación farmacológica de AMPK**

La actividad de AMPK puede ser regulada por una gran variedad de productos químicos, bien de origen sintético (fármacos) o de natural (xenobióticos), muchos de los cuales están siendo usados en el tratamiento de enfermedades como diabetes, obesidad y cáncer (Grahame Hardie 2014). La mayoría de estos compuestos activan indirectamente a AMPK mediante el bloqueo de producción de ATP, a través de la inhibición de la glucólisis, o mediante la inducción de fosforilación oxidativa. Entre los activadores indirectos asociados al metabolismo oxidativo encontramos de la Oligomicina y el 2,4-dinitrofenol (Hawley, Ross et al. 2010), el fenobarbital (Rencurel, Stenhouse et al. 2005), algunas drogas usadas en el tratamiento de diabetes de tipo 2 como la fenformina y el Rosiglitazone (Owen, Doran et al. 2000, Fryer, Parbu-Patel et al. 2002)

Existen otros compuestos capaces de afectar proteínas por encima de AMPK en la ruta de señalización, e indirectamente promover su activación. Este es el caso del compuesto A23187 y otros ionóforos de  $Ca^{2+}$ , que incrementan los niveles intracelulares de calcio activando la quinasa CaMKK $\beta$  (Hawley, Pan et al. 2005, Hawley, Ross et al. 2010).

También está descrita la presencia de otros compuestos que activan a AMPK mediante una interacción directa. Esto ocurre con la Metformina, que interacciona con la subunidad AMPK $\gamma$ , el fármaco A-769662 y el salicilato con un mecanismo de unión similar a la subunidades  $\beta 1$  and  $\gamma$  (Scott, van Denderen et al. 2008, Hawley, Fullerton et al. 2012, Zhang, Wang et al. 2012).

Otros compuestos naturales son capaces de activar a AMPK, este es el caso de la Berberina (procedente de plantas del genero *Berberis*), el EGCG (epigallocatechin-3-gallate, principal metabolito antioxidante del té verde), la

Genisteína (procedente de la soja), y el Resveratrol (una fitoalexina presente en las uvas y el vino tinto) (Hardie, Ross et al. 2012).

En la actualidad, el activador de AMPK de más amplio uso es el **AICAR** (5-aminoimidazol-4-carboxamida 1- $\beta$ -D-ribofuranosido). Este compuesto es un análogo de adenosina, que una vez que es transportado al interior celular por transportadores de adenosina, es susceptible de ser fosforilado por la adenosina quinasa y transformado en ZMP, un análogo no metabolizable de AMP capaz de activar a AMPK. Esta activación se produce muy rápidamente con un aumento bastante marcado en la fosforilación del residuo T172 (Corton, Gillespie et al. 1995).

Si bien la activación de AMPK es compleja, la inhibición farmacológica parece serlo aún más. Prueba de ello, es la poca disponibilidad de compuestos descritos que presenten capacidad de inhibir AMPK, debido a su baja especificidad o a su capacidad de afectar a otras rutas y quinastas. A pesar de esto, los compuestos más usados son el compuesto C y el inhibidor C75.

El **compuesto C**, también llamado Dorsomorfina, es el inhibidor de AMPK más común. Es una pirrazolopirimidina que actúa como potente, selectivo y reversible inhibidor de AMPK, siendo un inhibidor competitivo de ATP ( $K_i = 109$  nM en ausencia de AMP) (Zhou, Myers et al. 2001). Este fármaco, es capaz de inhibir la activación de AMPK mediada por AICAR o Metformina y no afecta otras quinastas relacionadas a AMPK como ZAPK, SYK, PKC $\theta$ , PKA y JAK3 (Zhou, Myers et al. 2001, Fryer, Parbu-Patel et al. 2002). Por otra parte, el inhibidor **C75** actúa inhibiendo la enzima ácido graso sintasa, activando la oxidación de ácidos grasos, lo que supone un aumento en los niveles de ATP e inhibición de AMPK (Landree, Hanlon et al. 2004).

#### **d. Substratos de AMPK e implicaciones fisiológicas**

De manera fisiológica, AMPK se ve implicada en múltiples rutas celulares, lo que hace que tenga una amplia variedad de sustratos, entre los que se incluyen proteínas propias del metabolismo energético, de señalización celular, factores de transcripción y canales iónicos (Ver figura 16).

Las primeras proteínas identificadas como sustrato de AMPK fueron las enzimas biosintéticas de lípidos 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa y la isoforma ACC1 ( $\alpha$ ) de la acetil-CoA carboxilasa (Sim and Hardie 1988, Clarke and Hardie 1990). La posterior comparación de las secuencias de estas dos proteínas y otras, permitió la determinación de que existía un dominio sustrato consenso, en el cual AMPK fosforila un residuo de serina o treonina. La importancia de estos residuos se ha confirmado mediante el uso del péptido **SAMS**, un péptido de 15 residuos basado en la secuencia que rodea a la Ser79 de la ACC1 de rata que se ha convertido en el sustrato estándar para los ensayos de actividad quinasa AMPK (Dale, Wilson et al. 1995).

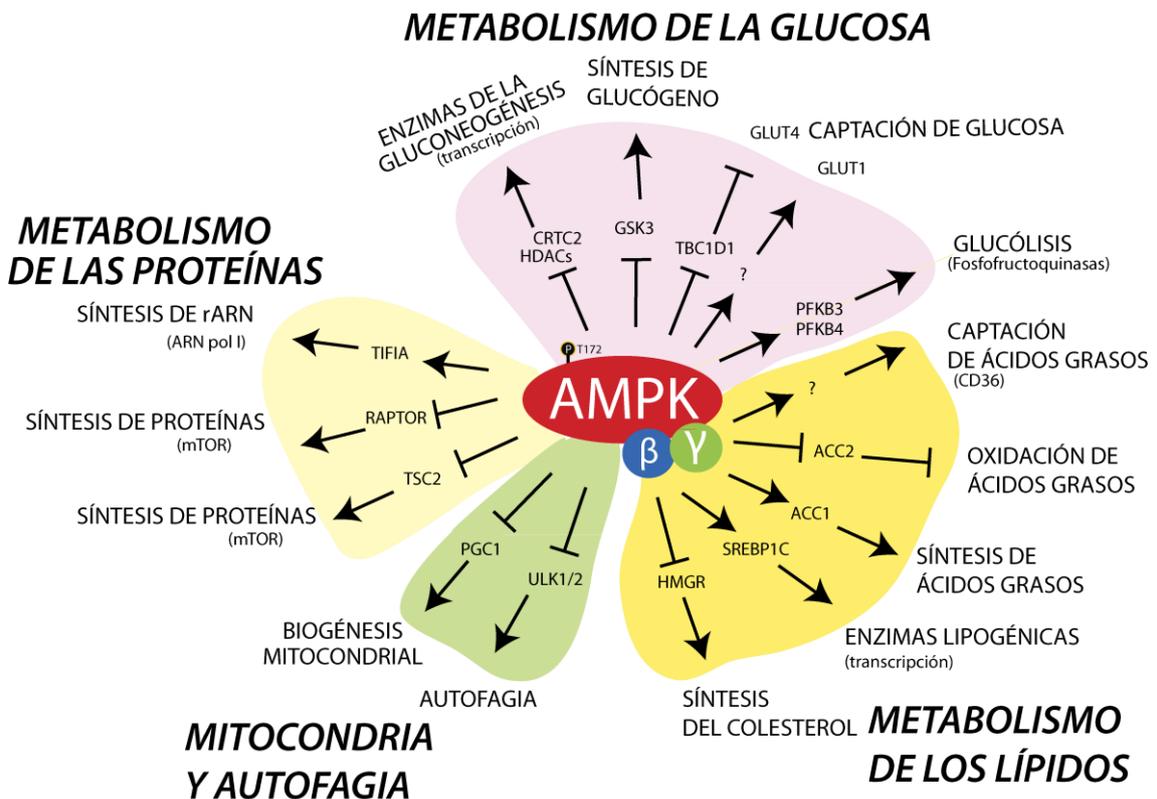


Figura 16. Principales procesos regulados por la activación de AMPK en mamíferos Adaptado de Hardie 2012

Esta secuencia consenso de fosforilación es  $\Phi X X \beta X X X S / T X X X \Phi$ , donde  $\Phi$  es un residuo hidrofóbico (Leu, Met, Ile, Phe o Val),  $\beta$  es un residuo básico (Arg, Lys o His, que pueden estar en posición 3 o 4), X es cualquier aminoácido, siendo S y T, serina y treonina respectivamente (Hardie, Scott et al. 2003).

### **e. Implicación de AMPK en el metabolismo de proteínas, crecimiento y ciclo celular**

La regulación de procesos celulares vitales, como el crecimiento celular y el ciclo celular, implican gran gasto de energía, lípidos y proteínas. AMPK es capaz de regular estos procesos modulando la expresión génica y la actividad tanto de enzimas biosintéticas, como de la maquinaria proteica de degradación (Witczak, Sharoff et al. 2008).

#### **i. AMPK y el crecimiento celular**

El metabolismo de proteínas se encuentra relacionado con la evolución del crecimiento celular y el ciclo celular. Tanto la replicación del ADN como la mitosis son procesos que demandan energía, y por lo tanto tiene poco sentido que ocurran en células que estén deficientes en energía. Por ello, la activación de AMPK causa parada del ciclo celular en fase G1 antes de la replicación del ADN (Imamura, Ogura et al. 2001). Esto se encuentra asociado con la fosforilación del supresor tumoral p53 en el residuo de serina 15 (Ser15) por parte de AMPK y el consecuente incremento en la actividad del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A CDKN1A (también conocida como p21<sup>WAF1</sup>, o Cip1), producto de la activación de p53 (Jones, Plas et al. 2005). Además, se sabe que AMPK puede estabilizar CDKN1B (p27<sup>KIP1</sup>), una proteína clave en la progresión celular mediante la fosforilación del residuo de treonina 198 (T198) (Liang, Shao et al. 2007). Estos eventos, pueden al menos explicar en parte, la capacidad de AMPK para inducir parada en el ciclo celular.

Por otra parte, otros estudios sugieren que la activación de AMPK es requerida para completar la mitosis. Prueba de ello es la identificación de nuevos sustratos de AMPK, relacionados con la mitosis, citocinesis y algunos componentes del complejo promotor de la anafase (APC/C) (Banko, Allen et al. 2011). No está claro por qué se una quinasa activada por estrés energético sea requerida para completar la mitosis. Una explicación posible es que la activación de AMPK acelera la mitosis en células que están entrando en estrés, de modo que se pueda ejecutar una parada ordenada del ciclo celular en la siguiente fase G1 (Hardie, Ross et al. 2012).

## **ii. AMPK y el control metabólico**

- **Síntesis de proteínas**

La síntesis de proteínas es un proceso que demanda un aporte de nutrientes y energía elevado, por ello no es de extrañar que AMPK se encuentre relacionada con este proceso. En situaciones de estrés o ayuno, cuando el organismo necesita evitar el gasto de energía, AMPK inhibe la síntesis de proteínas y lo hace mediante la fosforilación de varios sustratos que afectan tanto la iniciación como la elongación de la traducción proteica. Por una parte, AMPK activa TSC2 (conocido como Tuberina) mediante la fosforilación de sus residuos de serina 1227 y 1345. El complejo TSC2/TSC1 tiene actividad GTPasa inhibitoria de mTOR, afectando la síntesis proteica a nivel de la iniciación de la traducción (Shaw, Bardeesy et al. 2004). Además, AMPK es capaz de fosforilar a Raptor e inhibir la síntesis de proteínas a través de mTOR, produciendo además, una parada del ciclo celular en fase G1 (Gwinn, Shackelford et al. 2008). Entonces, puede considerarse que AMPK actúa como un punto de control metabólico, coordinando el crecimiento con el estado energético celular.

- **Degradación de proteínas y autofagia**

La degradación de proteínas en el interior celular desempeña importantes funciones en las células.: actúa como el punto de control de diversos procesos biológicos, como la progresión del ciclo celular. Este proceso requiere gran cantidad de energía, y lo que conlleva la producción de una gran cantidad de péptidos y aminoácidos que la célula puede reutilizar para su metabolismo, para generar más energía o sintetizar nuevas proteínas (Konstantinova, Tsimokha et al. 2008). Por ello, es de esperar que AMPK también se encuentre implicada en el control de los dos mecanismos que mayormente se encargan de la degradación proteica, el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia.

Algunos estudios han descrito los efectos de la ubiquitinación sobre AMPK. Por una parte, la ubiquitinación de la subunidad AMPK $\alpha$  se considera el mecanismo más descrito de degradación de esta quinasa (Zungu, Schisler et al. 2011). Recientemente se ha determinado que la ubiquitinación de la subunidad AMPK $\beta$  por parte de la ligasa de ubiquitina Cidea, induce su degradación y el desensamblaje del complejo (Gong, Sun et al. 2009) .

Se ha determinado que AMPK puede unirse al proteasoma, mediante su interacción con la subunidad PSMD11 (Moreno, Viana et al. 2009). Este hallazgo sugiere que AMPK se une a esta subunidad para afectar su estado de fosforilación y potenciar su función. Por otra parte la activación de AMPK mediante agonistas incrementa la expresión otras ligasas de ubiquitina como MAFBx/Atrogin-1 y MuRF1, dos proteínas ligadas involucradas fundamentalmente en la atrofia del musculo esquelético y cardiaco (Krawiec, Nystrom et al. 2007).

Como se ha descrito anteriormente la **autofagia** se describe como un proceso catabólico que degrada proteínas y orgánulos con la intervención de lisosomas que es esencial para la supervivencia, diferenciación, desarrollo y mantenimiento de la homeostasis celular (Levine and Kroemer 2008). La autofagia implica la señalización por aminoácidos dependiente de la ruta de mTOR. Así, la activación de mTOR promueve la síntesis de proteínas y se inhibe la autofagia. El estrés nutricional y energético induce un reordenamiento metabólico, que incluye la activación de AMPK y a su vez inhibe a mTOR, suprimiendo procesos que gastan energía como la síntesis de proteínas y activando la autofagia, con el objetivo de reciclar energía (Shaw 2009). Por otra parte, en casos de privación de glucosa, AMPK puede activar de forma directa la autofagia, mediante la fosforilación de ULK1 en los residuos de serina 317 y 377 (Kim, Kundu et al. 2011).

## OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es realizar la caracterización estructural y funcional de la quinasa TbTOR4 durante el proceso de diferenciación de *T. brucei*, junto con la identificación de nuevos componentes involucrados dentro de esta ruta de señalización en el parásito.

Para ello, los **objetivos concretos** propuestos al inicio de esta tesis fueron:

1.- Desarrollar las herramientas moleculares necesarias para el análisis estructural de TbTOR4, y así identificar posibles proteínas o factores asociados a esta proteína mediante análisis de espectrometría de masas y posterior validación mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.

2.- Completar el análisis funcional de TbTOR4 durante el desarrollo de *T. brucei*, mediante el análisis de marcadores moleculares asociados a la transición de formas *slender* a *stumpy*.

3.- Estudiar la regulación de TbTOR4 tras la inducción de la diferenciación en cepas monomórficas mediante el uso de análogos hidrolizables de cAMP y 5'-AMP.

4.- Caracterizar proteínas relacionadas al desarrollo de quiescencia en *T. brucei* y su posible asociación funcional en la ruta de señalización de TbTOR4.

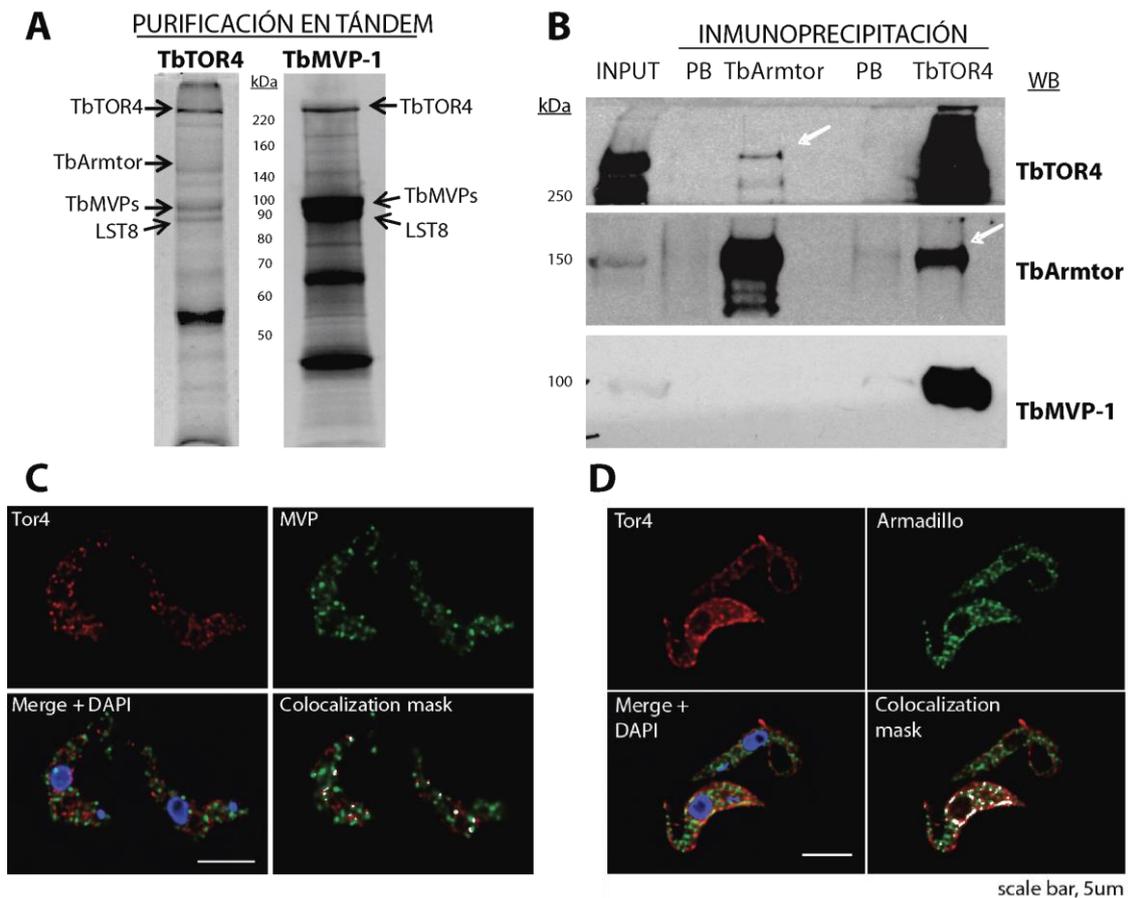
# RESULTADOS

## 1. TbTOR4 como represor de la diferenciación en *T.brucei*

Estudios preliminares realizados por Antonio Barquilla en nuestro laboratorio, sugerían que la reducción parcial de la expresión de TbTOR4 en la forma sanguínea, inducía la aparición de marcadores biológicos típicos de la forma *stumpy* en cepas monomórficas. Por ello, el inicio de este bloque de resultados, está destinado a la caracterización funcional y molecular de este fenotipo.

### 1.1.- TbTOR4 forma un complejo TORC4 en *T. brucei*

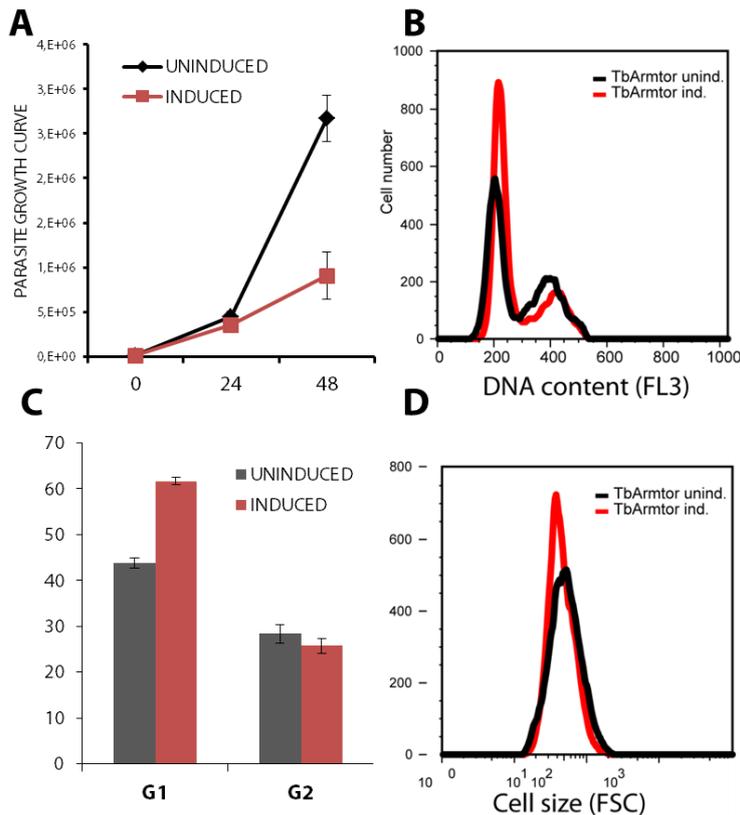
Para iniciar la caracterización funcional de TbTOR4, se decidió investigar si esta proteína forma un complejo multiprotéico, como ocurre con las proteínas mTOR de otros organismos. Para ello, se realizó en primer lugar una purificación por afinidad en tándem de TbTOR4 (TAP-TbTOR4) acoplada a análisis posteriores mediante espectrometría de masas. Esto condujo por una parte a la identificación de **LST8**, lo que confirma que TbTOR4 forma un complejo de tipo mTORC. En esta purificación no se identificaron otras proteínas canónicas de los complejos TORC1 o TORC2 como Raptor o Rictor, lo que sugiere que TbTOR4 forma un nuevo complejo multiprotéico en *T.brucei*, que nombramos **TORC4**. Además de LST8, fueron identificadas otras proteínas no descritas en otros complejos TOR en levaduras y mamíferos, tales como un ortólogo de la proteína chaperona **Major vault protein (MVP)** (Tb927.5.4460) y una proteína hipotética Tb927.4.2470 que contiene un dominio Armadillo, conocido por mediar interacciones proteína – proteína, que denominamos **TbArmtor** (por *Armadillo-containing TOR-interacting domain*). Esta interacción se confirmó posteriormente mediante ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos desarrollados en nuestro laboratorio frente a estas tres proteínas. Además, la interacción TbTOR4-TbMVP1 y TbTOR4-TbArmtor se confirmó mediante inmunofluorescencia. (Ver **Figura 1**).



**Figura 1.** TbTOR4 se une a TbMVP-1 y TbArmator para formar el nuevo complejo TORC4 (A) Detección de proteínas asociadas al complejo TORC4 tras la purificación en tándem de TbTOR4 y TbMVP-1. Las proteínas co-purificadas se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y se visualizaron mediante tinción Fluorescente (SYPRO Ruby), para su posterior identificación mediante espectrometría de masas. (B) TbTOR4 se une a TbArmator. Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron a cabo utilizando anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio, bajo las condiciones descritas en el apartado Materiales y métodos. (C) TbMVP-1 y TbArmator colocalizan parcialmente con TbTOR4. La inmunofluorescencia directa se realizó en cepas sanguíneas monomórficas utilizando anticuerpos frente a ambas proteínas.

A pesar de que la función de TbMVP-1 y TbArmator en tripanosomas es desconocida, se ha demostrado anteriormente en otros organismos que MVP sirve de andamiaje y sustrato de otras quinasas (Kolli, Zito et al. 2004, Berger, Steiner et al. 2009). El silenciamiento de TbTOR4 conlleva una parada del ciclo celular en fase G1. Para determinar si TbMVP-1 y TbArmator podían tener algún efecto en el funcionamiento del complejo TORC4, observamos el fenotipo tras la inhibición de ambas proteínas mediante ARN de interferencia. Si bien la inhibición de TbMVP-1 parece no tener efecto notorio sobre el crecimiento de los parásitos, la reducción parcial de los niveles de TbArmator afecta progresivamente la proliferación celular y conlleva una parada en fase G1 del

ciclo celular, sugiriendo que la presencia de TbArmtor es necesaria para la estabilidad del complejo (Ver **Figura 2**).



**Figura 2.** La reducción parcial de TbArmtor reduce la proliferación celular causando una parada en el ciclo celular en fase G1

(A) Curva de crecimiento de los parásitos tras la reducción parcial de TbArmtor mediante RNAi durante 48 horas. Los parásitos fueron inducidos (en rojo) o no con 1 µg/mL de doxiciclina a una densidad inicial de 10<sup>4</sup> parásitos/mL. (B) Análisis del contenido de DNA mediante FACS tras la reducción de TbArmtor durante 48 horas y su representación en un diagrama de barras (C).

(D) Análisis mediante FACS del tamaño celular tras la reducción parcial de TbArmtor. Las barras de error representan la media de 4 clones independientes.

Junto con TbMVP-1 y TbArmtor, en la purificación de TbTOR4 se identificaron varias proteínas asociadas a este complejo, aunque la reducción parcial de la expresión de estas no mostraba fenotipo asociado al complejo TORC4. La lista de estas proteínas se encuentra resumida en la **Tabla 1**.

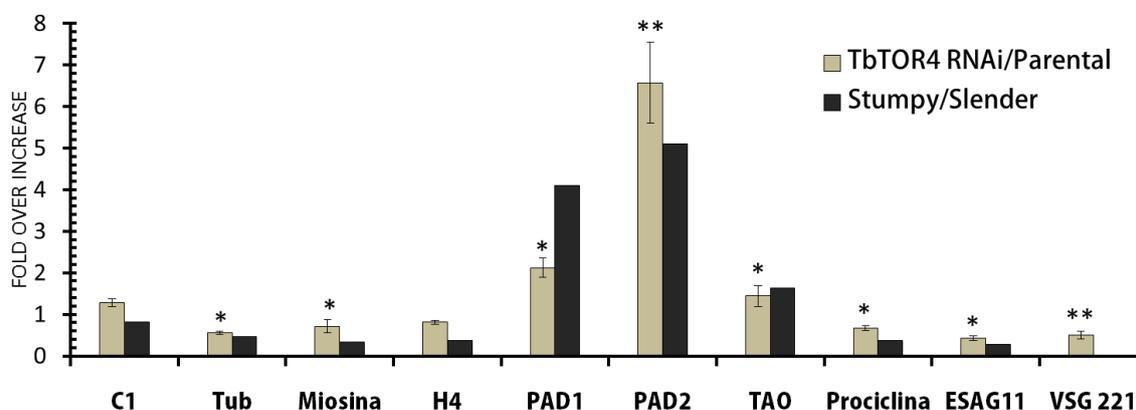
PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	GENE ID	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
TbTOR4	Tb927.1.1930	Phosphatidylinositol 3-kinase
TbARMTOR	Tb927.4.2470	ARM repeats
Major vault protein, putative. (MVP)	Tb927.5.4460	Ribonucleoprotein complex
Glycosyl hydrolase, putative.	Tb927.4.2410	Glycosyl hydrolase family 65 central catalytic domain
Glycosyl hydrolase, putative.	Tb11.01.2440	Glycosyl hydrolase family 65 central catalytic domain
TbLST8	Tb10.61.0700	WD40 repeats
Putative uncharacterized protein	Tb11.02.2080	No putative conserved domains was detected
Putative uncharacterized protein	Tb927.5.670	No putative conserved domains was detected
Protein phosphatase with EF-Hand domains	Tb927.8.1130	protein phosphatase with EF-Hand domains
Putative uncharacterized protein	Tb11.02.3830	No putative conserved domains was detected
Serine/threonine-protein kinase, putative.	Tb927.6.5100	Polo kinase kinase activity
Major vault protein, putative. (MVP)	Tb10.70.5840	Ribonucleoprotein complex
Major vault protein, putative. (MVP)	Tb927.10.6310	Ribonucleoprotein complex
p166	Tb11.02.0800	Cytochromes haem-containing proteins
DNA topoisomerase II alpha.	Tb11.01.3390	Type II topoisomerase family
Putative uncharacterized protein	Tb11.02.2090	ARM Repeat, NIPPED- B_C Domain
TFIIH basal transcription factor subunit (p52)	Tb927.10.5210	TFIIH subunit
Putative uncharacterized protein	Tb927.5.3070	RING finger domain-containing protein
Putative uncharacterized protein	Tb927.3.1990	Tetratricopeptide repeat protein
Putative uncharacterized protein	Tb927.3.3120	ARM repeats
Putative uncharacterized protein	Tb927.7.5690	SMC domain
TbPescadillo	Tb927.9.8200	Pescadillo N-terminus/BRCA1 C Terminus (BRCT) domain
Putative uncharacterized protein	Tb11.02.3790	Nuclear mitotic apparatus protein
Putative uncharacterized protein	Tb927.6.4100	Chromosome segregation protein SMC,

**Tabla 1.** Proteínas de unión a TbTOR4 identificadas por espectrometría de masas. La purificación se llevó a cabo utilizando extractos totales de  $4 \times 10^9$  parásitos que expresan una versión etiquetada de TAP-TbTOR4. Las proteínas de unión a los complejos TbTOR4 se identificaron mediante espectrometría de masas y se analizaron posteriormente utilizando el *software Scaffold 4.0*.

## 1.2.- La reducción parcial de TbTOR4 regula la expresión de genes asociados a la diferenciación hacia formas *stumpy*.

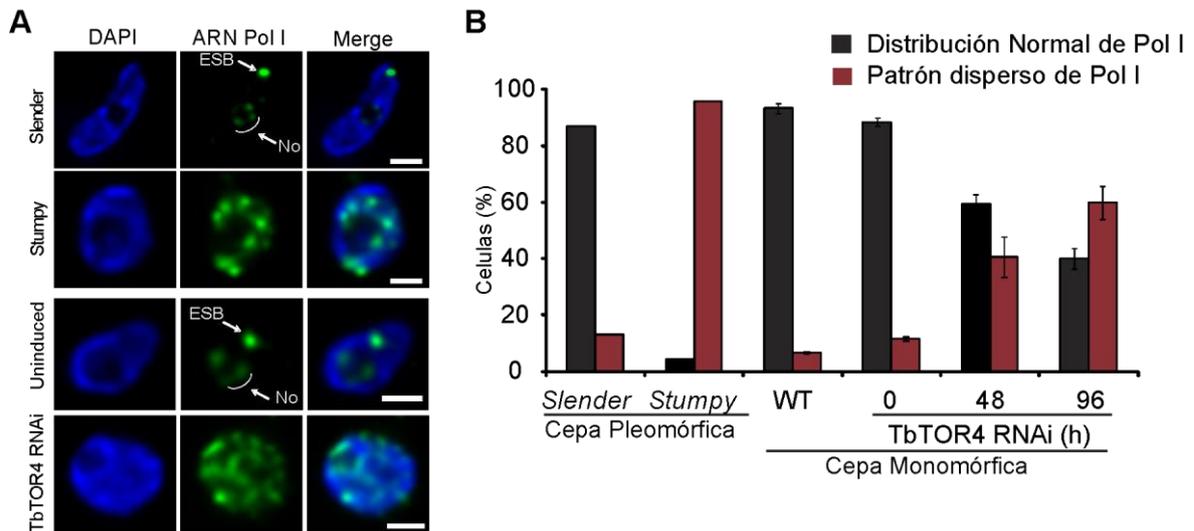
Además de los cambios bioquímicos y metabólicos, el desarrollo de la diferenciación hacia la forma *stumpy* está caracterizado por cambios específicos en el transcriptoma del parásito (Kabani, Fenn et al. 2009). Debido a resultados previos que sugerían que TbTOR4 estaba involucrado en la transición *slender-stumpy*, se analizó la expresión de genes descritos como marcadores de diferenciación mediante PCR a tiempo real. Como se observa en la **figura 3**, el perfil de expresión génica tras la reducción parcial de TbTOR4 muestra el incremento de los marcadores específicos de diferenciación **PAD1** y **PAD2** (del inglés, “*Protein associated with differentiation*”). Por otra parte, se observó la reducción de otros genes como la **Tubulina** (Tub), la **Miosina** (Myo) y la **Histona 4** (H4). Además, la inhibición de TbTOR4 reduce la transcripción del gen que codifica la **VSG**, así como la del gen co-transcrito asociado al sitio de expresión 11 (**ESAG11**), ambos asociados a la variación antigénica, tal y

como se había descrito en la forma *stumpy* en un estudio anterior (Kabani, Fenn et al. 2009).



**Figura 3.** TbTOR4 regula la expresión de genes asociados a la diferenciación de *T. brucei*. La gráfica representa la expresión génica tras la reducción de TbTOR4 durante 96 horas en cepas monomórficas respecto a la línea parental (en gris) o las formas *stumpy* respecto a las formas *slender* (en negro). Los genes que fueron analizados mediante qRT-PCR son: control (C1) (Tb927.10.12970), tubulina (Tub) (Tb927.1.2370), miosina (Tb927.11.16310), histona H4 (H4), PAD1 (Tb927.7.5930), PAD 2 (Tb927.7.5940), TAO (Tb927.10.7090), prociclina (Tb927.6.480), ESAG 11 (Tb427.BES40.19), y VSG221 (MITat 1.2/VSG2). Los histogramas representan los niveles de expresión de genes expresados como incrementos relativos comparados al control, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen ATM (Tb927.2.2260) como normalizador. Las formas *slender* y *stumpy* se obtuvieron tras la diferenciación en ratón de una cepa pleomórfica como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Aunque la transcripción del ADN ribosomal ocurre en el nucléolo, los genes VSG y ESAG son transcritos por la polimerasa de ARN de tipo I (ARN pol I) en un compartimiento extranucleolar denominado **ESB** (Expression Site Body) (Navarro and Gull 2001). Como se observa en la **Figura 4**, tras la inhibición de TbTOR4 la ARN pol I se deslocaliza desde el nucléolo al nucleoplasma mostrando un patrón disperso, similar a lo que ocurre durante la transición *slender-stumpy*, sugiriendo que TbTOR4 controla la transcripción mediada por esta polimerasa y su localización nucleolar durante el desarrollo hacia la forma *stumpy*.



**Figura 4.** TbTOR4 regula la localización nucleolar de la ARN polimerasa I. (A) Panel Superior Izquierdo. En las formas proliferativas *slender* la localización de TbRPA1 (la subunidad más grande de la ARN pol I) se limita al nucléolo (No) y al ESB, mientras que en la forma infectiva *stumpy*, esta localización se dispersa en múltiples zonas dentro del nucleoplasma. Panel inferior izquierdo. La reducción parcial de TbTOR4 afecta la localización de la ARN pol I, dispersándola dentro del nucleoplasma, similar a lo que se observa en la forma *stumpy*. Las proyecciones de máxima intensidad de cada capa muestran la señal anti-TbRPA1 en color verde y DAPI en azul. (Barras de escala, 1  $\mu$ m.) (B) Análisis estadístico de la distribución de la ARN pol I (pol I) en cepas pleomórficas y tras la reducción de TbTOR4 en cepas monomórficas. Se realizó el conteo de al menos 50 células para cada condición.

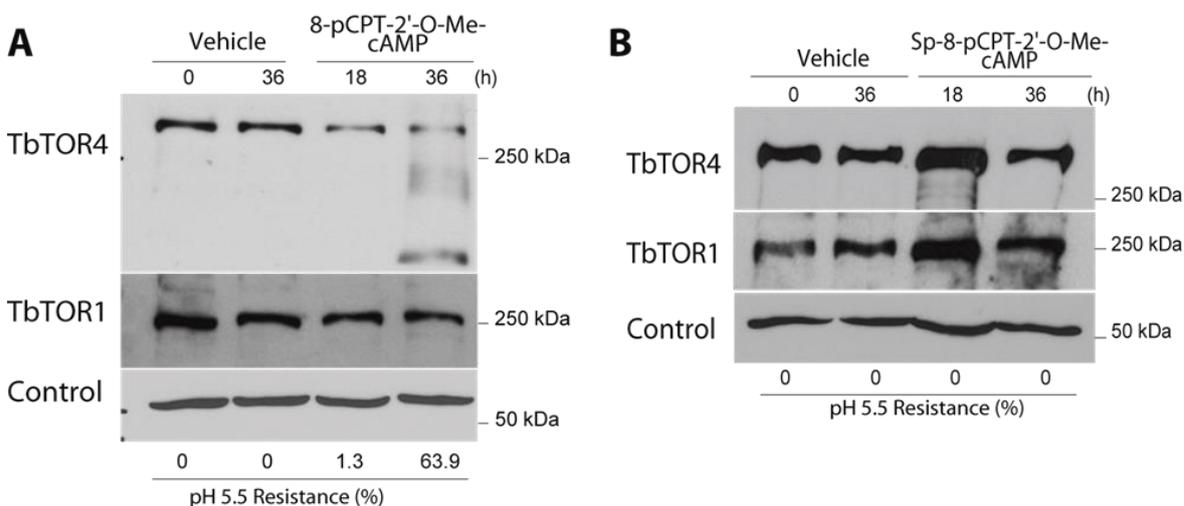
### 1.3.- El uso de análogos de 5'AMP y compuestos hidrolizables de cAMP reducen la expresión de TbTOR4 induciendo la diferenciación en *T. brucei*

Como se describe en la introducción, el uso de análogos de cAMP y 5'AMP induce la diferenciación hacia formas similares a *stumpy* en cepas monomórficas (Vassella, Reuner et al. 1997, Laxman, Riechers et al. 2006). Para estudiar la regulación de la ruta de señalización TbTORC4, se analizó la expresión de TbTOR4 en cepas monomórficas diferenciadas mediante el uso de análogos de cAMP.

En primer lugar, se incubó la forma sanguínea monomórfica con 10  $\mu$ M de un análogo hidrolizable de cAMP (**8-pCPT-2'-O-Me-cAMP**) durante 18 y 36 horas. Al analizar esta cinética se observó una reducción progresiva de la expresión de TbTOR4, que se correlaciona con la adquisición de resistencia a pH ácido 5.5, marcador fenotípico característico de la forma *stumpy* (Ver **Figura 5A**). Este análogo de cAMP puede ser hidrolizado en el medio de cultivo por

algunas fosfodiesterasas hacia productos de degradación como el **5'AMP** o la adenosina (Laxman, Riechers et al. 2006). Por tanto, era importante conocer si la reducción parcial de TbTOR4 era producto de una acción directa de cAMP o de su producto de degradación principal, el AMP.

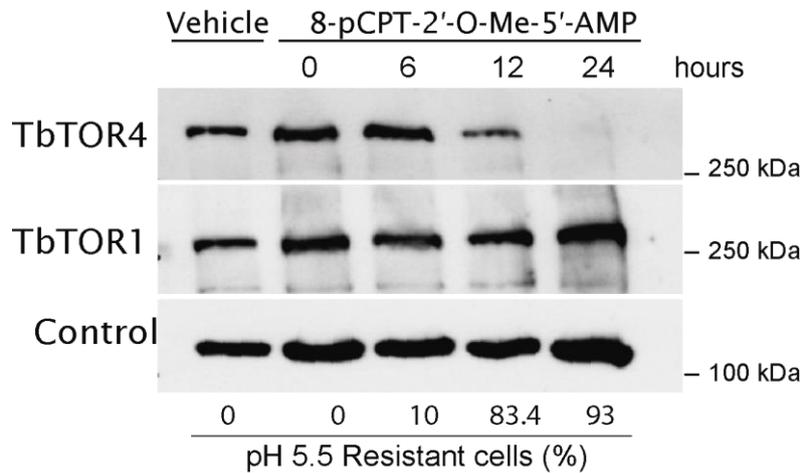
En primer lugar, y para comprobar los efectos directos del cAMP sobre TbTOR4 y utilizando condiciones similares al experimento anterior, se incubó los parásitos con 10  $\mu$ M de una versión no hidrolizable de cAMP (**Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS**). Como muestra la **figura 5B**, el uso de este compuesto no afectó la expresión de TbTOR4, ni la resistencia a pH ácido. Estos resultados sugieren que son los productos de degradación del cAMP quienes están afectando la regulación de TbTOR4 y en consecuencia la diferenciación del parásito.



**Figura 5.** La expresión de TbTOR4 se reduce tras el uso de un análogo hidrolizable de cAMP. (A) La incubación de *T. brucei* con 10  $\mu$ M de un análogo permeable e hidrolizable de cAMP (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) reduce la expresión de TbTOR4, e induce la diferenciación hacia la forma *stumpy* (resistentes a pH 5.5) sin afectar la expresión de TbTOR1. (B) Los parásitos tratados con 10  $\mu$ M de una versión resistente a la hidrólisis del compuesto anterior (Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS) no muestran reducción en la expresión de TbTOR4, ni se diferencian a *stumpy*. Los western blot son representativos de tres experimentos; para cada muestra se usó 40  $\mu$ g de extractos totales de proteínas y en ambos casos se utilizó la Tubulina como control de carga.

Para confirmar esta teoría, se incubó los parásitos con una dosis de 5  $\mu$ M de **8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP** durante 6, 12 y 24 horas. Durante el transcurso de esta cinética, se observó un incremento progresivo de resistencia a pH ácido junto una rápida progresión en la reducción de los niveles de TbTOR4 (**Figura 6**).

Esto sugiere que el AMP es necesario para regular la expresión de TbTOR4 y la inducción hacia la forma *stumpy*; además, plantea un modelo hipotético en el que niveles reducidos de energía (un desequilibrio AMP/ATP), inactiva el complejo TbTORC4 para inducir la diferenciación hacia la forma quiescente *stumpy*.



**Figura 6.** Expresión de TbTOR4 tras el uso de un análogo de 5'-AMP. La incubación de *T. brucei* con 5  $\mu$ M de un análogo permeable de 5'-AMP (8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP) promueve rápidamente la reducción de la expresión de TbTOR4 y la diferenciación hacia la forma *stumpy* (resistentes al pH 5.5), sin afectar la expresión de TbTOR1. El western blot es representativo de tres experimentos; en cada muestra se usó 40  $\mu$ g de extractos totales de proteínas y se utilizó la subunidad del exosoma TbRRP4 como control de carga.

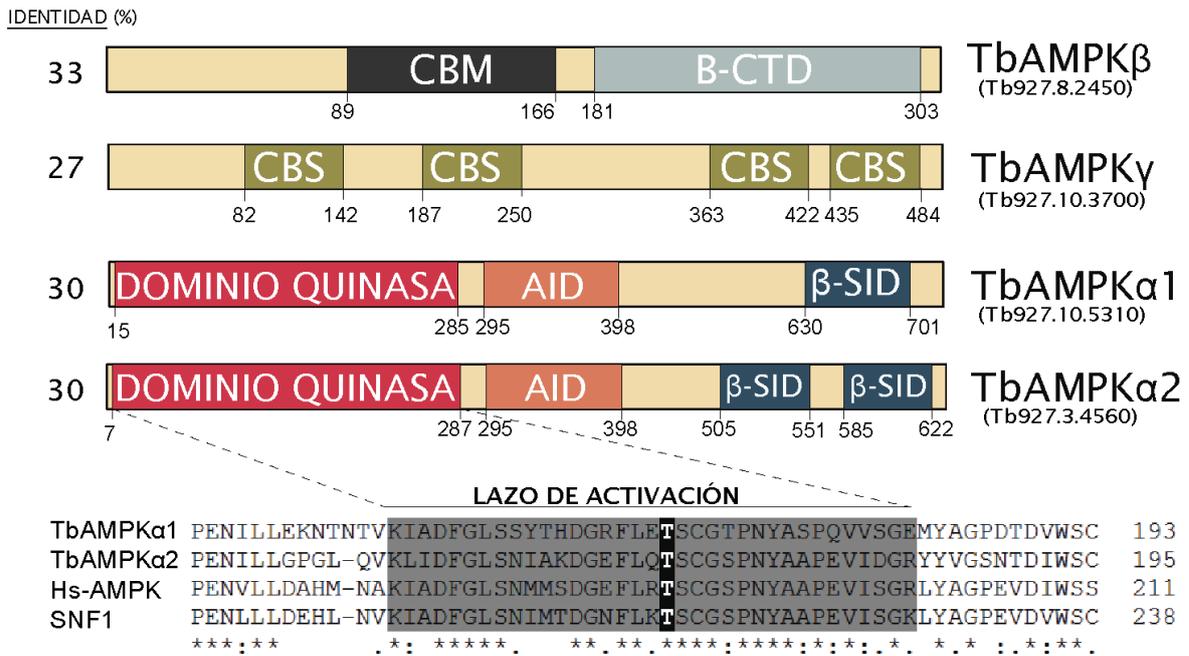
Es importante destacar que también se ha monitorizado la expresión de **TbTOR1** en cada uno de los ensayos de exposición al AMP y derivados, sin observar cambios en su expresión tras el tratamiento con los diferentes análogos; esto sugiere que la funcionalidad del complejo TbTORC4 en diferenciación es independiente a los eventos biológicos asociados a esta quinasa.

## 2.- TbAMPK en la regulación de la diferenciación en *T.brucei*

La mayoría de las células funcionan como sistemas autosostenibles, donde el equilibrio de energía se mantiene mediante un sistema homeostático complejo que involucra las vías de señalización y sensores de nutrientes en múltiples niveles. En eucariotas, los principales sensores de energía y nutrientes son las proteínas mTOR y AMPK, regulando el equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos en conformidad con los requisitos de células (Dunlop and Tee 2013). En los eucariotas, **AMPK** detecta los cambios en las relaciones de ATP/AMP durante las contracciones musculares, estrés oxidativo y la privación de glucosa. En este bloque de resultados se caracterizan por primera vez los complejos AMPK en *T. brucei* y se establece su vinculación funcional con el desarrollo de estos parásitos.

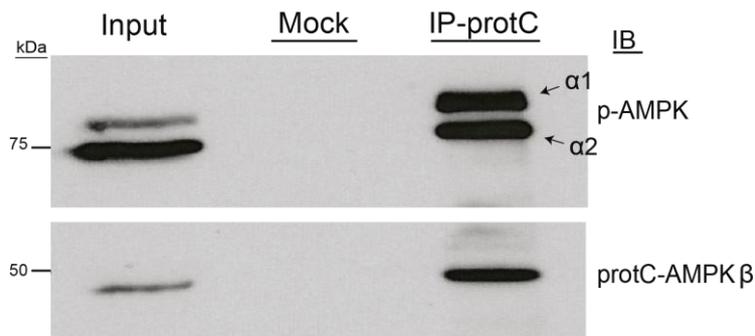
### 2.1.- Caracterización de los complejos AMPK en *T. brucei*

En la mayoría de los organismos, AMPK funciona como un complejo heterotrimérico compuesto por la subunidad catalítica alfa (AMPK $\alpha$ ), y las subunidades reguladoras beta (AMPK $\beta$ ) y gamma (AMPK $\gamma$ ) (Sanz 2008). Para iniciar los estudios de esta quinasa en *T. brucei*, se realizó un análisis *in silico* de los posibles ortólogos de AMPK en la base de datos de este parásito. Como se muestra en la **figura 7**, el genoma de *T. brucei* contiene una copia única de las subunidades reguladoras beta (**TbAMPK $\beta$** : Tb927.8.2450) y gamma (**TbAMPK $\gamma$** : Tb927.10.3700). Además, se encontraron dos copias de la subunidad catalítica alfa, que denominamos alfa-1 (**TbAMPK $\alpha$ 1**: Tb927.10.5310) y alfa-2 (**TbAMPK $\alpha$ 2**: Tb927.3.4560).



**Figura 7.** Representación esquemática de las regiones conservadas de los ortólogos de TbAMPK. Las secuencias de los ortólogos de TbAMPK se obtuvieron en la base de datos pública NCBI. El porcentaje de identidad se determinó tras el alineamiento múltiple de sus secuencias mediante Clustal W y se comparó con los ortólogos en levaduras. Los dominios predictivos de cada quinasa se identificaron usando la base de datos de proteínas InterPro. Las abreviaturas de los dominios corresponden a GBD: sitio de unión a glicógeno,  $\beta$ -CTD:  $\beta$ -subunit carboxy-terminal domain (Sitio de unión a  $\alpha/\gamma$ ), CBS: Dominios de Bateman, AID: dominio de autoinhibición,  $\beta$ -SID : $\beta$ -subunit interaction domain (sitio de unión a TbAMPK $\beta$ )

Una vez identificadas las potenciales proteínas ortólogas de AMPK, el siguiente paso fue determinar si estas proteínas formaban un complejo en *T. brucei* como se ha descrito en otros eucariotas. En primer lugar se purificó la subunidad reguladora TbAMPK $\beta$ , que es común a todos los complejos descritos de AMPK. Para ello, se expresó una versión etiquetada de esta proteína (Protein C-AMPK $\beta$ ) en cepas sanguíneas. La inmunoprecitación de esta subunidad permitió identificar que las subunidades catalíticas  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 se encuentran asociadas a esta subunidad, sugiriendo la presencia de dos complejos TbAMPK (Ver **Figura 8**).



**Figura 8.** La purificación de TbAMPKβ sugiere la presencia de dos complejos TbAMPK. El ensayo de co-inmunoprecitación muestra que ambas subunidades catalíticas (TbAMPKα1 y TbAMPKα2) se unen a TbAMPKβ. La purificación se llevó a partir de extractos totales de  $4 \times 10^9$  parásitos que expresan una versión etiquetada de la subunidad reguladora (Protein C-AMPKβ), utilizando como control negativo una resina de agarosa frente a proteína G. En el western blot, el input representa el 0.5 % del total precipitado. Las subunidades catalíticas se identificaron con un anticuerpo comercial fosfo-específico que reconoce un residuo conservado en el dominio quinasa de estas proteínas.

Como muestra la **tabla 2**, la presencia de dos complejos AMPK en *T. brucei* se confirmó tras el análisis mediante espectrometría de masas de la purificación del complejo TbAMPK, utilizando versiones de las subunidades TbAMPKα1 y TbAMPKβ etiquetadas con los epítomos HA y Protein-C respectivamente. Dentro del análisis mediante proteómica, se identificaron otras proteínas que han sido descritas previamente en otros organismos como parte de las rutas de señalización AMPK. Algunas de estas proteínas se encuentran implicadas en procesos metabólicos cruciales tales como la glucólisis (TbGSK3, TbHexoquinasa y Tbfosfofructoquinasa), la síntesis de proteínas (TbBIP) y el metabolismo oxidativo del parásito (sistema de peroxidasas de tripanotión TRYP1, TRYP2, TxN1a, y tiorredoxina).

Estos datos sugieren que AMPK se encuentra estructural y funcionalmente conservada en el parásito y se organiza en dos complejos independientes TbAMPKα1 y TbAMPKα2; de igual manera que en otros organismos, la funciones de AMPK se encuentran vinculadas a su interacciones con otras proteínas, nuestros resultados en proteómica sugieren que a nivel funcional TbAMPK podría estar regulando el metabolismo energético en *T. brucei*.

TbAMPK $\alpha$ 1		HITS
GENE ID	PROTEIN	
Tb927.8.2450	TbAMPK $\beta$	8
Tb927.10.3700	TbAMPK $\gamma$	10
Tb927.10.1890	Calpain	30
Tb927.5.2950	TbCMF3	22
Tb927.6.4670	TbMORN1	20
Tb927.11.7150	NGG1 interacting factor 3-like	12
Tb927.10.13570	RNA-binding protein, putative (RBP27)	8
Tb11.02.5450	BiP/GRP78	8
Tb927.5.4460	Major vault protein	2

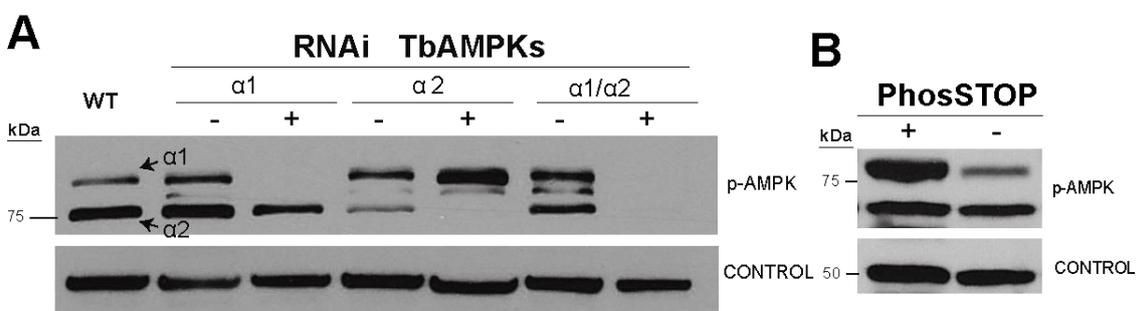
TbAMPK $\beta$		HITS
GENE ID	PROTEIN	
Tb927.10.5310	TbAMPK $\alpha$ 1	21
Tb927.3.4560	TbAMPK $\alpha$ 2	22
Tb927.10.3700	TbAMPK $\gamma$	25
Tb11.02.5450	BiP/GRP78	32
Tb927.6.2360	Adenosine kinase	12
Tb927.3.3270	Phosphofructokinase (TbPFK)	10
Tb927.10.2010	Hexokinase (HK1)	9
Tb927.9.5750	Tryparedoxin peroxidase (TRYP1)	6
Tb927.3.3780	Tryparedoxin 1a, TXNa1	6
Tb927.8.1990	Tryparedoxin peroxidase (TRYP2)	3
Tb927.10.13780	Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)	2

**Tabla 2.** Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas de los complejos TbAMPK. La purificación se llevó a cabo utilizando extractos totales de  $4 \times 10^9$  parásitos que expresan una versión etiquetada de la subunidad reguladora (Protein C-AMPK $\beta$ ) y catalítica (HA-TbAMPK $\alpha$ 1). Los hits de las proteínas de unión a los complejos TbAMPK representan número de péptidos identificados mediante espectrometría de masas y se analizaron posteriormente utilizando el *software* Scaffold 4.0.

## 2.2.- Herramientas moleculares para el análisis de la regulación de AMPK $\alpha$ en *T. brucei*

Mientras que en metazoos las proteínas AMPK $\alpha$ 1 y AMPK $\alpha$ 2 tienen un peso molecular muy similar, en tripanosomátidos las subunidades TbAMPK $\alpha$  muestran un tamaño de 80.6 kDa (TbAMPK $\alpha$ 1) y 70.6 kDa (TbAMPK $\alpha$ 2). Ambas subunidades conservan en el extremo amino terminal un dominio quinasa, que contiene el lazo clásico de activación donde se halla el residuo de treonina 172 (T172), marcador típico de actividad de esta proteína en todos los organismos.

Esto permitió el uso de un anticuerpo fosfo-específico comercial dirigido contra este residuo en estado fosforilado, permitiendo así monitorizar la regulación de esta quinasa. Como muestra la **figura 9A**, el tamaño de ambas subunidades catalíticas se distingue claramente mediante el análisis de western blot. La identidad de cada una de estas subunidades se determinó mediante RNAi, confirmando que la señal observada sobre los 80 kDa era específica para la subunidad TbAMPK $\alpha$ 1, mientras que la banda inferior de 70 kDa correspondía a TbAMPK $\alpha$ 2. Además, ambas señales se redujeron cuando se realizó un RNAi simultáneo de AMPK $\alpha$ 1- AMPK $\alpha$ 2. Por último, la fosfo-especificidad de este anticuerpo fue determinada mediante el uso de un cóctel de inhibidores de fosfatasa (Ver **Figura 9B**).

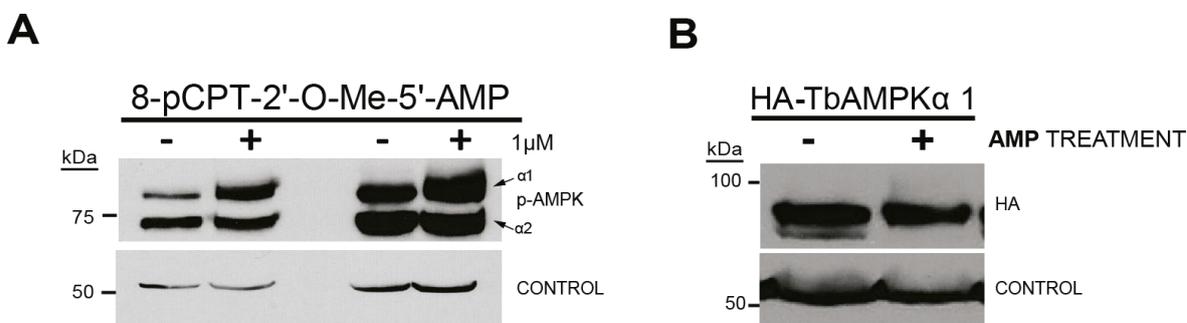


**Figura 9. Regulación de las subunidades catalíticas de TbAMPK** (A) La reducción parcial de la expresión de las subunidades TbAMPK $\alpha$ 1, TbAMPK $\alpha$ 2 o ambas mediante RNAi se monitorizó mediante western blot utilizando el anticuerpo anti-fosfo-AMPK $\alpha$  (p-AMPK). (B) Para determinar la fosfo-especificidad de este anticuerpo, los extractos de proteínas se incubaron en ausencia o presencia de un cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP). En ambos casos se utilizó Tubulina como control de carga.

### 2.3.- Análisis funcional de TbAMPK $\alpha$ en *T.brucei*

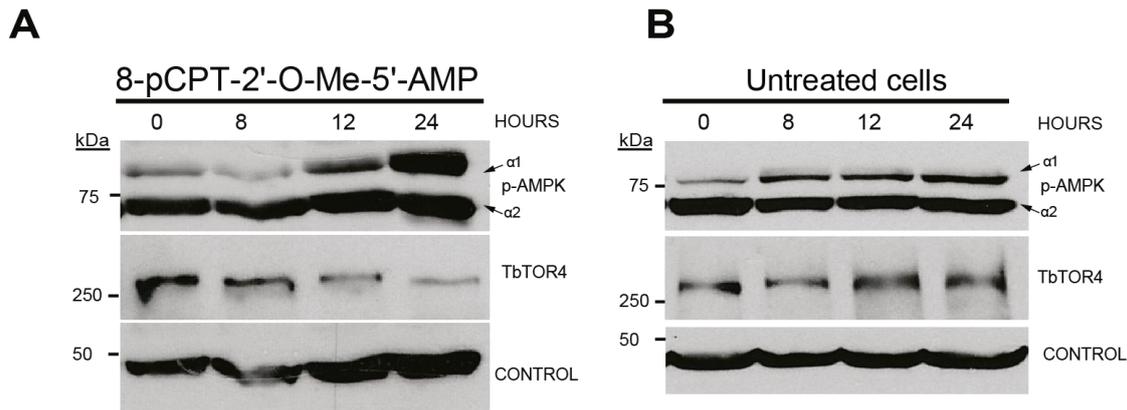
Para iniciar el estudio funcional de esta quinasa, se evaluó si el uso de un activador alostérico de AMPK, que mimetiza AMP dentro de la célula, era capaz de activar las TbAMPKs en tripanosomas. Para ello, se incubaron parásitos sanguíneos en cultivo con una dosis de 1  $\mu$ M de **8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP** durante 18 horas iniciando el tratamiento en diferentes puntos de la curva de crecimiento logarítmico de los parásitos. Como indica la **figura 10A**, el tratamiento con este compuesto mostró un claro incremento en la fosforilación de la subunidad TbAMPK $\alpha$ 1, mientras que la subunidad TbAMPK $\alpha$ 2 parecía no estar afectada. Para determinar si este tratamiento afecta el nivel endógeno

de expresión de TbAMPK $\alpha$ 1, se evaluó la expresión de una versión etiquetada HA-TbAMPK $\alpha$ 1, incubada en condiciones similares al ensayo anterior, sin observar cambio relevante en la expresión, lo que sugiere que el incremento observado anteriormente se debe a fosforilación (**figura 10B**).



**Figura 10.** La fosforilación de TbAMPK $\alpha$ 1 se incrementa en respuesta al uso de un análogo permeable de 5'-AMP. (A) Se incubó parásitos sanguíneos con 1  $\mu$ M of 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP durante 18 horas. Se observa un claro incremento en la fosforilación de la subunidad TbAMPK $\alpha$ 1, en comparación al control sin tratar. Las muestras se recogieron en dos fases distintas del crecimiento logarítmico de *T.brucei* para evitar un posible efecto de la densidad sobre la activación de TbAMPK. (B) La expresión endógena de TbAMPK $\alpha$ 1 no se altera tras el tratamiento con el análogo de 5'-AMP. Los parásitos que expresan una versión etiquetada de TbAMPK $\alpha$ 1 (HA- TbAMPK $\alpha$ 1) se incubaron de forma similar que en (A) durante 18 horas. Para monitorizar la fosforilación y expresión endógena de TbAMPK $\alpha$ 1 se empleó el anticuerpo p-AMPK y anti-HA respectivamente, además, se utilizó Tubulina como control de carga.

Además, se monitorizó mediante western blot la regulación de TbAMPK $\alpha$ 1. Como muestra la **figura 11A**, la activación de esta subunidad se incrementa en función del tiempo de incubación con **8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP**, y de manera simultánea se produce la reducción progresiva de la expresión de TbTOR4, tal y como se había descrito anteriormente en nuestro laboratorio (figura 4C) (Barquilla, Saldivia et al. 2012). Como control de este experimento y utilizando la misma cinética, se analizó la fosforilación de TbAMPK $\alpha$ 1 en ausencia del activador, sin observar cambios relevantes en la activación de la quinasa, ni disminución de TbTOR4 (**figura 11B**).



**Figura 11. Cinética de la activación de AMPK durante 24 horas** (A) La activación de TbAMPK $\alpha 1$  en parásitos tratados con 1  $\mu$ M of 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP ocurre de forma dependiente del tiempo, y en concordancia con la reducción de la expresión de TbTOR4. (B) La fosforilación de TbAMPK $\alpha 1$  incrementa ligeramente en respuesta a la densidad celular, pero a diferencia de (A) no afecta los niveles de expresión de TbTOR4. En ambas figuras se utilizó Tubulina como control de carga.

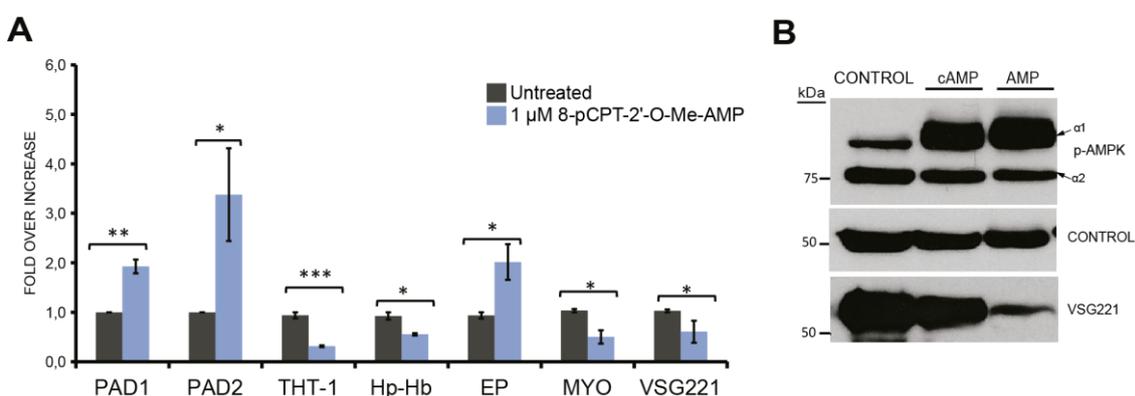
#### 2.4.- La activación de TbAMPK $\alpha 1$ se asocia con el desarrollo de formas similares a *stumpy*

Durante el curso de la infección por *T. brucei*, para evitar el agotamiento del hospedador y además preadaptarse para la transición hacia su insecto vector, la forma sanguínea reduce su proliferación mediante el desarrollo de formas quiescentes (Fenn and Matthews 2007). Este proceso puede reproducirse artificialmente mediante el uso de análogos hidrolizables de cAMP o 5'AMP en cepas monomórficas (Laxman, Riechers et al. 2006).

La **figura 10** muestra que la incubación de parásitos con un análogo de 5'AMP induce un incremento específico en la activación de la subunidad TbAMPK $\alpha 1$ , por lo que se quiso confirmar que esta activación estaba relacionada con la diferenciación de la cepa monomórfica a la forma *stumpy*.

La diferenciación hacia la forma *stumpy* se caracteriza por cambios específicos en el transcriptoma del parásito (Kabani, Fenn et al. 2009). Por ello, se cultivó parásitos con una dosis de 1  $\mu$ M de **8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP** durante 18 horas y se examinó el efecto de la activación de TbAMPK $\alpha 1$  en la expresión de genes que se encuentran regulados selectivamente en la forma *stumpy*. Como muestra la **figura 12A**, se observó una disminución significativa en la

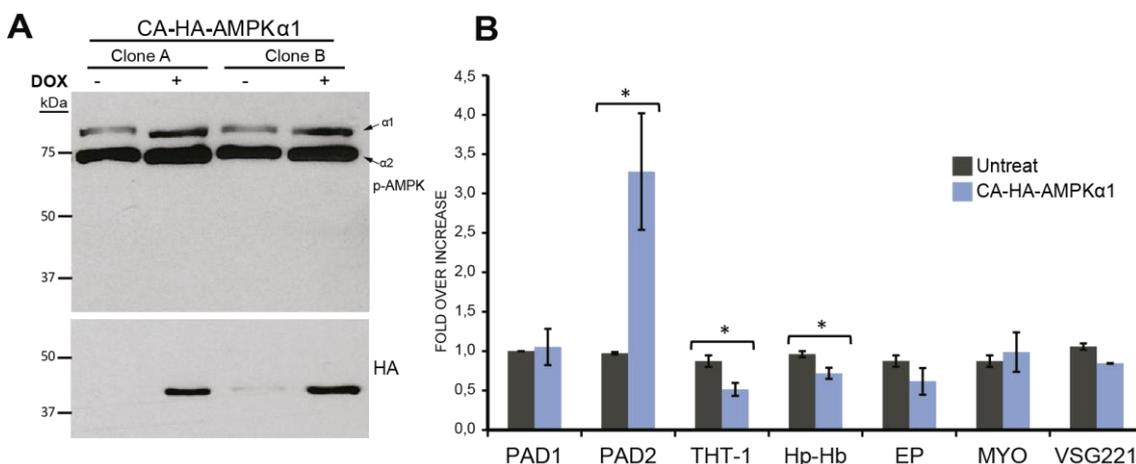
expresión de genes como el receptor Haptoglobina-Hemoglobina (**Hp-Hb**) y del transportador de hexosa 1 (**THT1**) al tiempo que aumentaba significativamente la expresión de los marcadores clásicos de diferenciación **PAD1** y **PAD2**. Además, la transcripción del gen que codifica la **VSG221** se redujo de manera notoria tras el tratamiento con el análogo de 5'AMP; estos datos se confirmaron posteriormente mediante análisis Western Blot de la expresión de esta proteína característica de la forma sanguínea (**figura 12B**).



**Figura 12.** La activación de TbAMPK $\alpha$ 1 tras el uso de un análogo de 5'-AMP induce la regulación de genes asociados a diferenciación. (A) La activación alostérica de TbAMPK $\alpha$ 1 resultante de la incubación de formas sanguíneas con 1  $\mu$ M of 8-pCPT-2'-O-Me-AMP durante 18 horas induce cambios en el transcriptoma de *T. brucei*, similares a los observados durante la transición *slender-stumpy*. Los genes analizados mediante RT-qPCR fueron: PAD1, PAD2, THT-1, Hp-Hb, Miosina (MYO), prociclina (EP) y VSG221 (MITat 1.2/VSG2). Los histogramas representan los niveles de expresión de genes expresados como incrementos relativos comparados al control sin tratar, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen C1 y ATM (Tb927.2.2260) como normalizadores.) (B) La activación de TbAMPK $\alpha$ 1 tras el uso de un análogo permeable de cAMP y 5'-AMP disminuyen la expresión de la VSG221, monitorizada mediante análisis de western blot utilizando un anticuerpo específico frente a dicha proteína de superficie desarrollado en nuestro laboratorio. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.0001.

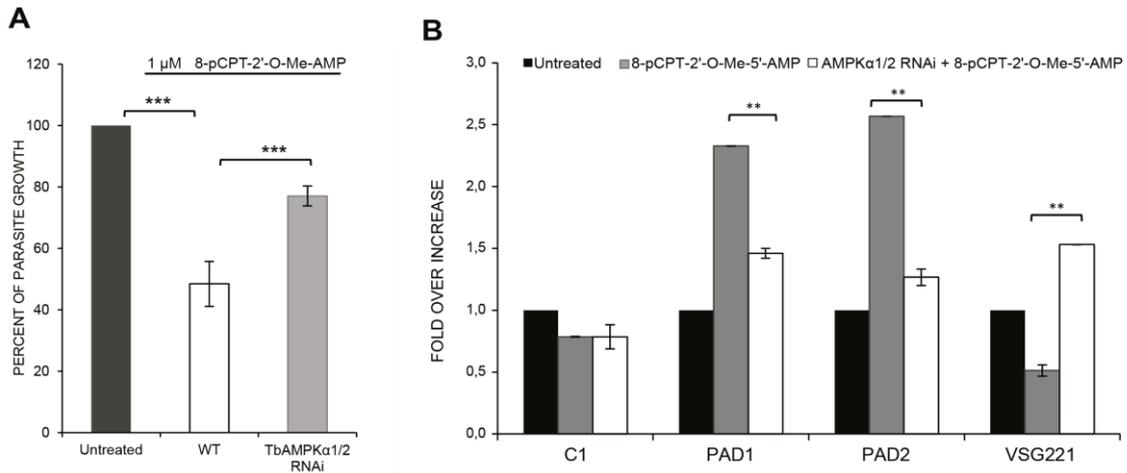
Además, se expresó en el parásito una versión truncada de TbAMPK $\alpha$ 1 que funciona como una quinasa constitutivamente activa (**CA-HA-TbAMPK $\alpha$ 1**). Para ello se analizó *in silico* la secuencia de TbAMPK $\alpha$ 1 y se expresó una versión que contenía el fragmento N-terminal (residuos 1-398) en el cual se halla el dominio catalítico (KD) perdiéndose los sitios de unión a las subunidades reguladoras. Como muestra la **figura 13A**, la expresión de esta versión truncada se encuentra regulada, y además induce los mismos cambios transcripcionales observados en la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 con el análogo de

5'-AMP, confirmando que esta quinasa regula positivamente la diferenciación de *T. brucei* (**figura 13B**).



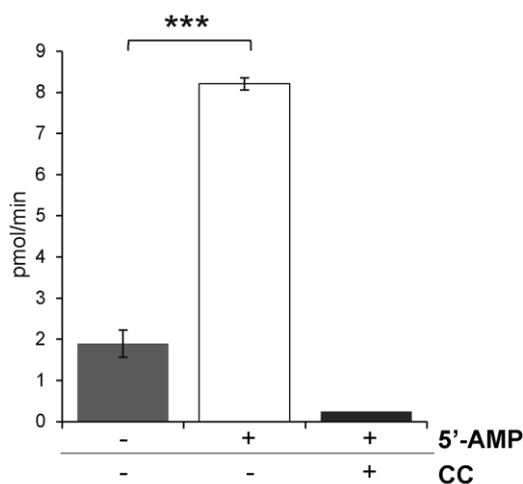
**Figura 13.** La expresión de la versión constitutivamente activa de TbAMPKα1 induce la regulación de genes asociados a la diferenciación. (A) Se analizó, en dos clones independientes mediante western blot, la expresión de una versión etiquetada de TbAMPKα1 con HA, que pierde los sitios de regulación y como consecuencia se encuentra constitutivamente activa CA-HA-TbAMPKα1 (aa 1-398). La expresión de esta versión truncada se evaluó empleando un anticuerpo monoclonal frente a HA. (B) Se indujo la expresión durante 48 horas de CA-HA-TbAMPKα1 y se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de los genes PAD1, PAD2, THT-1, Hp-Hb, prociclina (EP), Miosina (MYO), y VSG221 (MITat 1.2/VSG2). Los histogramas representan los niveles de expresión de genes expresados como incremento relativo comparado al control sin tratar, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen C1 y ATM (Tb927.2.2260) como normalizadores. Los datos representan la media ± SEM (n=3) siendo \*, p < 0.05.

Finalmente, para determinar si estos cambios observados a nivel transcripcional eran dependientes de TbAMPK, se repitió el tratamiento con el activador alostérico de la quinasa en parásitos donde se inducía RNAi simultáneo de ambas subunidades catalíticas. En ausencia de ambas subunidades, la incubación de estos parásitos con una dosis de 1 μM de 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP no afectó notoriamente el crecimiento celular (**figura 14A**), y no mostraban los cambios a nivel transcripcional observado anteriormente con el tratamiento con el activador alostérico (**figura 14B**), lo que sugiere que la presencia de ambas subunidades es necesaria para los efectos de este activador, y que estas quinasas son la principal diana del fármaco.



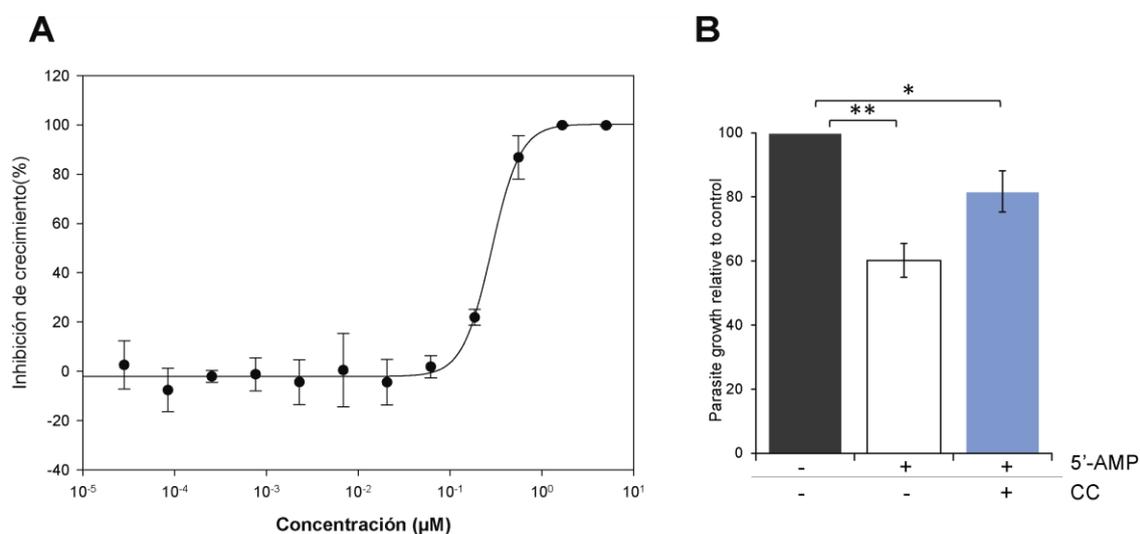
**Figura 14.** Los parásitos deficientes en TbAMPK $\alpha$ 1/2 son resistentes a los efectos del análogo de 5'-AMP. (A) El silenciamiento de ambas subunidades catalíticas (TbAMPK $\alpha$ 1/2) mediante RNAi contrarresta el efecto del tratamiento con el análogo de 5'-AMP sobre el crecimiento de *T. brucei*. Las barras representan la muestra sin tratar (en negro) y las muestras deficientes en TbAMPK $\alpha$ 1/2 tratadas (en gris) o no (en blanco) con el análogo de 5'-AMP. El silenciamiento se indujo durante 48 horas, posteriormente los parásitos se incubaron con 1  $\mu$ M 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP durante 18 horas. (B) Los parásitos deficientes en TbAMPK $\alpha$ 1/2 (en blanco) no muestran cambios transcripcionales asociados a diferenciación en comparación con la muestra control tratada (en gris). Se aisló el ARN total de las muestras en (A) y se cuantificó la expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes asociados a diferenciación PAD1, PAD2 y VSG221 (MITat 1.2/VSG2). Los histogramas representan los niveles de expresión de genes expresados como incremento relativo comparado al control sin tratar, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen ATM (Tb927.2.2260) y U2 (Tb927.3.3480) como normalizadores. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.0001.

Lo siguiente fue analizar cómo se afecta la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 por el uso de este activador alostérico. Para ello, se purificó esta subunidad para usarse en ensayos de fosforilación *in vitro* en presencia de fósforo radioactivo ( $^{32}$ P-ATP) y el sustrato consenso de AMPK, denominado “SAMS” (Davies, Carling et al. 1989). Para este ensayo, se incubaron, durante media hora con 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP (10  $\mu$ M), parásitos que expresaban una versión etiquetada de esta subunidad (HA-TbAMPK $\alpha$ 1). La versión HA-TbAMPK $\alpha$ 1 se purificó desde el parásito y se evaluó su actividad quinasa. Como muestra la **figura 15**, en condiciones normales la quinasa muestra actividad residual y es capaz de fosforilar el sustrato, sin embargo, la incubación previa con el análogo incrementa significativamente la actividad quinasa de HA-TbAMPK $\alpha$ 1.



**Figura 15.** TbAMPK $\alpha$ 1 puede fosforilar *in vitro* el péptido SAMS de una manera dependiente de 5'-AMP. Se incubaron parásitos que expresan HA-TbAMPK $\alpha$ 1 en presencia (en blanco) o ausencia (en gris) de 10  $\mu$ M de 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP (5'-AMP) durante 30 minutos. Posteriormente, se inmunoprecipitó HA-TbAMPK $\alpha$ 1 de ambas muestras utilizando una matriz de agarosa anti-HA. La actividad quinasa de TbAMPK $\alpha$ 1 (pmol/min) se ensayó mediante la incorporación de  $^{32}$ P-ATP en el péptido SAMS (100  $\mu$ M). Además, el uso del inhibidor Compuesto C (CC), inhibe la actividad quinasa de HA-TbAMPK $\alpha$ 1 (en negro). Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*\*\*, p < 0.0001.

Estos datos sugieren que este análogo activa TbAMPK $\alpha$ 1 en el parásito. Sin embargo, fue necesario confirmar que la señal detectada en el ensayo anterior era específica de la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 y no debido a otra quinasa contaminante que proceda de la purificación. Con este objetivo, se utilizó el “Compuesto C”, un inhibidor específico de AMPK en otros organismos. Como muestra la figura 15, el uso de este fármaco inhibe la actividad del análogo de 5'-AMP en los ensayos de fosforilación *in vitro*, confirmando que mantiene su capacidad de inhibir la actividad de TbAMPK en tripanosomátidos. Para analizar en detalle los efectos de este inhibidor en el parásito, en primer lugar se calculó la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) del compuesto en cultivos celulares, y como muestra la **figura 16A**, este compuesto tiene un IC<sub>50</sub> de 250 nM. Posteriormente, se utilizó esta concentración para pretratar los parásitos en cultivo durante 4 horas, tras las cuales se procedió a la incubación con 1  $\mu$ M de 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP durante 18 horas. Los parásitos que habían sido pretratados con el inhibidor muestran resistencia a los efectos del análogo de 5'-AMP sobre el crecimiento celular, confirmando la especificidad tanto del análogo como del inhibidor para regular la actividad de TbAMPK en *T. brucei* (**figura 16B**).



**Figura 16.** Los parásitos pretratados con el compuesto C (CC) muestran resistencia al efectos del 5'-AMP en el crecimiento celular. (A) Los efectos del Compuesto C en la proliferación celular se calculó mediante el ensayo colorimétrico alamarBlue®, obteniendo un IC<sub>50</sub>: 0,28 ± 0,02 μM a las 72 horas de incubación. (B) Los parásitos tratados previamente con el compuesto C muestran resistencia al efecto en el crecimiento inducido por el análogo de 5'-AMP (8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP). Los parásitos fueron pretratados con 0,25 μM del compuesto C durante 4 horas y posteriormente incubados con 1 μM de 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP durante 18 horas. Los datos representan la media ± SEM (n=3) siendo \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01.

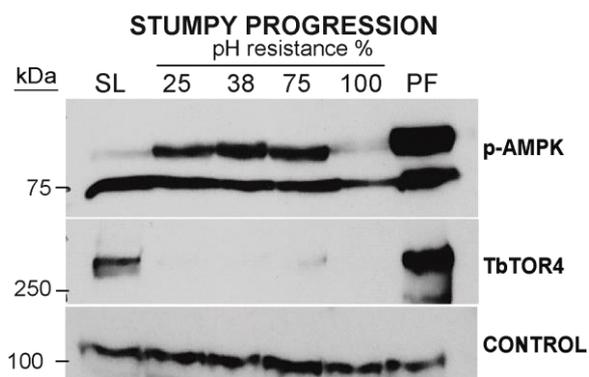
## 2.5.- TbAMPKα1 se encuentra regulada durante la diferenciación en cepas pleomórficas.

Cuando la tasa de parasitemia es elevada en el hospedador, las cepas pleomórficas de *T. brucei* inician un proceso de diferenciación en el que ocurre la transición entre formas proliferativas (*slender*) a quiescentes (*stumpy*). Previamente hemos mostrado que en cepas monomórficas adaptadas al laboratorio, la activación de TbAMPKα1 induce la diferenciación hacia formas similares a *stumpy* en cultivos *in vitro*. Sin embargo, para confirmar la importancia biológica de esto, es importante investigar qué ocurre en cepas pleomórficas (AnTat 1.1) durante una infección utilizando un modelo animal murino.

Para ello, se monitorizó la regulación de TbAMPKα1 durante la infección natural en ratones mediante el aislamiento de parásitos *AnTat 1.1* en diferentes momentos de la infección. Durante el curso de la infección, las formas *slender* son sensibles al pH ácido 5.5, mientras que las formas *stumpy* son completamente resistentes, como mecanismo de preadaptación a su insecto

vector (Nolan, Rolin et al. 2000), por lo que para monitorizar el grado de diferenciación se utilizó esta característica biológica.

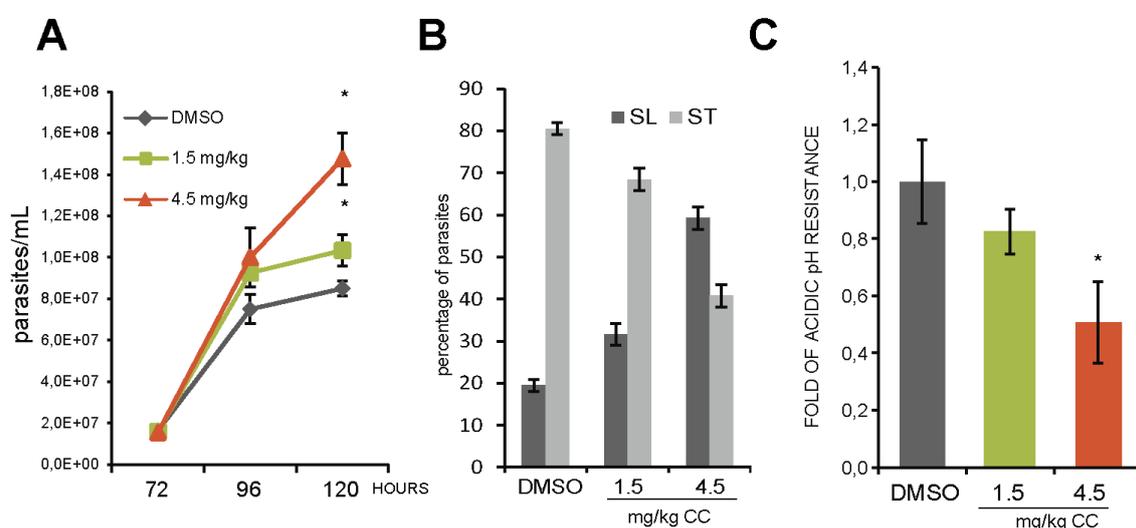
Como muestra la **figura 17**, el análisis mediante Western Blot demuestra que la subunidad TbAMPK $\alpha$ 1 posee poca actividad durante la fase proliferativa *slender*, mientras que estadios iniciales de diferenciación (25 % de resistencia a pH ácido) se observa un claro incremento en la fosforilación de la quinasa durante la transición hacia la forma *stumpy*, sugiriendo que esta activación ocurre en eventos tempranos de la diferenciación y se mantiene durante todo el proceso hasta que se completa la diferenciación (100 % de resistencia) donde vuelve a su actividad basal. Finalmente, cuando la forma *stumpy* prosigue el proceso de diferenciación hacia la forma procíclica, la actividad de TbAMPK $\alpha$ 1 se incrementa de forma notoria, probablemente debido a los cambios metabólicos drásticos propios de este estadio celular. Además, se observa una reducción en la expresión de TbTOR4, similar a lo que se observó anteriormente cuando se indujo la diferenciación en cepas monomórficas en cultivos *in vitro* usando un análogo de 5'-AMP. Estos resultados apoyan la teoría de que la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 está asociada al desarrollo de *T. brucei*, probablemente regulando la transición hacia el insecto donde nuevamente TbAMPK $\alpha$ 1 se encuentra activa.



**Figura 17.** Regulación de TbAMPK durante el desarrollo de *T. brucei*. El análisis mediante western blot muestra la regulación de TbAMPK $\alpha$ 1 en la transición desde la forma proliferativa *slender* (SL) a la quiescente *stumpy* y su posterior diferenciación a la forma procíclica (PF) en cepas pleomórficas. Las muestras se obtuvieron utilizando un modelo de diferenciación murina con la cepa pleomórfica *AnTat 1.1*, para determinar la progresión de la diferenciación se determinó el porcentaje de células resistentes al pH 5.5. El western blot es representativo de 3 experimentos. Para determinar la regulación de TbAMPK y TbTOR4 se utilizaron anticuerpos p-AMPK y anti-TbTOR4, usando Tubulina como control de carga.

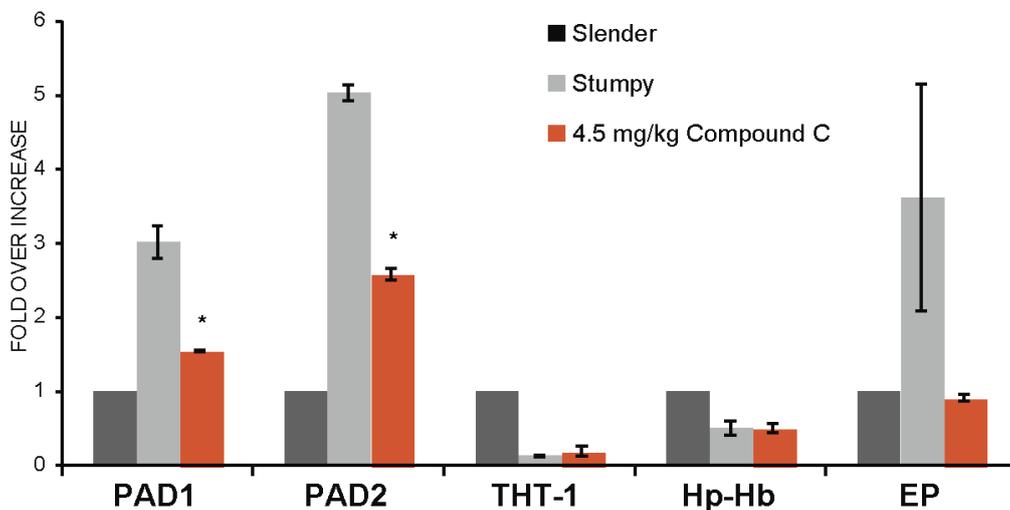
## 2.6.- La inhibición TbAMPK $\alpha$ 1 reduce la diferenciación hacia la forma *stumpy* durante la infección en ratón.

Puesto que la diferenciación *in vivo* hacia la forma *stumpy* se correlaciona con la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 en cepas pleomórficas de *T. brucei* (Figura 12), se determinó si la inhibición de TbAMPK $\alpha$ 1 era capaz de detener la formación de *stumpy* durante el curso de una infección natural. Anteriormente, se observó que el Compuesto C es capaz de inhibir AMPK en *T. brucei* (figura 11), por lo que se trataron ratones infectados con cepas pleomórficas con dos concentraciones distintas del inhibidor (1.5 mg/kg y 4.5 mg/kg). La **figura 18A** muestra que el número de parásitos aislados de ratones tratados con el inhibidor es mayor comparado con los ratones no tratados, sugiriendo que el tratamiento retrasa la adquisición de quiescencia, característica de las formas *stumpy*. Además, el análisis fenotípico de estos parásitos permitió observar que morfológicamente mantenían características típicas de las formas proliferativas *slender* (**figura 18B**), incluyendo una menor resistencia a la exposición al pH ácido, a diferencia de lo observado en parásitos aislados de ratones no tratados, que mantenían fenotipo *stumpy* (**figura 18C**).



**Figura 18.** La inactivación de AMPK $\alpha$ 1 retrasa la diferenciación de *T. brucei* hacia la forma *stumpy* en cepas pleomórficas (A) Los parásitos procedentes de ratones tratados con Compuesto C son más proliferativos en comparación con el grupo sin tratar (en gris). Tras 72 horas de la inoculación con la cepa pleomórfica AnTat 1.1 los ratones fueron tratados intraperitonealmente a diario con una dosis de 1.5 mg/kg (en verde) o 4.5 mg/kg (en naranja) de compuesto C. Los parásitos se aislaron de la sangre de ratón (4 ratones por grupo) utilizando una resina de Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa). (B) El análisis de la distribución morfológica de las formas *slender* y *stumpy* mostró que 50 % de los parásitos tratados con el compuesto C mantuvo características morfológicas de *slender* y eran menos resistentes a las fluctuaciones de pH (C). En contraste, los parásitos no tratados lograron diferenciarse totalmente a la forma *stumpy*. Los datos representan la media  $\pm$  SEM siendo \*,  $p < 0.05$ .

Finalmente, se aisló mRNA de estos parásitos para analizar cambios en los niveles de expresión de genes asociados a la diferenciación. La **figura 19** muestra cómo aquellos parásitos aislados de ratones tratados con la dosis máxima del inhibidor presentaban niveles de expresión en los genes PAD1 y PAD2 similares a la forma *slender*. Posteriormente, se confirmó mediante inmunofluorescencia que la reducción de los niveles de mRNA de PAD1 afectaba la expresión de esta proteína en el parásito (**figura 20**).



**Figura 19.** La inhibición de TbAMPK tras el uso de compuesto C afecta la regulación de los genes asociados a diferenciación en cepas pleomórficas. Se aisló mRNA de los parásitos procedentes de ratones infectados con la cepa pleomórfica que habían sido tratados o no con 4.5 mg/kg de compuesto C. Los resultados muestran la comparación de la expresión de los genes PAD1, PAD2 entre el grupo tratado (en naranja), el grupo control *slender* (en gris oscuro) y el grupo no tratado (en gris claro) que completó la diferenciación hacia la forma *stumpy*. Los histogramas representan los niveles de expresión de genes expresados como incremento relativo comparado al control sin tratar, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen ATM (Tb927.2.2260) y U2 (Tb927.3.3480) como normalizadores. Los datos representan la media  $\pm$  SEM siendo \*,  $p < 0.05$ .

En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de TbAMPK $\alpha$ 1 no solamente reduce la diferenciación hacia la forma *stumpy*, sino que su activación es requerida para el desarrollo de la forma quiescente. Asimismo, esta activación parece estar asociada a la inhibición funcional de TbTOR4.

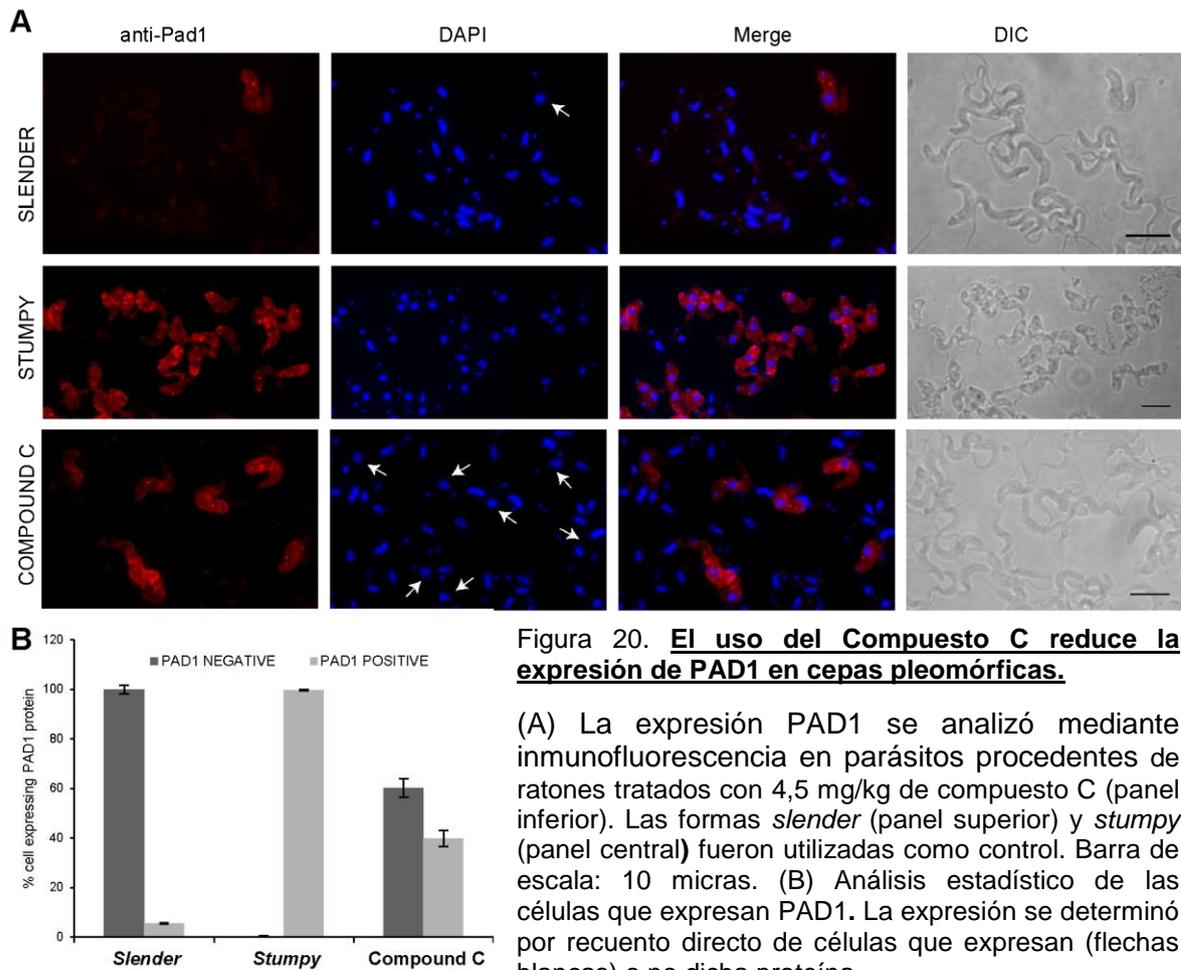


Figura 20. **El uso del Compuesto C reduce la expresión de PAD1 en cepas pleomórficas.**

(A) La expresión PAD1 se analizó mediante inmunofluorescencia en parásitos procedentes de ratones tratados con 4,5 mg/kg de compuesto C (panel inferior). Las formas *slender* (panel superior) y *stumpy* (panel central) fueron utilizadas como control. Barra de escala: 10 micras. (B) Análisis estadístico de las células que expresan PAD1. La expresión se determinó por recuento directo de células que expresan (flechas blancas) o no dicha proteína.

## 2.7.- Reguladores de la activación de TbAMPK $\alpha$ 1

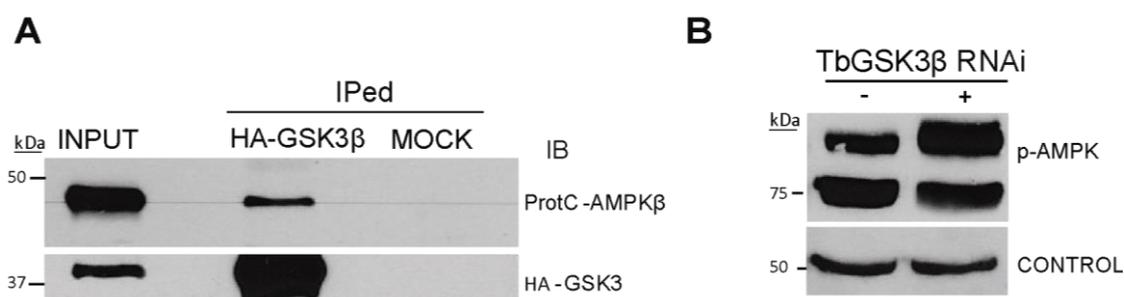
El siguiente paso fue identificar posibles activadores de TbAMPK $\alpha$ 1 en *T. brucei*. Como se mostró en la figura 9, en el análisis proteómico se identificaron reguladores conocidos en otros organismos de AMPK $\alpha$ 1, tales como GSK3 $\beta$  y proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo.

### 2.7.1.- GSK3 $\beta$ en la regulación de los complejos AMPK en *T. brucei*

La proteína GSK3 $\beta$ , además de regular la síntesis de glicógeno, se encuentra asociada a la homeostasis de glucosa en células de mamíferos, un mecanismo esencial en el metabolismo energético de las formas sanguíneas de *T. brucei*. En mamíferos, GSK3 $\beta$  inhibe la actividad de AMPK mediante su interacción con la subunidad reguladora AMPK $\beta$  (Suzuki, Bridges et al. 2013). Como se muestra en la **figura 21A**, la interacción de GSK3 $\beta$  y el complejo AMPK en el parásito, fue confirmada mediante un ensayo de coimmunoprecipitación usando

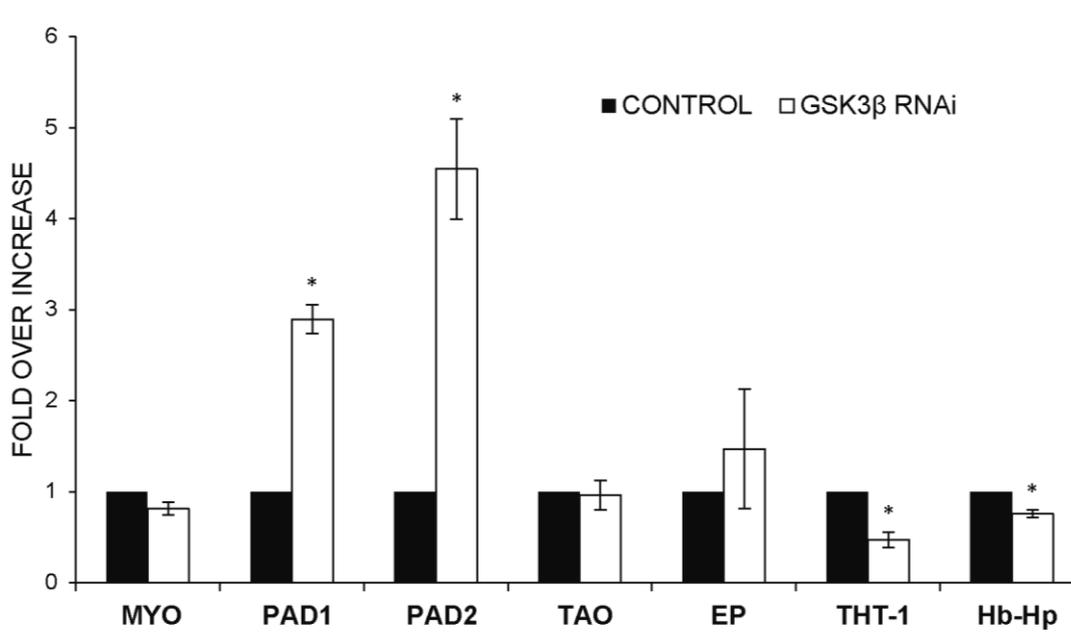
una versión etiquetada de TbGSK3 $\beta$  y TbAMPK $\beta$  (HA y Proteína C, respectivamente).

Además, se analizaron los efectos de la inhibición de TbGSK3 $\beta$  sobre la regulación de los complejos TbAMPK en *T. brucei*. Para ello, se indujo la reducción parcial de la expresión de TbGSK3 $\beta$  mediante RNAi y se analizó la fosforilación de TbAMPK mediante western blot, observando un claro incremento en la activación de la subunidad TbAMPK $\alpha$ 1 (**figura 21B**).



**Figura 21.** TbGSK3 $\beta$  se une a TbAMPK $\beta$  regulando la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 (A) La inmunoprecipitación de  $4 \times 10^9$  parásitos que expresan HA-TbGSK3 $\beta$  revela que esta proteína interactúa con la subunidad TbAMPK $\beta$ , confirmando los datos mostrados en la figura 9. La purificación de HA-TbGSK3 $\beta$  se llevó a cabo con una resina de agarosa anti-HA, utilizando una resina de agarosa anti-proteína G como control. La expresión de HA-TbGSK3 $\beta$  y proteinC-TbAMPK $\beta$  se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA y anti-Proteína C respectivamente. (B) El silenciamiento de TbGSK3 $\beta$  incrementa la fosforilación de TbAMPK $\alpha$ 1. Las muestras fueron recogidas tras 48 horas de inducción del RNAi de TbGSK3 $\beta$  y analizadas mediante western blot. La regulación de la fosforilación de TbAMPK $\alpha$ 1 se monitorizó utilizando el anticuerpo p-AMPK. La Tubulina se utilizó como control de carga.

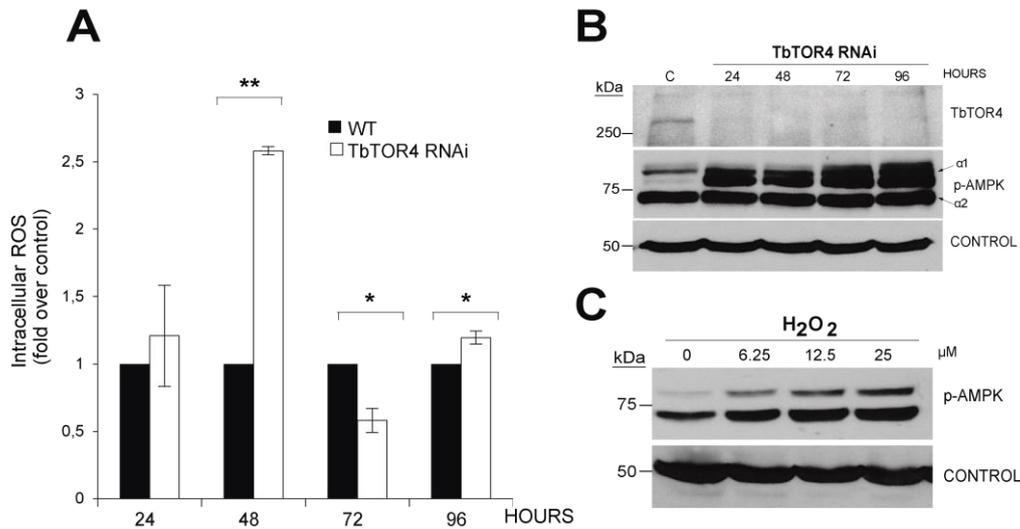
Para determinar si la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 como consecuencia de la inhibición de TbGSK3 $\beta$  podía inducir la diferenciación a formas *stumpy*, se analizó la expresión de genes asociados a este proceso mediante RT-qPCR. Como muestra la **figura 22**, tras 48 horas de inhibición de TbGSK3 $\beta$  los genes PAD1, PAD2, THT-1 y el TbHp-Hb se encontraban regulados de forma similar a la descrita tras la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 mediada el uso del análogo de 5'-AMP (ver figura 12A). Estos resultados indican que la interacción funcional y estructural de AMPK y GSK3 $\beta$  se encuentra conservada en tripanosomas.



**Figura 22.** El silenciamiento de TbGSK3 $\beta$  induce cambios en el transcriptoma similares a los observados tras la activación de TbAMPK $\alpha$ 1. Se aisló mRNA después de 48 horas de inducción de RNAi de TbGSK3 $\beta$  en cepas monomórficas y se analizó mediante RT-qPCR la expresión de los genes PAD1, PAD2, THT-1, Hp-Hb, prociclina (EP), Miosina (MYO), y VSG221 (MITat 1.2/VSG2). Los histogramas representan el nivel de expresión de genes expresados como incremento relativo comparado al control sin tratar, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen C1 y ATM (Tb927.2.2260) como normalizadores. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*, p < 0.05.

### 2.7.2.- TbTOR4 y el metabolismo oxidativo en la regulación de los complejos AMPK en *T. brucei*

Como se ha descrito anteriormente, la inhibición parcial de TbTOR4 induce la diferenciación hacia formas *stumpy*, restaurando la capacidad oxidativa mitocondrial en el parásito, lo que sugiere que el estrés oxidativo tiene una función importante en este proceso del desarrollo (Barquilla, Saldivia et al. 2012). Se ha descrito que la señalización a través de AMPK está asociada a respuestas celulares frente al estrés oxidativo (Duarte, Amorim et al. 2015). El estrés oxidativo se caracteriza por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), fundamentalmente radicales libres y peróxidos. Con el objetivo de determinar la posible asociación entre la respuesta oxidativa y la diferenciación en *T. brucei*, se monitorizó mediante citometría de flujo los niveles de ROS tras la inhibición parcial de TbTOR4 durante 96 horas en cepas monomórficas, observando un pico máximo a las 48 horas (**figura 23A**). Además, como se muestra en la **figura 23B**, la generación de ROS está correlacionada con el incremento progresivo de la activación de TbAMPK $\alpha$ 1.



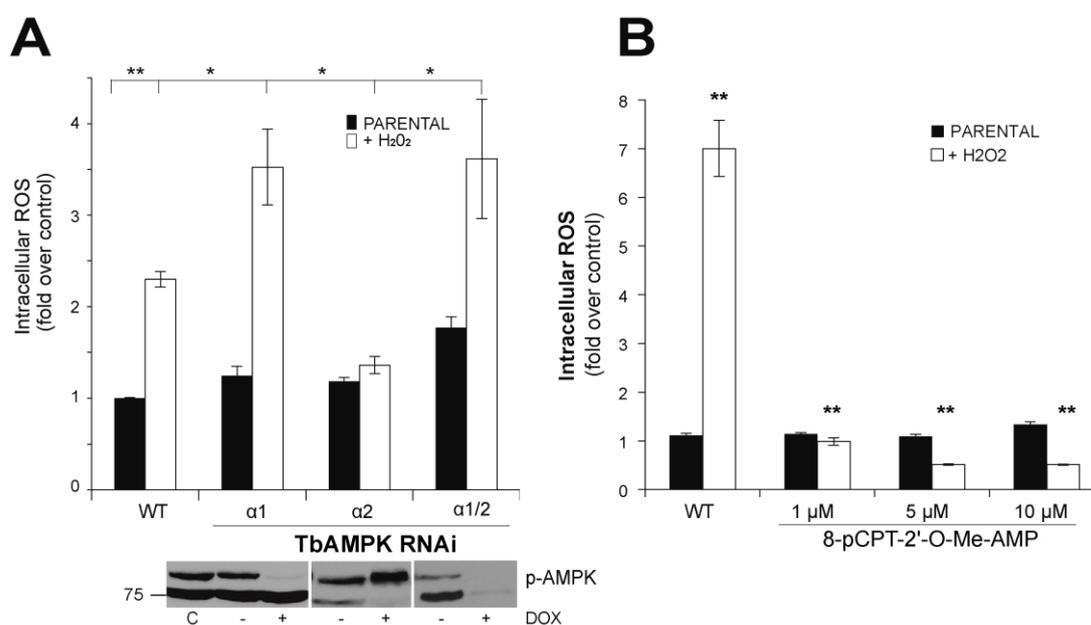
**Figura 23. *TbAMPK $\alpha$ 1* se activa en respuesta al estrés oxidativo generado tras el silenciamiento de *TbTOR4*.** (A) El silenciamiento de *TbTOR4* incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las barras representan los niveles intracelulares de ROS durante el silenciamiento de *TbTOR4* (en blanco) en comparación al control no inducido (en negro). Los cultivos se diluyeron diariamente a  $1 \times 10^5$  células/mL para mantener la densidad de las células dentro de un rango de crecimiento exponencial las 96 horas de inducción del RNAi. La oxidación de CM-H<sub>2</sub>DCFDA mediante FACS se utilizó como indicador de la producción intracelular de ROS. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . (B) *TbAMPK $\alpha$ 1* se activa progresivamente en respuesta al silenciamiento de *TbTOR4* mediante RNAi. Los extractos de las muestras obtenidas en (A) se analizaron mediante western blot para monitorizar la regulación de *TbAMPK* mediante western blot. (C) La fosforilación de *TbAMPK $\alpha$ 1* se incrementa en respuesta al estrés oxidativo producido tras la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. Los parásitos se incubaron con las concentraciones indicadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las muestras se analizaron mediante western blot para detectar la fosforilación de *TbAMPK*. En ambos western blot se utilizó tubulina como control de carga.

En otros organismos, el incremento de los niveles intracelulares de ROS se encuentra asociado a la activación de AMPK (Zmijewski, Banerjee et al. 2010). Para confirmar si este fenómeno se observa en *T. brucei*, se incubaron parásitos con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se analizó mediante western blot la regulación de *TbAMPK*. Como se muestra en la **figura 23C**, se observó un incremento en la fosforilación de *TbAMPK $\alpha$ 1* de forma dependiente a la dosis de peróxido exógeno. En conjunto, estos resultados sugieren que tras la reducción parcial de *TbTOR4* durante la diferenciación, los niveles intracitoplasmáticos de ROS incrementan con una consecuente activación de *TbAMPK $\alpha$ 1*.

El siguiente objetivo fue determinar la función de *TbAMPK* en el metabolismo oxidativo de *T. brucei*. Para ello, se incubaron con peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) parásitos cuya expresión de *TbAMPK $\alpha$ 1*, *TbAMPK $\alpha$ 2* o ambas se encontraba reducida mediante RNAi. Como se muestra en la **Figura 24A**, en ausencia

TbAMPK $\alpha$ 1, la capacidad de detoxificar el peróxido se encontraba afectada con respecto al control.

Por otra parte, tras la inhibición de TbAMPK $\alpha$ 2 (que conlleva la activación de TbAMPK $\alpha$ 1), los parásitos mostraban mejor capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo. Este resultado sugiere que la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 posee propiedades antioxidantes en este organismo.



**Figura 24.** La regulación de TbAMPK afecta el metabolismo oxidativo de *T. brucei*

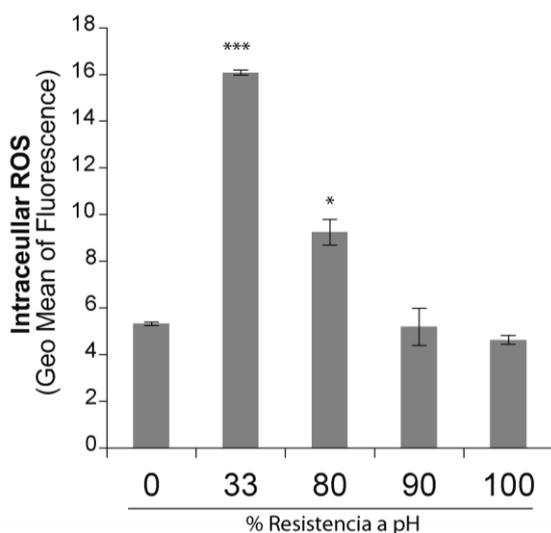
(A) El silenciamiento de TbAMPK $\alpha$  afecta el metabolismo de ROS. La expresión de las subunidades catalíticas de TbAMPK se redujo mediante RNAi durante 24 horas, posteriormente las células se incubaron durante 20 minutos con 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se cuantificaron los niveles intracelulares de ROS mediante FACS. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) de las muestras sin tratar (en negro) en comparación con las tratadas con peróxido (en blanco). En el panel inferior se muestra la eficiencia del RNAi de cada subunidad mediante análisis de western blot. (B) La activación alostérica de TbAMPK $\alpha$ 1 con 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP mejora el metabolismo oxidativo de *T. brucei*. Los parásitos se incubaron con las dosis indicadas de análogo de 5'-AMP durante 18 horas y posteriormente se incubaron con 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 20 minutos. Finalmente, la capacidad de respuesta oxidativa de los parásitos se analizó cuantificando la acumulación intracelular de ROS mediante FACS. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01.

Para confirmar esto, los parásitos fueron tratados durante 18 horas con distintas dosis del análogo de 5'-AMP (1-10 $\mu$ M) y posteriormente se analizó mediante citometría de flujo la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo de los parásitos, tras la adición de una dosis alta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M). La activación de TbAMPK $\alpha$ 1 mejoró significativamente la capacidad de respuesta

en *T. brucei* (**figura 24B**), tal y como se ha descrito en otros organismos (Colombo and Moncada 2009).

Una de las características biológicas exclusiva de los tripanosomátidos es su metabolismo oxidativo. En estos organismos, la eliminación de  $H_2O_2$  es llevado a cabo mediante el sistema de peroxidasas de tripanotión dependiente de NADPH (Diechtierow and Krauth-Siegel 2011). Durante el análisis proteómico de los complejos TbAMPK se identificaron los componentes de este sistema, sugiriendo una posible interacción funcional con TbAMPKs (figura 9). En mamíferos, los niveles de ROS pueden regularse por el incremento en la expresión de tioredoxinas a través de AMPK (Li, Song et al. 2009). Por ello, estos resultados sugieren que, en *T. brucei* la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 regula el sistema de peroxidasas de tripanotión para compensar el estrés oxidativo generado tras la producción de ROS.

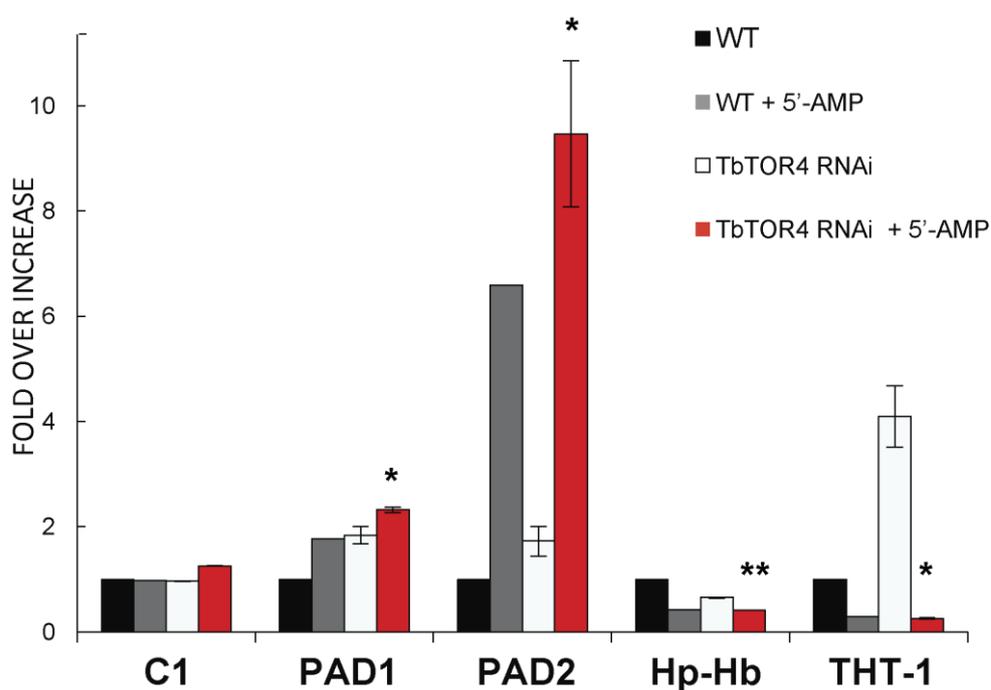
Además, se analizó si la diferenciación hacia la forma *stumpy* en un modelo *in vivo* se correlacionaba con los resultados descritos anteriormente en cepas monomórficas. Con este fin, se monitorizó la producción de ROS durante el transcurso de una infección de ratones con cepas pleomórficas *AnTat 1.1*. Como muestra la **figura 25**, durante etapas tempranas de la transición *slender-stumpy* se observó un incremento en la producción de ROS, similar lo que ocurre tras la reducción parcial de TbTOR4 en cepas monomórficas, confirmando la importancia biológica de este proceso durante el desarrollo de *T. brucei*.



**Figura 25.** Fluctuación de los niveles de ROS durante el desarrollo *in vivo* de los parásitos hacia la forma *stumpy*.

Se recolectaron muestras de *T. brucei* durante el transcurso de la diferenciación de ratones infectados con la cepa pleomórfica *AnTat 1.1*. La progresión de la diferenciación se monitorizó mediante el ensayo de adquisición de resistencia a pH ácido. Los datos representan la media geométrica  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) de los niveles intracelulares de ROS de grupo cuantificados mediante FACS.

Por último, para ubicar ambas quinasas dentro de una ruta de señalización, se analizó la expresión de marcadores moleculares de diferenciación en parásitos tratados con 5'-AMP (1 $\mu$ M) donde la expresión de TbTOR4 se encontraba reducida mediante RNAi. Como muestra la **figura 26**, se observó un patrón similar de regulación génica tras la incubación con el análogo de 5'-AMP incluso en ausencia de TbTOR4. Este resultado sugiere que TbAMPK se sitúa por debajo de TbTOR4 dentro de la ruta de señalización, regulando la expresión de genes asociados al proceso de diferenciación.



**Figura 26.** La diferenciación en *T. brucei* puede ser inducida tras el tratamiento con 5'-AMP incluso en ausencia de TbTOR4. La expresión de TbTOR4 se silenció durante 24 horas mediante RNAi en cepas monomórficas (en blanco). Posteriormente, se incubó con 1  $\mu$ M de 8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP durante 18 horas (en rojo) y se aisló el mRNA para análisis, mediante RT-qPCR, de la expresión de genes asociados a diferenciación PAD1, PAD2, Hp-Hb y THT-1. Como control se utilizó la cepa parental sin tratar (en negro) o tratada con el activador alostérico (en gris). Los histogramas representan los niveles de expresión de genes expresados como incrementos relativos comparados al control sin tratar, basado en la cuantificación del ciclo de umbral (CT) utilizando el gen ATM (*Tb927.2.2260*) y U2 (*Tb927.3.3480*) como normalizadores. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3) siendo \*, p < 0.05 y \*\*, p < 0.01.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral sugieren que *T. brucei* mantiene un equilibrio entre los procesos de diferenciación y proliferación a

través de una ruta de señalización mediada por el eje TbTOR4-AMPK. Esto permite al parásito modular su metabolismo en función a las necesidades energéticas y oxidativas del entorno encontrado en cada hospedador.

## DISCUSION

Todos los organismos enfrentan el reto de adaptarse y responder a diversas condiciones que incluyen estrés nutricional y energético (Fontana, Partridge et al. 2010). En este sentido, los parásitos protozoarios también se someten cambios durante su desarrollo en respuesta a las condiciones cambiantes del entorno de sus hospedadores. Es de este modo como aseguran su propia supervivencia, siendo capaces de detectar y responder a la disponibilidad de nutrientes en su entorno de acogida (Goldenberg and Avila 2011).

La precisión con que los tripanosomas africanos controlan la energía que necesitan para responder a los cambios de hospedador es fundamental para mantener un equilibrio entre la infección y la transición entre hospedadores. Para ello, *T. brucei* mantiene una asociación integral entre la regulación del ciclo celular y la diferenciación durante su ciclo de vida.

La alternancia entre diversos hospedadores y a su vez, compartimentos distintos dentro de ellos, requiere una adaptación precisa del parásito a la variación constante en las fuentes accesibles de carbono y nitrógeno, temperatura, cambios en pH y presión osmótica, entre otros. Esta adaptación se logra a través de la conmutación entre procesos anabólicos y catabólicos para hacer frente a los cambios secuenciales que se producen a través del ciclo de vida de este parásito, lo que implica cambios en los procesos fundamentales para la supervivencia de las células, como la síntesis de proteínas, la autofagia y la citocinesis, todo regulado por las quinasas mTOR y AMPK. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto la relevancia de las quinasas TbTOR4 y TbAMPK $\alpha$ 1 en la coordinación del crecimiento y desarrollo celular de la forma sanguínea de *T. brucei*.

En los kinetoplastidos, las múltiples quinasas mTOR podrían haber surgido en consecuencia de la duplicación génica seguido de una diversificación funcional de estas quinasas en respuesta a los mecanismos adaptativos del parásito. En levaduras también se ha descrito la duplicación del gen codificante para la

quinasa mTOR, probablemente como respuesta adaptativa al ciclo de vida unicelular de estos organismos (Hughes 1994).

La mayoría de genes duplicados se pierden en el curso de la evolución, pero aquellos duplicados que se especializan para cumplir funciones adaptativas esenciales tienen mayor probabilidad de permanecer invariables (Lynch and Conery 2000). La presencia de nuevas quinasas mTOR puede proporcionar nuevas funciones y conferir ventajas selectivas en los complejos ciclos de vida de *T. brucei*.

Una vez en el mamífero, los tripanosomas proliferan rápidamente y alcanzan altas densidades que pueden comprometer la viabilidad del hospedador. En este período de crecimiento incontrolado, es concebible que todas las quinasas TbTOR se encuentren activas para sostener el crecimiento, ya que cuando se altera la expresión de cualquiera de las quinasas TbTOR tiene efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular y la proliferación del parásito (Barquilla and Navarro 2009, Barquilla and Navarro 2009).

En este sentido, experimentos previos a esta tesis mostraron que la reducción parcial de TbTOR4 mediante interferencia de ARN, disminuye la proliferación celular tras una parada irreversible en fase G1 del ciclo celular, de manera similar a lo que se observa en otros organismos tras la inhibición de TORC1 (Soulard, Cohen et al. 2009). Sin embargo, si bien en *T. brucei* la reducción de otras quinasas TbTOR afecta al crecimiento celular (Barquilla, Crespo et al. 2008), el fenotipo resultante de la inhibición de TbTOR4 es irreversible y está asociado a la diferenciación del parásito, lo que sugiere que la evolución ha llevado a que cada quinasa TbTOR controle un proceso distinto dentro de la biología del protozoo. Aunque no existe evidencia experimental de compensación entre las quinasas TbTOR en *T. brucei*, considerando los procesos metabólicos que están asociados a éstas, es lógico que estas quinasas puedan asociarse en ciertas circunstancias, para orquestar el equilibrio metabólico durante el desarrollo del parásito.

El primer bloque de los resultados de esta tesis está enfocado en la caracterización funcional de **TbTOR4** durante el desarrollo del parásito. Para ello, en primer lugar se analizó si esta quinasa era capaz de formar un complejo multiprotéico, como ocurre con las otras quinasas TbTOR ya descritas por nuestro laboratorio (Barquilla and Navarro 2009). En el análisis de la purificación de TbTOR4 se identificó el homólogo de LST8, una subunidad presente en todos los complejos mTOR descritos (Kim, Sarbassov et al. 2003). Además, este análisis permitió identificar proteínas cuyas características biológicas eran atractivas como posibles miembros de un nuevo complejo TORC en *T. brucei*. Así, se identificó TbMVP-1 y TbArmtor como proteínas de unión a TbTOR4, formando un nuevo complejo proteico que se denominó TbTORC4.

En otros complejos TbTORC, la inhibición funcional de las principales proteínas reguladoras de cada complejo conlleva al desarrollo del fenotipo característico asociado a la reducción de TbTOR1 o TbTOR2 (Barquilla, Crespo et al. 2008). En este sentido, la inhibición de TbArmtor afecta la proliferación celular causando una parada del ciclo celular en fase G1, lo que podría apuntar a un posible papel en los mecanismos mediante los cuales TbTOR4 controla el ciclo celular. Por el contrario, la reducción de TbMVP-1 no afecta la proliferación celular ni genera fenotipos relacionados con la inhibición de TbTOR4 como cambios en el ciclo celular o resistencia a las fluctuaciones de pH. Sin embargo, los ensayos de coimmunoprecipitación muestran que TbMVP-1 se une con gran avidéz a TbTOR4. En mamíferos, esta proteína funciona como soporte de otras proteínas en el transporte núcleo-citoplasma, además puede ser sustrato de fosforilación de otras quinasas como la proteína quinasa C (PKC) y Erk; ésta última es capaz de fosforilar MVP en respuesta a la estimulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, teniendo así un papel importante en la supervivencia celular (Ehrnsperger and Volkandt 2001, Kolli, Zito et al. 2004). En este sentido, es probable que TbMVP-1 esté asociada a TbTOR4 como herramienta de conexión entre la quinasa y sus sustratos.

Es importante resaltar que en el análisis proteómico no se identificaron las proteínas clásicas de otros complejos TbTOR, como TbRaptor o TbAVO3, lo que indica que en tripanosomátidos TORC4 funciona como un complejo multiprotéico independiente.

Existen múltiples proteínas asociadas a los complejos TORC en mamíferos. Muchas de ellas interactúan de forma transitoria para controlar eventos biológicos a través de una combinación de fosforilación directa de los sustratos de mTOR o la represión de la actividad fosfatasa sobre otras proteínas (Raught, Gingras et al. 2001). Dentro del análisis proteómico de TORC4, junto a TbMVP-1 y TbArmtor, se identificaron otras proteínas implicadas en diversos procesos celulares como control del ciclo celular, transcripción, citocinesis, etc. Aunque en el análisis funcional de estas proteínas no se encontraron fenotipos similares al observado tras la reducción de TbTORC4, no se descarta que puedan unirse al complejo de forma transitoria como sustratos de TbTOR4, lo que abre la posibilidad de poder analizarlas posteriormente a más profundidad.

Es bien sabido que *T. brucei* proporciona un modelo excelente para estudiar el control post-transcripcional de la expresión génica en eucariotas. Sin embargo la mayor parte de las diferencias en su regulación génica se han centrado en las comparaciones de las etapas del ciclo de vida entre su hospedador mamífero y la mosca tse-tsé (Siegel, Gunasekera et al. 2011). Durante los últimos años se han descrito algunos genes cuya expresión se encuentra regulada durante la transición *slender-stumpy*, lo que permite su uso como marcadores moleculares asociados a la diferenciación (Kabani, Fenn et al. 2009).

En línea con estos estudios, el análisis de los ARN transcritos tras la reducción de TbTOR4 muestran una correlación con el desarrollo de quiescencia en *T. brucei*; de este modo, se observa un incremento en la abundancia de mRNA de los genes que codifican las proteínas PADs y una disminución tanto del gen

que codifica la VSG como del gen cotranscrito asociado del sitio de expresión 11 (ESAG11). Es importante destacar que este cambio en el transcriptoma asociado a la diferenciación del parásito ocurre en cepas que han perdido la capacidad de diferenciarse, lo que indica que la ausencia de TbTOR4 es capaz de inducir la diferenciación independientemente de la capacidad de respuesta de los parásitos al SIF.

Otra de las particularidades del desarrollo de *T. brucei* es su metabolismo energético, el cual difiere significativamente del de sus hospedadores y cambia drásticamente durante su ciclo de vida. Mientras se halla alojado en su hospedador mamífero, las formas sanguíneas *slender* tienen un tipo de metabolismo básico y totalmente dependiente de la degradación de glucosa en piruvato a través de la glucólisis (Vanderheyden, Wong et al. 2000, Huang, Vercesi et al. 2013). Ésto es debido a que la mitocondria de las formas sanguíneas poseen una expresión muy limitada de citocromos y de ciertas enzimas necesarias para completar el ciclo de Krebs. Durante el curso de la infección, cuando los parásitos se diferencian a la forma *stumpy*, su mitocondria se vuelve más activa, presentando un ciclo de Krebs más completo que incluye la presencia de un complejo NADH deshidrogenasa funcional, lo que restaura su capacidad oxidativa (Priest and Hajduk 1994). En anteriores estudios de nuestro laboratorio, se demostró que la reducción de TbTOR4 restaura la actividad mitocondrial en formas sanguíneas monomórficas confirmando la implicación de esta proteína en la transición de formas proliferativas a quiescentes de *T. brucei*. Este resultado se apoya con recientes estudios donde se vincula a mTOR con la señalización mitocondrial, estrés oxidativo y longevidad (Schieke, Phillips et al. 2006, Pan and Shadel 2009).

Durante años, el metabolismo energético de *T. brucei* ha sido el centro de muchos estudios enfocados en identificar los mecanismos que dirigen la formación de *stumpy* mediante el SIF. En este sentido, se ha descrito que la adición de un medio condicionado que contiene SIF incrementa los niveles de cAMP en cepas pleomórficas (Vassella, Reuner et al. 1997). Esto es

consistente con la observación de que en modelos murinos de infección existe un pico de cAMP cuando los parásitos alcanzan altas densidades que luego decrece cuando se completa el desarrollo de quiescencia (Mancini and Patton 1981). Por otra parte, el uso de un análogo permeable de cAMP (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) promueve la parada del ciclo celular en fase G1 en cepas pleomórficas proliferativas (Vassella, Reuner et al. 1997), y este efecto parece ser específico sobre esta forma del parásito, puesto que las formas procíclicas son insensibles, incluso a altas concentraciones de cAMP (Oberholzer, Marti et al. 2007). Estos resultados situaban al cAMP como transmisor de la señalización del SIF. Posteriormente, se identificó que los productos de degradación del cAMP eran realmente los responsables de la inducción de la diferenciación hacia la forma *stumpy*, abriendo nuevas posibilidades al estudio de la diferenciación en estos parásitos (Laxman, Riechers et al. 2006). Esta tesis doctoral, sitúa por primera vez a TbTOR4 dentro de la respuesta del parásito al desbalance energético producido tras el uso de análogos de cAMP y su principal metabolito el 5'-AMP. Lo cual tiene sentido, considerando las implicaciones de las quinasas de tipo mTOR en mantenimiento de la homeostasis nutricional y energética junto a AMPK (Dunlop and Tee 2013), la quinasa encargada de detectar y responder al desbalance intracelular de ATP/AMP.

Hasta el presente estudio desarrollado en esta tesis doctoral, tanto la ruta de señalización AMPK como la estructura de sus complejos permanecían totalmente desconocida en las formas sanguíneas infectivas de tripanosomas. Sin embargo, un estudio previo mostró que la inhibición de las subunidades reguladoras TbAMPK $\beta$  y TbAMPK $\gamma$  inducen cambios en la expresión de proteínas de superficie en la forma procíclica del parásito, presente en el insecto (Clemmens, Morris et al. 2009).

La segunda sección de resultados de esta tesis se centró en la caracterización de la estructura de los complejos de AMPK en *T. brucei*. De esta forma, se encontraron dos subunidades TbAMPK $\alpha$  que forman dos complejos TbAMPK diferentes. Aunque las subunidades TbAMPK $\alpha$  tienen diferentes tamaños

moleculares, ambas contienen el lazo de activación clásica y conservan el sitio de fosforilación activa, elementos que están altamente conservados en otros organismos. Curiosamente, la subunidad TbAMPK $\alpha$ 2 contiene un dominio  $\beta$ -SID adicional, aunque todavía no se ha establecido su relevancia funcional dentro del complejo. A nivel de nomenclatura, se denominó a la proteína Tb927.10.5310 como TbAMPK $\alpha$ 1 ya que ésta es capaz de regularse mediante un activador alostérico (8-pCPT-2'-O-Me-5'-AMP) y porque, según nuestros resultados, su activación se encuentra asociada a la regulación metabólica del parásito, tal como se describe en otros organismos (Aymerich, Fougelle et al. 2006, Gowans, Hawley et al. 2013).

El análisis proteómico de los complejos TbAMPK reveló su interacción con proteínas conocidas implicadas en procesos de regulación metabólica, y que además han sido vinculadas a la ruta de señalización de AMPK en otros organismos (Hardie, Ross et al. 2012). Estos procesos celulares incluyen el metabolismo de glucosa, purinas y estrés oxidativo, confirmando la relevancia de los complejos AMPK en orquestar la homeostasis de energía en el parásito.

Considerando que el incremento en los niveles de 5'-AMP altera la relación ATP/AMP, y que esto se detecta principalmente a través de AMPK (Suter, Riek et al. 2006, Carling, Thornton et al. 2012), los resultados en tripanosoma indican que TbAMPK $\alpha$ 1 tiene un papel activo en la detección y coordinación del flujo de energía en el parásito.

En otros organismos, el tratamiento con 5'-AMP promueve la fosforilación de AMPK a través de un complejo de quinasas reguladoras LKB1-STRAD-MO25 (Carling, Sanders et al. 2008), no descrito hasta ahora en tripanosomátidos. Curiosamente, en el análisis proteómico de los complejos TbAMPK se identificó una proteína que presenta una homología baja pero significativa con el dominio catalítico de LKB1 de mamíferos. El estudio de esta quinasa podría ser importante para la caracterización de la regulación de AMPK en *T. brucei*.

En la mayoría de los contextos, el crecimiento celular no es simplemente consecuencia de un aumento en la actividad del ciclo celular, sino que debe ser regulado para que la célula prolifere y se diferencie en los momentos adecuados (Jorgensen and Tyers 2004). Para compensar las fluctuaciones de ATP durante procesos como la diferenciación o crecimiento celular, AMPK regula la señalización de una amplia gama de rutas metabólicas que controlan las fluctuaciones de energía y restauran la homeostasis celular (Coppi, Pugliese et al. 2007).

Como mencionamos anteriormente, *T. brucei* controla el crecimiento excesivo dentro del hospedador mamífero mediante el desarrollo de formas quiescentes (*stumpy*). En tripanosomas, TbAMPK $\alpha$ 1 también detecta estos cambios cambiando su status de activación de manera coordinada con la proliferación celular. Sin embargo, esta activación de TbAMPK $\alpha$ 1 es reversible y no induce procesos de diferenciación o la regulación de TbTOR4, probablemente debido a la eficiencia de las fosfatasas del parásito para controlar los niveles de activación de TbAMPK $\alpha$ 1. La activación alostérica de TbAMPK $\alpha$ 1 no puede ser revertida por fosfatasas, y activa eficazmente la quinasa, induciendo el desarrollo de quiescencia.

Es importante destacar que tanto la expresión de una versión constitutivamente activa de TbAMPK (CA-HA-TbAMPK), como su activación mediante un análogo de 5'-AMP fueron capaces de regular la expresión de genes asociados a diferenciación en cepas que han perdido la capacidad de diferenciarse *in vitro*. Lo que sugiere que en tripanosomátidos TbAMPK puede regular la expresión génica como respuesta metabólica adaptativa, similar a lo que ocurre en otros organismos (Thomson, Herway et al. 2008).

Para confirmar que estos cambios en el transcriptoma respondían de forma específica a la activación TbAMPK, y no al efecto secundario del activador sobre otra proteína, se utilizó dos enfoques, uno farmacológico y otro de genética reversa. Nuestros resultados muestran que la inhibición de la función

TbAMPK por bien mediante el uso del Compuesto C o a través de la interferencia de ARN de ambas subunidades catalíticas, contrarresta significativamente los efectos del análogo en la inhibición del crecimiento. Aún más importante, la inhibición de TbAMPK invierte los cambios de los genes asociados a diferenciación, lo que sugiere que TbAMPK media esta remodelación del transcriptoma. En conjunto, estos resultados descartan un posible efecto indirecto del análogo de 5'-AMP y demuestra que TbAMPK $\alpha$ 1 es un regulador central del proceso de diferenciación de reposo.

Por último, es importante reseñar que tanto las cepas pleomórficas como monomórficas responden al uso de análogos de nucleótidos, independientemente de su capacidad de respuesta a señales de diferenciación (SIF), lo que sugiere que la regulación de 5'-AMP se sitúa por debajo del SIF dentro de esta ruta en el parásito (Mony and Matthews 2015).

La validación del Compuesto C como inhibidor farmacológico de TbAMPK mediante ensayos de fosforilación *in vitro*, permitió evaluar los efectos de la activación de TbAMPK en modelos de diferenciación murina con cepas pleomórficas. El análisis inicial de la regulación de TbAMPK durante el desarrollo permitió determinar que la activación de TbAMPK  $\alpha$ 1 ocurre en estadios tempranos de la diferenciación. Ésto se correlaciona con la ya descrita acumulación de 5'-AMP en el parásito durante la diferenciación (Graven, Tambalo et al. 2014), y con la reducción de la expresión de TbTOR4, sugiriendo una posible asociación funcional entre ambas quinasas durante la diferenciación. Esta asociación de activación-inhibición ya había sido descrita anteriormente en mamíferos, donde la activación de AMPK inhibe la ruta de señalización Akt-mTOR e induce la diferenciación de células madre mesénquimales hacia el linaje osteogénico (Pantovic, Krstic et al. 2013).

El rol central de AMPK y mTOR en la regulación del metabolismo y del crecimiento se encuentra conservado ampliamente en todos los eucariotas. Sin embargo, el estudio en otros organismos probablemente permita descubrir

nuevos roles para ambas quinasas en esta ruta de señalización. Éste parece ser el caso de los tripanosomátidos, donde a pesar de que algunas proteínas reguladoras de estas rutas se encuentran presentes en el proteoma del parásito, las proteínas que conectan ambas rutas no se encuentran en el genoma, como es el caso del complejo TSC1/TSC2, o bien no tienen interacción física con TOR4, como ocurre con Raptor (Barquilla, Saldivia et al. 2012). Ésto cobra particular importancia dado que las otras quinasas TOR descritas en el parásito parecen no estar asociadas, al menos de forma directa, a procesos de diferenciación (Barquilla and Navarro 2009, Barquilla and Navarro 2009) y los resultados expuestos en esta tesis apuntan a que la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 se encuentra relacionada de forma específica a TbTOR4.

En conjunto, esto nos llevó a proponer un nuevo modelo que explicase la interacción funcional de ambas proteínas. Uno de los acontecimientos más relevantes en la diferenciación de *T. brucei* es la activación mitocondrial con el fin de permitir el uso de prolina como fuente de ATP. Mientras que las formas proliferativas obtienen su energía metabólica casi en su totalidad desde la glucólisis, las formas *stumpy* reactivan su actividad mitocondrial, ya que la restauración de esta capacidad oxidativa es crucial para el mantenimiento de la homeostasis energética en parásito como preadaptación metabólica a la fuente de energía principal en la mosca tse-tsé (Priest and Hajduk 1994). Por ello, la mitocondria se considera un punto de control clave de la diferenciación durante el ciclo de vida de *T. brucei* (Timms, van Deursen et al. 2002).

La dependencia de la glucólisis para generar ATP, que es mucho menos eficiente que el metabolismo oxidativo, es un aspecto metabólico inusual de *T. brucei*, pero ya descrito previamente en algunas células T y células cancerosas como "efecto Warburg", donde la reactivación del metabolismo mitocondrial tiene un papel fundamental en la supervivencia de estas líneas celulares (Gogvadze, Zhivotovsky et al. 2010). En relación a esto, y como parte del desarrollo de formas *stumpy*, la reducción de los niveles de TbTOR4 es capaz de restaurar la capacidad oxidativa en cepas monomórficas (Barquilla, Saldivia

et al. 2012). Los resultados de esta tesis doctoral muestran que este evento se encuentra acompañado por la generación de especies reactivas del oxígeno y la subsecuente activación de TbAMPK $\alpha$ 1, como mecanismo de respuesta y en mantenimiento del flujo oxidativo durante el desarrollo de los parásitos.

Estos resultados cobran especial importancia considerando que este proceso ocurre en ausencia funcional de los reguladores clásicos descritos en otros organismos para la ruta de señalización AMPK-mTOR. Más importante todavía, resaltan la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 durante el establecimiento de quiescencia en *T. brucei*, en respuesta al programa de desarrollo y el mantenimiento de la infectividad, estableciendo un claro equilibrio entre la supervivencia e infectividad del parásito.

La complejidad en la inducción de la diferenciación tras la reducción de TbTOR4 y la posterior activación de TbAMPK $\alpha$ 1 ocurre en circunstancias donde la activación mitocondrial parece ser crucial para ocurra esta asociación funcional. Por una parte, la activación alostérica de TbAMPK $\alpha$ 1 conlleva la reducción de la expresión de TbTOR4 en cepas monomórficas, dentro de un entorno donde la mitocondria aún se encuentra inactiva. Esto sitúa la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 por debajo de una posible implicación mitocondrial, como respuesta posterior a la producción de ROS una vez que el parásito comienza a diferenciarse y ocurre la reactivación del metabolismo oxidativo. Por lo tanto, TbAMPK $\alpha$ 1 podría actuar como un efector directo de la diferenciación, probablemente desestabilizando a TbTOR4 como posible mecanismo de retroalimentación del proceso de quiescencia, ya que TbTOR4 activa y mantiene la proliferación en el parásito y el metabolismo glucídico. Se ha descrito en otros organismos que la fosforilación y degradación de proteínas está mediada por la activación de AMPK, lo que apoyaría esta hipótesis (Lamia, Sachdeva et al. 2009).

Por otra parte, incluso en ausencia de TbTOR4, la activación alostérica de TbAMPK $\alpha$ 1 induce la regulación de genes implicados en desarrollo de formas quiescentes (figura). Además, la reducción de TbTOR4 induce la activación

progresiva de TbAMPK $\alpha$ 1, lo que sugiere que estos dos eventos se encuentran funcionalmente conectados, y que la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 se produce en respuesta al estrés oxidativo debido a la reactivación mitocondrial tras la reducción de TbTOR4.

Numerosos estudios relacionan la desregulación de la AMPK con el desarrollo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo. En particular, la activación de esta quinasa está implicada en el aumento de la respuesta antioxidante en compensación a la degradación de las mitocondrias disfuncionales (Garrido-Maraver, Paz et al. 2015). Además, se sabe que las Tiorredoxinas pueden modular la activación de AMPK durante la privación de energía en casos de isquemia cardíaca, asociando funcionalmente el estrés oxidativo y el metabolismo nutricional (Shao, Oka et al. 2014). En este sentido, el análisis proteómico de los complejos TbAMPK mostró que las proteínas que conforman el sistema de peroxidasas de tripanotión (que incluye la tiorredoxina) se unen a los complejos AMPK en el parásito, por lo que probablemente el efecto antioxidante que observamos tras la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 sea producto de esta interacción.

En mamíferos, el principal factor desencadenante de una producción excesiva de ROS mitocondriales es consecuencia del efecto Warburg. La excesiva producción de ROS asociada a la disfunción metabólica se debe a que los mecanismos de detoxificación y protección frente a ROS se encuentran suprimidos cuando la actividad metabólica mitocondrial está inhibida, siendo la regulación mediante el eje PGC-1 $\alpha$ -FoxO3a la responsable de la corrección de la actividad mitocondrial y los sistemas de protección frente a ROS (Brunet, Bonni et al. 1999). En relación a esto, se sabe que AMPK fosforila a FoxO3a en respuesta a la privación de nutrientes, lo que promueve su actividad transcripcional sobre genes implicados en el metabolismo y resistencia al estrés, tales como el gen codificante para la tiorredoxina (Li, Song et al. 2009).

Sería interesante caracterizar los efectos de la activación de TbAMPK sobre la expresión y regulación de las proteínas involucradas en la defensa oxidativa de *T. brucei*. Por ejemplo, una de las proteínas identificadas dentro de los

complejos TbAMPK fue TbGSK3 $\beta$ . El análisis experimental de esta quinasa confirmó que, a nivel funcional esta quinasa tiene efectos similares a los descritos en otros organismos en la activación de TbAMPK $\alpha$ 1. Esto es interesante ya que se ha propuesto que en condiciones de estrés oxidativo FoxO3a actúa como regulador negativo tras la inactivación de la GSK3 $\beta$  (Hoogeboom, Essers et al. 2008, Liu and Habener 2008). Estos estudios y los obtenidos en el de esta tesis doctoral, abren un nuevo campo de investigación sobre la asociación del estrés oxidativo y la diferenciación en tripanosomatidos.

En conjunto, esta tesis doctoral responde algunos interrogantes sobre los mecanismos de diferenciación en *T. brucei*, proporcionando evidencia de una nueva ruta de señalización compuesta por un nuevo complejo mTOR, y la descripción de la primera quinasa descrita como regulador positivo dentro del proceso de diferenciación del parásito. Esta vía implica mecanismos desencadenados por la reducción TbTOR4 y la consiguiente activación de TbAMPK $\alpha$ 1 para preadaptar al parásito para la transición entre hospedadores. Los resultados de este trabajo son importantes para comprender la biología del parásito durante su desarrollo y plantea la posibilidad de utilizar ambas proteínas como dianas terapéuticas para el control de la virulencia del parásito dentro del hospedador mamífero.

## CONCLUSIONES

1.- La quinasa TbTOR4 se une a TbLST8, TbMVP-1 y TbArmtor para formar un nuevo complejo multiprotéico denominado TbTORC4.

2.- TbTOR4 regula la expresión de genes asociados a diferenciación hacia la forma *stumpy*, tanto positiva como negativamente.

3.- Compuestos análogos de 5'-AMP inducen la diferenciación en cepas incapaces naturalmente de completar dicho mecanismo, mediante la alteración de los niveles de TbTOR4. Asimismo se induce progresiva y simultáneamente la activación de la proteína TbAMPK $\alpha$ 1.

4.- Se ha caracterizado estructuralmente los complejos TbAMPK en *T. brucei* mediante espectrometría de masas y ensayos de co-inmunoprecipitación. Modificaciones en la actividad de la enzima mediante herramientas moleculares y farmacológicas regulan de manera específica la expresión de genes asociados a la diferenciación hacia formas *stumpy* de *T. brucei* en cepas monomórficas.

5.- TbAMPK $\alpha$ 1 fosforila in vitro el péptido SAMS de una manera dependiente de 5'-AMP, y su actividad puede ser inhibida específicamente mediante Compuesto C.

6.- TbAMPK $\alpha$ 1 se encuentra regulada durante la diferenciación in vivo y su inhibición con el compuesto C retrasa el proceso de diferenciación hacia forma *stumpy*.

7.- La proteína TbGSK3 $\beta$  interacciona de forma estable con la subunidad reguladora TbAMPK $\beta$ , regulando a TbAMPK $\alpha$ 1. La inhibición GSK3 $\beta$  promueve la fosforilación de TbAMPK $\alpha$ 1, induciendo cambios transcripcionales

similares a los observados tras la activación de TbAMPK $\alpha$ 1 con el análogo de 5'-AMP.

8.- TbAMPK $\alpha$ 1 se activa en respuesta al estrés oxidativo generado tras el silenciamiento de TbTOR4 y su activación mejora la respuesta oxidativa de *T. brucei*.

9.- La diferenciación en *T. brucei* puede ser inducida tras el tratamiento con 5'-AMP incluso en ausencia de TbTOR4, lo que posiciona a TbAMPK por debajo de la ruta de señalización de TbTORC4.

10.- En conjunto, esta tesis doctoral pone de manifiesto la existencia de un modelo mediante el cual la homeostasis energética y la regulación mitocondrial de *T. brucei* durante su desarrollo es llevada a cabo a través de una nueva cascada de señalización TOR4-AMPK $\alpha$ 1, fundamental en la biología para orquestar la transición entre proliferación y quiescencia del parásito.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1.- Líneas celulares y mantenimiento de *Trypanosoma brucei*

### a) Líneas celulares

La cepa sanguínea **monomórfica** (S16) de *Trypanosoma brucei brucei* (clon 221a derivado de Lister 427) fue cultivado en medio HMI-9 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las formas pleomórficas **slender** y **stumpy** AnTAT 1.1 fueron obtenidas en el cuarto y séptimo día tras la infección de ratones BALB/c respectivamente con  $1 \times 10^4$  parásitos totales. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos que contienen heparina y centrifugadas a 1000 x g durante 6 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con un buffer de separación (SB) (44 mM NaCl, 57 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) suplementado con 10 mM de glucosa. El pellet fue resuspendido en SB-glucosa y eluido en una columna cromatográfica de intercambio aniónico de dietilaminoetilcelulosa DE52 (Whatman) de carga positiva. Finalmente los tripanosomas (de carga positiva) fueron recogidos en la fracción del percolado, centrifugados nuevamente y fueron utilizados en los distintos ensayos descritos durante la tesis. Las células se mantuvieron a 37 °C durante todo el proceso.

### b) Transfección estable de sanguíneos

Los parásitos sanguíneos se recogieron a una densidad de entre  $5 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  parásitos/mL, se lavaron con Citomix a 37 °C, y se resuspendieron en el mismo tampón a  $6 \times 10^7$  parásitos/ml. Para cada transfección, se transfirieron 400 µl de la suspensión celular a una cubeta estéril junto con 10 µg de DNA plasmídico linealizado (1 µg/µl). La electroporación se hizo en modo “Square” a 1,5 KV, 25 µF y 0,2 ms (electroporador de BioRad). Las células electroporadas se diluyeron inmediatamente en 12 ml de HMI-9 a 37 °C (en su caso, con las

drogas de mantenimiento de la línea electroporada). El volumen se repartió en una placa de 24 pocillos (0,5 ml/pocillo). Pasadas 18 horas, a cada pocillo se le añadió HMI-9 suplementado con la droga de selección (además de las de mantenimiento, en su caso), de tal manera que la concentración final fuera la adecuada. A los 5 o 6 días se seleccionaban los clones positivos y se transferían a un frasco con medio fresco que contenía la droga de selección y de mantenimiento.

### **c) Congelación y descongelación de *T. brucei***

Las células se recogieron en fase exponencial ( $5-10 \times 10^5$  parásitos/mL) mediante centrifugación (1400 g, 10 minutos a 4°C). Se resuspendieron en medio de congelación (HMI-9 con 10 % (v/v) de glicerol) y se congelaron a -86°C. Para conservarlas por largos periodos se transfirieron los viales a nitrógeno líquido. Se descongelaron diluyendo el contenido del vial en medio (HMI-9) atemperado (37°C).

## 2.- Construcciones de ADN plasmídico

El número de acceso a la base de datos **GeneDB** ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) de genes de este estudio se resume en esta tabla.

	GEN ID		GEN ID
<b>TbAMPK <math>\alpha</math>1</b>	Tb927.10.5310	PAD1	Tb927.7.5930
<b>TbAMPK <math>\alpha</math>2</b>	Tb927.3.4560	PAD2	Tb927.7.5940
<b>TbAMPK <math>\beta</math></b>	Tb927.8.2450	TbTHT-1	Tb927.10.8440
<b>TbAMPK <math>\gamma</math></b>	Tb927.10.3700	TbHp-Hb	Tb927.6.440
<b>TbTOR4</b>	Tb927.1.1930	Proclina	Tb927.6.480
<b>TbMVP-1</b>	Tb927.5.4460	VSG 221	MITat 1.2/BES 1
<b>TbArmtor</b>	Tb927.4.2470	TAO	Tb927.10.7090
<b>C1</b>	Tb10.389.0540	Miosina	Tb927.11.16310
<b>ATM</b>	Tb927.2.2260	Tubulina	Tb927.1.2370

Los cebadores usados para realizar las construcciones de ARNi fueron:

GEN	CEBADORES
TbTOR4 (BamHI/XhoI)	5'- GGGGGATCCGAGTCCGTGCTACAACAA 3'- GGGGGATCCAGTTGGGGGTTAATGACC
TbArmtor	5'- CCCCAAGCTTCTCGAGTAACTGATCGGAG 3'-CGGGATCCATGGAGCTACTCAACGTGTTAC
TbAMPK $\alpha$ 1 (BamHI/XhoI)	5'- CGCGGATCCATCAAAGGGCGGAGTACCT 3'- CCGCTCGAGCTGAAGAGGGAAGTGCTTGG
TbAMPK $\alpha$ 2 (HindIII/BamHI)	5'- AGGGAAGCTTTGGTAAAGTG 3'- TGGATCCCACGTAGTATCG
TbGSK3 $\beta$ (BamHI/HindIII)	5'- TGGATCCGGTACTTAAATATTTTTCCGCA 3'- CGATAAGCTTGCTCAGCTGGGCATGTGCTCAACCTTACCGAT
<b>Doble KD TbAMPK<math>\alpha</math>1/2</b>	
TbAMPK $\alpha$ 1 (BamHI/HindIII)	5'- CGGGATCCGACAGATTTATATATTGGCTCAT 3'- CCAAGCTTCACACACTCAGTTTATTTACCG
TbAMPK $\alpha$ 2 (HindIII/XhoI)	5'- CCAAGCTTAGTGATTGCACTGGACATCG 3'- CCCTCGAGGGGGAAAAAGAAGAGGGATG

Los cebadores empleados para obtener las versiones etiquetadas de cada proteína fueron:

GEN	CEBADORES	ETIQUETA
TbTOR4 (fseI/HindIII)	5'- CCCCTCGAGTCACACGTAACCCATCAATATC 3'- GGGGGATCCAGTTGGGGGTTAATGACC	TAP
TbMVP-1 (fseI/HindIII)	5'- GGCGGATCCATGAGTGATATCATACGAATTAACGT 3'- CCGAAGCTTCTCGAGCACGGTGGCGGTGATTACCT	TAP
TbAMPK $\alpha$ 1 (BlnI/XhoI)	5'- GCTCAGCTGATGAGTCAGCGGTTTCG 3'- TCTCGAGGCGCACAAAGCACGTTTGTATT	HA
CA- TbAMPK $\alpha$ 1 (BlnI/BamHI)	5'- GCTCAGCTGATGAGTCAGCGGTTTCG 3'- GAGGGATCCTCAGCTGTTGTCGTATTTAGA	HA
TbAMPK $\beta$ (BamHI/HindIII)	5'- CGGGATCCATGGGACAACACAGCGCCAAGGA 3'- CCAAGCTTTTATTGGAGGGATGCCGTGGGTTTC	Proteína C
TbGSK3 $\beta$ (BamHI/HindIII)	5'- TGGATCCGGTACTTAAATATTTTTCCGCA 3'- CGATAAGCTTGCTCAGCTGGGCATGTGCTC AACCTTACCGAT	HA

Los productos de **PCR** fueron amplificados a partir del ADN genómico de la cepa 427 de *T. brucei* y posteriormente fueron sub-clonados en el vector pGEM®-T y cortados con las correspondientes enzimas de restricción. Finalmente fueron clonados en el plásmido p2T7 Bla para realizar los estudios de interferencia de ARN y en el plásmido pTAP1N HYG, pHA HYG o p2ProtC Bla para obtener versiones etiquetadas de cada proteína. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *BioRad* a 95 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1-4 min/ciclo (35 ciclos) usando la Taq ADN polimerasa FastStart (Roche). Los productos de PCR clonados fueron secuenciados y las secuencias de ADN resultantes comparadas con la base de datos GeneDB.

### 3.- Animales

Las formas *slender* y *stumpy* de cepas pleomórficas *AnTat 1.1* de *T. brucei* fueron aisladas de ratones Balb/C. Para la obtención de anticuerpos policlonales se utilizaron ratones Balb/C y conejos *New Zealand White* conforme a las políticas aprobadas por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del CSIC-IPBLN

### 4.- Generación de anticuerpos

#### a) Inducción, extracción y purificación de proteínas en *E. coli*

Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se usó el vector *pET28a(+)* que añade una cola de histidina al fragmento de interés. Los genes de fueron amplificados mediante PCR utilizando los siguientes cebadores:

GEN	CEBADORES
TbTOR4 (aa 1562 - 1885, 38 kDa)	5'- GGGGGATCCGAGTCCGTGCTACAACAA 3'- GGGGGATCCAGTTGGGGGTTAATGACC
TbArmtor (aa 1- 580; 64 kDa)	5'- CCCCAAGCTTCTCGAGTAACTGATCGGAG 3'-CGGGATCCATGGAGCTACTCAACGTGTTAC
TbMVP-1 (aa 1- 279; 31,6 kDa)	5'-GGCGGATCCATGAGTGATATCATACGAATTAACGT 3'- CCGAAGCTTCTCGAGCACGGTGGCGGTGATTACCT

Para la replicación de los plásmidos y posterior expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa bacteriana **KRX** (L3002, *Single Step KRX competent Cells*, Promega), derivada de *E. coli* K12. Una alícuota de 50 µl de bacterias KRX se transformó con 5 µl de la mezcla de ligación y se incubó durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos, seguido por una incubación de 2 minutos en hielo. Tras el enfriamiento, se añadió a las bacterias 450 µl de medio de cultivo **SOC** sin antibiótico y se incubaron 1 hora en agitación a 37°C.

Para producir los fragmentos recombinantes de TbTOR4, TbMVP y TbArmtor en una purificación estándar, se cultivaron 2 litros de LB (para unos 2 mg de proteína purificada) con *E. coli* KRX con el plásmido *pET28a* correspondiente para cada proteína. Cuando la Densidad óptica alcanzó 600 nm se añadió IPTG hasta 1 mM y ramnosa a 0.2 % y posteriormente se incubó 2 h a 37°C.

### **Extracción**

El cultivo de bacterias se recogió por centrifugación a 8000 g 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en Buffer de extracción (ver tabla anexa). La homogenización se llevó a cabo por sonicación (pulsos continuos de 30 segundos seguidos de 1 minuto en hielo) y con la ayuda de una prensa francesa en el caso (tres veces a 1200 psi). Se centrifugó a 12000 g 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se filtró antes de pasarlo por la columna.

### **Purificación por columna de Ni<sup>2+</sup>**

La resina de Ni<sup>2+</sup> se lavó con 10 volúmenes de agua bidestilada, se equilibró con 10 volúmenes de tampón de lisis y se incubó con el extracto 1 hora en rotación a temperatura ambiente. La mezcla se pasó a una columna vacía y, tras el drenaje, se lavó con 40 volúmenes la columna con buffer de lavado. Finalmente, se eluyó con el mismo tampón con un gradiente de imidazol. Y Las fracciones fueron analizadas en un gel de poliacrilamida mediante tinción con Coomasie.

#### **b) Inoculación en ratones y posterior obtención de anticuerpos policlonales.**

Se inocularon 50 µg de His-TbMVP-1 y His-TbArmtor en 6 ocasiones con dos semanas de diferencia de manera intraperitoneal a dos ratones Balb/c cada uno. Finalmente, se hizo una última inyección intravenosa con 35 µg de cada proteína recombinante. Se obtuvieron 400 µl de suero inmune de cada ratón por punción en la oreja.

En el caso de His-TbTOR4, se inoculó un aproximado de 500 µg de la proteína recombinante hasta 6 ocasiones con dos semanas de diferencia de manera intraperitoneal en dos conejos *New Zealand White*. Finalmente se obtuvo el suero resultante de la sangría final (20-50 ml).

## **5.- Tinción de geles**

### **Coomasie**

En una bandeja, los geles se incubaron en *Coomasie* al menos 1 h y posteriormente en solución de destinción. La solución de destinción se cambió tantas veces como fue necesario para obtener un buen contraste.

### **Sypro Ruby**

Los geles se incubaron en solución de fijación 3 h. Se desechó la solución de fijación y se añadió *Sypro Ruby* (Molecular Probes) filtrado. Se incubó 16 h con agitación, y, tras desechar el *Sypro Ruby*, se lavó con solución de destinción al menos 1 h, cambiando la solución cada hora.

## 6.- Purificación de complejos proteicos

### a) Purificación por afinidad en tándem (TAP) de TbTOR4 y TbMVP-1

La purificación de ambas proteínas se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo publicado previamente (Rigaut, Shevchenko et al. 1999) con algunas modificaciones. Brevemente, las versiones de TAP-TbTOR4 Y TAP-MVP-1 se expresaron los parásitos y su expresión se indujo mediante la adición de doxiciclina (1µg/mL) a los medios. Se recogieron un total de  $1.5 \times 10^{10}$  a una densidad de  $0,8-1,3 \times 10^7$  parásitos/ml, y se lisaron en el **Tampón A** donde el detergente NP40 (utilizado en el protocolo original) ha sido sustituido por 0,3% de CHAPS. Tras la lisis, los extractos celulares totales se centrifugaron a 16.000 g durante 20 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 micras (*Millipore*). La unión con la resina de Inmunoglobulina G (IgG) se realizó con 100 µl de resina de agarosa anclada a IgG durante 2 horas a 4 ° C en una rotación suave. La resina de IgG se lavó cuatro veces en tampón A y dos veces en tampón de escisión de la TEV. La escisión de la TEV se realizó durante la noche con 100 Unidades de la proteasa *acTEV* (*Invitrogen*), a 4 ° C en rotación suave. Después de la escisión proteolítica de la TAP-tag, los sobrenadantes fueron recuperados y utilizados para la segunda purificación por afinidad. Posteriormente, se añadió al sobrenadante 100 µL de resina de calmodulina que había sido equilibrada previamente en tampón de unión a la calmodulina. La unión a la resina de Calmodulina se llevó a cabo durante 4 horas a 4°C en rotación suave. Finalmente, las perlas se lavaron cuatro veces en tampón de lavado de calmodulina y se eluyó tampón de carga de proteínas Laemmi 2x.

Las muestras se resolvieron en un gel de SDS-PAGE y teñidas usando azul brillante de *Coomassie* y con *Sypro Ruby* para su detección mediante espectrometría de masas y por detección de huella peptídica realizadas por el servicio de proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC) de Granada y del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares respectivamente.

## **b) Ensayo de Co-inmunoprecipitación.**

La inmunoprecipitación de las versiones etiquetadas de las subunidades de AMPK se realizaron empleando 4 x10<sup>9</sup> de células cuya lisis se realizó en 2 ml de **buffer de lisis** (que contenía 40 mM HEPES [pH 7.5], 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM pirofosfatasa, 10 mM glicerofosfato, 50 mM NaF, 1% NP40 y cocktail inhibidor de proteasas a una concentración de 1x (Promega)).

El lisado fue incubado con la correspondiente resina de agarosa conjugada con el anticuerpo frente a HA, proteína C (en el caso de inmunoprecipitaciones indirectas) o proteína G unidas al anticuerpo de interés TbTOR4 o TbArmtor (en el caso de inmunoprecipitaciones directas). Ambas inmunoprecipitaciones se lavaron varias veces con buffer de lisis. A continuación se resuspendió la resina en buffer Laemmly 2x, y posteriormente las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y según sea el caso fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para posterior análisis por western blot con anticuerpos específicos, se enviaron al servicio de proteómica para su posterior identificación mediante espectrometría de masas o fueron usados para ensayos de determinación de actividad quinasa mediante ensayos de radiactividad.

## **7.- Predicción del dominio quinasa y homologías de secuencia.**

Los ortólogos de cada proteína fueron buscados en la base de datos pública NCBI y se realizaron múltiples secuencias de alineamiento usando Clustal W (Thompson et al., 1994). Los dominios se identificaron usando la base de datos de familias de proteínas *The InterPro* (Mitchell et al., 2015).

## **8.- Ensayo de resistencia a pH ácido**

La resistencia de los tripanosomas sanguíneos a condiciones ácidas fue evaluada incubando 10<sup>6</sup> células en 1ml de PBS (suplementado con glucosa (1%), leupeptina (20 mg/ml), SBF (15%)) durante 2 horas a 37 °C. El porcentaje de células resistentes a pH ácido se midió comparando el número de células vivas móviles en una solución tamponada a pH 5.5 y pH 7.4 al final del experimento, contando los parásitos en una cámara de *Neubauer*. Al menos dos muestras por hora y cada condición experimental se analizaron por dos

observadores independientes a través de cuatro experimentos independientes. Las muestras *slender* y *stumpy* fueron tratadas como control negativo y positivo respectivamente.

## **9.- Ensayo de inhibición del crecimiento del parásito**

Los tripanosomas ( $10^3$  parásitos/pocillo), se sembraron 24 h antes de la adición del inhibidor, y se cultivaron en 100  $\mu$ l de medio en una placa de 96 pocillos que contenía diluciones seriadas del *Compuesto C*. Después de 70 h de incubación, se añadieron 10  $\mu$ l por pocillo solución de *Alamar Blue* (12,5 mg resazurina en 100 ml de PBS) y después de otras 2 h de incubación, se midió la fluorescencia con un fluorímetro *Infinite F200 microplate reader* (Tecan Austria GmbH, Austria) a 550 nm de excitación y 590 nm de emisión. La concentración inhibitoria mínima (IC50) se determinó por regresión mediante la fórmula logística de cuatro parámetros mediante Sigma Plot. Cada ensayo se realizó por triplicado. Todos los productos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich®.

## **10.- Anticuerpos utilizados y Western Blotting**

Los parásitos se lavaron con un buffer de dilución de tripanosoma (TDB) suplementado con 20 mM de glucosa. Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en el mismo buffer suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa, obtenido de Promega y Roche Life Science respectivamente. Todas las muestras fueron cuantificadas mediante el ensayo enzimático colorimétrico *Bradford* (Bio-Rad), cargando 40  $\mu$ g de proteína que posteriormente se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa.

El anticuerpo p-AMPK se obtuvo de Cell Signaling technologies (Phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) (40H9) Rabbit mAb #2535). Tanto el anticuerpo monoclonal de ratón Prot-C (clon HPC4) como el anticuerpo de alta afinidad de rata anti-HA (clon 3F10) se obtuvieron de Roche Applied Science. Los anticuerpos TbTOR4, TbMVP-1, TbArmtor fueron obtenidos durante esta tesis doctoral, y otros anticuerpos como tubulina y VSG221 se generaron previamente en el laboratorio.

## 11.- Inmunofluorescencia

De manera general, las células fueron recogidas por centrifugación a 1400 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas y resuspendidas en TDB-glucosa. Posteriormente un aproximado de  $2 \times 10^5$  células se dejaron secar en los portaobjetos y se fijan durante 20 minutos con 1% de paraformaldehído (PFA), tras lavar con PBS 1X se realizó un bloqueo con 0.5% de Reactivo de bloqueo (Roche©) e incubadas con los anticuerpos correspondientes: anti-Pad1 (1:500), anti-ARN pol I (1:1000), anti-TbTOR4 (1:700), procedentes de conejo y antiTbMVP-1 (1:1000), anti-TbArmtor (1:500) procedentes de ratón, diluidos en 0.5% de reactivo de bloqueo. Se utilizaron los anticuerpos secundarios Alexa-Fluor® 594 y Alexa-Fluor® 488 (Invitrogen™). Las células se tiñeron con DAPI y fueron observadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss, de tipo *Axio Imager A1*, equipado con el sistema *AxioVision*. Las imágenes fueron montadas usando la versión 1.44 de ImageJ y Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems©).

## 12.- Ensayo de activación de AMPK

Los parásitos fueron incubados con las dosis indicadas de 8-pCPT-2'-O-Me-AMP (1  $\mu$ M) y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (10  $\mu$ M) (c078 and c041 - Biolog Life Science Institute) durante 18 horas. La densidad inicial de parásitos fue  $2 \times 10^5$  parásitos/ml. Para evitar la activación de AMPK causada por la densidad celular, las células control y tratadas fueron recogidas a la misma concentración.

## 13.- Expresión génica por PCR semicuantativa a tiempo real

El ARN total se extrajo a partir de un cultivo celular de  $5 \times 10^7$  tripanosomas de forma sanguínea o parásitos pleomórficos usando el kit *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) de acuerdo al protocolo de la casa comercial. La cantidad de ARN total se cuantificó mediante un ensayo espectrofotométrico (*NanoDrop® system*). El **ADNc** (ADN complementario) se obtuvo a partir de 2

µg de ARN usando 300 nanomolar de *random primers* en un volumen total de 25 µl con 100 unidades of SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) durante 30 minutos a 50°C.

El ensayo de PCR cuantitativa se realizó en un sistema de detección *CFX96 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories)*. Se estableció un volumen final de 10 µL de reacción que contenía 1 µL cDNA, 0.25 µmol de los cebadores *reverse* y *forward* específicos, 3 µL de agua doble destilada y 5 µL of *PerfeCta™ SYBR® Green SuperMix para iQ (Quanta Biosciences)*. Los cebadores específicos fueron diseñados a partir del genoma de la forma sanguínea. (<http://www.genedb.org/genedb/tbrucei927>).

GEN	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'
<b>C1</b>	TTGTGACGACGAGAGCAAAC	GAAGTGGTTGAACGCCAAAT
<b>ATM</b>	TCTTGGGGATCCGGGGACCGCC	GCTGCAAAGCTTCCGCCCCGAA
<b>PAD1</b>	TCATGGTTTCGCCATTCTCGTAACC	CTCAGCCACTTCTCTCTACAACAC
<b>PAD2</b>	AGGGTGATGCCAAAGAACAC	TACCCACACCGTTGAGAACA
<b>TbTHT-1</b>	TCGATTATAGCCGGGAAGTG	ATACATGGGGCAAACAGAGC
<b>TbHp-Hb</b>	AGCAGCTGCAGAGAAATGCT	CTCTCACTGCTCCCACTGAA
<b>Prociclina</b>	ATGGCACCTCGTTCCCTTTA	GAATGCGGCAACGAGACCAA
<b>VSG 221</b>	AGCTAGACGACCAACCGAAGG	CGCTGGTGCCGCTCTCCTTTG
<b>Miosina</b>	CTGCAGAACAAGCACGGCATT	ACGCTCAACAGTGGCAGTAAA

#### 14.- Determinación de la actividad quinasa de TbAMPK mediante radioactividad

Para este ensayo se utilizaron  $4 \times 10^9$  parásitos que estaban tratados o no con 10 µM de 8-pCPT-2'-O-Me-AMP durante 30 minutos. Tras la purificación de HA-AMPK $\alpha$ 1 (ver **Ensayos de coimunoprecipitación**), se determinó la actividad AMPK mediante la incorporación de P<sup>32</sup> utilizando [32P- $\gamma$ ]-ATP en el substrato consenso llamado **SAMS** (HMRSAMSGHLHLVKRR) (Abcam Biochemicals ab120182). Brevemente, el complejo HA-AMPK $\alpha$ 1 purificado se resuspendió en 40 µL de buffer de reacción 10X que contiene buffer de ensayo (HEPES 250 mM, 200 µM ATP, 2 mM AMP, 10 mM EGTA, 10 mM DTT, 50 mM

MgCL<sub>2</sub>), [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] ATP) y según sea el caso se utilizó 1  $\mu$ M de Compuesto C y 100  $\mu$ M SAMS (Abcam Biochemicals ab120843) . Las muestras se incubaron en agitación durante 30 minutos a 37 °C. La mezcla fue rápidamente centrifugada y puesta en papeles de filtro Whatman (P81), se dejan secar y se lavaron 4-5 veces con ácido fosfórico al 1%. Después del lavado final, los filtros se secaron con etanol y cuantificados en un contador de centelleo. La actividad de AMPK se calculó por la fosfotransferencia y actividad específica de ATP restando la media de las cuentas por minuto (cpm) de los controles negativos de la cpm de la media de las muestras de AMPK y dividiendo este número por la actividad específica del ATP.

### **15.- Detección cuantitativa de las especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Tras centrifugar los parásitos ( $2 \times 10^6$ ) a 1400 g se resuspendieron nuevamente en 1 ml de TDB glucosa. Posteriormente se añadió un compuesto permeable celular 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) (Life technologies C6827) a una concentración final de 2  $\mu$ M. Se incubaron las muestras a 37 °C durante 20 minutos. Finalmente, los parásitos fueron centrifugados, lavados y resuspendidos en TDB glucosa y llevados a analizar mediante citometría de flujo para analizar su expresión a una longitud de onda de 492–495 nm.

En los ensayos donde se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como inductor de estrés oxidativo, las muestras se recuperaron a 37°C durante 20 minutos y posteriormente se añadió una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich H1009) a las concentraciones indicadas durante 30 minutos. A continuación, los parásitos se centrifugaron de nuevo y analizados inmediatamente por citometría de flujo.

## 16.- Tampones y medios usados con más frecuencia.

SOLUCIÓN	CONTENIDO
<b>Medio de cultivo para tripanosomas</b>	RPMI-9 (IMDM (Sigma) 1,77 % (p/v); NaHCO <sub>3</sub> 36 mM; hipoxantina 1 mM; timidina 161 mM; cisteína 1,5 mM; bathocuproine 78 mM; piruvato sódico 1 mM; β-mercaptoetanol 2 μM. Ajustar el pH a 7,5, filtrar y añadir SBF hasta 10 % (v/v))
<b>Tampón de dilución de tripanosomas (TDB)</b>	KCl 5 mM, NaCl 80 mM, MgSO <sub>4</sub> 1 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM, glucosa 20 mM, pH 7,4. Filtrar y alicuotar en esterilidad.
<b>Citomix</b>	2 mM EGTA, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 10 mM fosfato potásico, pH 7.6, 25 mM Hepes, 5 mM MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0.5% glucosa, 100 μg/ml BSA y 1 mM hipoxantina
<b>Medio de cultivo de bacterias (LB)</b>	Triptona 1 % (p/v); extracto de levadura 0,5 % (p/v); NaCl a una concentración de 86 mM
<b>Medio de cultivo SOC</b>	Extracto de levadura 0,5 %, triptona 2 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl 2 10 mM, MgSO 4 10 mM, glucosa 20 mM
<b>Coomasie</b>	Coomasie Brilliant Blue R-250 (BioRad) 0,25 % (p/v); metanol 50 % (v/v); ácido acético 10 % (v/v).
<b>Destinción Coomasie</b>	Metanol 50 % (v/v); ácido acético 10 % (v/v).
<b>Fijación Sypro</b>	Metanol 40 % (v/v); ácido acético 7 % (v/v).
<b>Destinción Sypro</b>	Metanol 10 % (v/v); ácido acético 7 % (v/v).
<b>Tampón de extracción para proteínas recombinantes</b>	Fosfato de sodio 20mM, NaCl 0,5 M, imidazole 20 mM, DTT 1mM, PMSF 1mM, EGTA 1mM, lisozima 100 mg/ml, Lauryl Sarcosyl 1%, imidazole 10Mm)
<b>Tampón de lavado extracción proteínas recombinantes</b>	Fosfato de sodio 20mM, NaCl 0,5 M, imidazole 10 mM, Lauryl Sarcosyl 0,05%, pH 7,4 y coctel inhibidor de proteasas 1X (Roche)
<b>Tampón de lisis coinmunoprecipitación</b>	40 mM HEPES [pH 7.5], 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM pirofosfatasa, 10 mM glicerofosfato, 50 mM NaF, 1% de NP40 y coctel inhibidor de proteasas 1X (Roche)
<b>Tampón 10X ensayos radioactividad</b>	HEPES 250 mM, 200 μM ATP, 2 mM AMP, 10 mM EGTA, 10 mM DTT, 50 mM MgCL <sub>2</sub> , [γ-P <sup>32</sup> ] ATP

<b>Tampón general de extracción de proteínas</b>	TDB suplementado con 0.5 %NP40, y coctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas. (Roche)
<b>Tampón de carga de proteínas Laemlli 6X</b>	0.375 Molar de Tris pH 6.8, 12% SDS, 60% glicerol, 0.6M DTT, 0.06% azul de bromofenol
<b>Buffer de electroforesis para western blot</b>	0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 1% SDS.
<b>Buffer de transferencia para western blot</b>	25 mM Tris base, 186 mM glicina, 10-20% (v/v) metanol
<b>Tampón A</b>	40 mM HEPES [pH 7.5], 120 mM NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM pyrophosphate, 10 mM glicerofosfato, 10 mM NaF, 0.3% CHAPS, y coctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas. (Roche)
<b>Tampón de escisión de la TEV</b>	Hepes-KOH 10 mM [pH 8,0], NaCl 120 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM, CHAPS 0,3%
<b>Tampón de unión a la calmodulina</b>	Hepes-KOH 10 mM [pH 8,0], NaCl 120 mM, MgCl <sub>2</sub> 1 mM, imidazol 1 mM, CaCl <sub>2</sub> 1 mM, CHAPS 0,3%).
<b>Tampón de lavado de la calmodulina</b>	Bicarbonato de amonio 50 mM [pH 8,0], NaCl 75 mM, MgOAc 1 mM, CaCl <sub>2</sub> 1 mM

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbud, W., S. Habinowski, J. Z. Zhang, J. Kendrew, F. S. Elkairi, B. E. Kemp, L. A. Witters and F. Ismail-Beigi (2000). "Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport." *Arch Biochem Biophys* **380**(2): 347-352.
- Akcakanat, A., G. Singh, M. C. Hung and F. Meric-Bernstam (2007). "Rapamycin regulates the phosphorylation of rictor." *Biochem Biophys Res Commun* **362**(2): 330-333.
- Alessi, D. R., K. Sakamoto and J. R. Bayascas (2006). "LKB1-dependent signaling pathways." *Annu Rev Biochem* **75**: 137-163.
- Amiguet-Vercher, A., D. Perez-Morga, A. Pays, P. Poelvoorde, H. Van Xong, P. Tebabi, L. Vanhamme and E. Pays (2004). "Loss of the mono-allelic control of the VSG expression sites during the development of *Trypanosoma brucei* in the bloodstream." *Mol Microbiol* **51**(6): 1577-1588.
- Andrade, M. A. and P. Bork (1995). "HEAT repeats in the Huntington's disease protein." *Nat Genet* **11**(2): 115-116.
- Anjum, R. and J. Blenis (2008). "The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(10): 747-758.
- Aymerich, I., F. Fougelle, P. Ferre, F. J. Casado and M. Pastor-Anglada (2006). "Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK)." *J Cell Sci* **119**(Pt 8): 1612-1621.
- Baena-Gonzalez, E., F. Rolland, J. M. Thevelein and J. Sheen (2007). "A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling." *Nature* **448**(7156): 938-942.
- Banko, M. R., J. J. Allen, B. E. Schaffer, E. W. Wilker, P. Tsou, J. L. White, J. Villen, B. Wang, S. R. Kim, K. Sakamoto, S. P. Gygi, L. C. Cantley, M. B. Yaffe, K. M. Shokat and A. Brunet (2011). "Chemical genetic screen for AMPKalpha2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis." *Mol Cell* **44**(6): 878-892.
- Barnwell, E. M., F. J. van Deursen, L. Jeacock, K. A. Smith, R. M. Maizels, A. Acosta-Serrano and K. Matthews (2010). "Developmental regulation and extracellular release of a VSG expression-site-associated gene product from *Trypanosoma brucei* bloodstream forms." *J Cell Sci* **123**(Pt 19): 3401-3411.
- Barquilla, A., J. L. Crespo and M. Navarro (2008). "Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14579-14584.
- Barquilla, A. and M. Navarro (2009). "Trypanosome TOR as a major regulator of cell growth and autophagy." *Autophagy* **5**(2): 256-258.
- Barquilla, A. and M. Navarro (2009). "Trypanosome TOR complex 2 functions in cytokinesis." *Cell Cycle* **8**(5): 697-699.
- Barquilla, A., M. Saldivia, R. Diaz, J. M. Bart, I. Vidal, E. Calvo, M. N. Hall and M. Navarro (2012). "Third target of rapamycin complex negatively regulates development of quiescence in *Trypanosoma brucei*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(36): 14399-14404.
- Bateman, A. (1997). "The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein." *Trends Biochem Sci* **22**(1): 12-13.
- Bateman, J. M. and H. McNeill (2004). "Temporal control of differentiation by the insulin receptor/tor pathway in *Drosophila*." *Cell* **119**(1): 87-96.
- Batram, C., N. G. Jones, C. J. Janzen, S. M. Markert and M. Engstler (2014). "Expression site attenuation mechanistically links antigenic variation and development in *Trypanosoma brucei*." *Elife* **3**: e02324.
- Berger, W., E. Steiner, M. Grusch, L. Elbling and M. Micksche (2009). "Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity." *Cell Mol Life Sci* **66**(1): 43-61.
- Bolsoni-Lopes, A., W. T. Festuccia, P. Chimin, T. S. Farias, F. L. Torres-Leal, M. M. Cruz, P. B. Andrade, S. M. Hirabara, F. B. Lima and M. I. Alonso-Vale (2014). "Palmitoleic acid (n-7)

increases white adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation." *Lipids Health Dis* **13**: 199.

Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-868.

Carling, D. (2004). "The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control." *Trends Biochem Sci* **29**(1): 18-24.

Carling, D., M. J. Sanders and A. Woods (2008). "The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases." *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 4**: S55-59.

Carling, D., C. Thornton, A. Woods and M. J. Sanders (2012). "AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles?" *Biochem J* **445**(1): 11-27.

Castermans, D., I. Somers, J. Kriel, W. Louwet, S. Wera, M. Versele, V. Janssens and J. M. Thevelein (2012). "Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast." *Cell Res* **22**(6): 1058-1077.

Clarke, P. R. and D. G. Hardie (1990). "Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver." *EMBO J* **9**(8): 2439-2446.

Clayton, C. E. (2014). "Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **195**(2): 96-106.

Clemmens, C. S., M. T. Morris, T. A. Lyda, A. Acosta-Serrano and J. C. Morris (2009). "Trypanosoma brucei AMP-activated kinase subunit homologs influence surface molecule expression." *Exp Parasitol* **123**(3): 250-257.

Codogno, P. and A. J. Meijer (2005). "Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death." *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1509-1518.

Colombo, S. L. and S. Moncada (2009). "AMPKalpha1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells." *Biochem J* **421**(2): 163-169.

Coppi, E., A. M. Pugliese, S. Urbani, A. Melani, E. Cerbai, B. Mazzanti, A. Bosi, R. Saccardi and F. Pedata (2007). "ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **25**(7): 1840-1849.

Corton, J. M., J. G. Gillespie, S. A. Hawley and D. G. Hardie (1995). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?" *Eur J Biochem* **229**(2): 558-565.

Crozet, P., F. Jammes, B. Valot, F. Ambard-Bretteville, S. Nessler, M. Hodges, J. Vidal and M. Thomas (2010). "Cross-phosphorylation between Arabidopsis thaliana sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities." *J Biol Chem* **285**(16): 12071-12077.

Crozet, P., L. Margalha, A. Confraria, A. Rodrigues, C. Martinho, M. Adamo, C. A. Elias and E. Baena-Gonzalez (2014). "Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases." *Front Plant Sci* **5**: 190.

Chen, J., X. F. Zheng, E. J. Brown and S. L. Schreiber (1995). "Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 4947-4951.

Chen, L., Z. H. Jiao, L. S. Zheng, Y. Y. Zhang, S. T. Xie, Z. X. Wang and J. W. Wu (2009). "Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase." *Nature* **459**(7250): 1146-1149.

Chen, L., F. J. Xin, J. Wang, J. Hu, Y. Y. Zhang, S. Wan, L. S. Cao, C. Lu, P. Li, S. F. Yan, D. Neumann, U. Schlattner, B. Xia, Z. X. Wang and J. W. Wu (2013). "Conserved regulatory elements in AMPK." *Nature* **498**(7453): E8-10.

Chen, Z., X. Shen, F. Shen, W. Zhong, H. Wu, S. Liu and J. Lai (2013). "TAK1 activates AMPK-dependent cell death pathway in hydrogen peroxide-treated cardiomyocytes, inhibited by heat shock protein-70." *Mol Cell Biochem* **377**(1-2): 35-44.

Dale, S., W. A. Wilson, A. M. Edelman and D. G. Hardie (1995). "Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I." FEBS Lett **361**(2-3): 191-195.

Davies, S. P., D. Carling and D. G. Hardie (1989). "Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay." Eur J Biochem **186**(1-2): 123-128.

Davies, S. P., N. R. Helps, P. T. Cohen and D. G. Hardie (1995). "5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC." FEBS Lett **377**(3): 421-425.

de Jesus, T. C., R. R. Tonelli, S. C. Nardelli, L. da Silva Augusto, M. C. Motta, W. Girard-Dias, K. Miranda, P. Ulrich, V. Jimenez, A. Barquilla, M. Navarro, R. Docampo and S. Schenkman (2010). "Target of rapamycin (TOR)-like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate levels and acidocalcisome maintenance in *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **285**(31): 24131-24140.

de Souza, W. (2008). "An introduction to the structural organization of parasitic protozoa." Curr Pharm Des **14**(9): 822-838.

Diechtierow, M. and R. L. Krauth-Siegel (2011). "A trypanothione-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage." Free Radic Biol Med **51**(4): 856-868.

Djouder, N., R. D. Tuerk, M. Suter, P. Salvioni, R. F. Thali, R. Scholz, K. Vaahtomeri, Y. Auchli, H. Rechsteiner, R. A. Brunisholz, B. Viollet, T. P. Makela, T. Wallimann, D. Neumann and W. Krek (2010). "PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis." EMBO J **29**(2): 469-481.

Domenicali Pfister, D., G. Burkard, S. Morand, C. K. Renggli, I. Roditi and E. Vassella (2006). "A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell **5**(7): 1126-1135.

Duarte, F. V., J. A. Amorim, C. M. Palmeira and A. P. Rolo (2015). "Regulation of Mitochondrial Function and its Impact in Metabolic Stress." Curr Med Chem.

Dunlop, E. A. and A. R. Tee (2013). "The kinase triad, AMPK, mTORC1 and ULK1, maintains energy and nutrient homeostasis." Biochem Soc Trans **41**(4): 939-943.

Duran, R. V. and M. N. Hall (2012). "Regulation of TOR by small GTPases." EMBO Rep **13**(2): 121-128.

Dyer, N. A., C. Rose, N. O. Ejeh and A. Acosta-Serrano (2013). "Flying tryps: survival and maturation of trypanosomes in tsetse flies." Trends Parasitol **29**(4): 188-196.

Ehrnsperger, C. and W. Volkhardt (2001). "Major vault protein is a substrate of endogenous protein kinases in CHO and PC12 cells." Biol Chem **382**(10): 1463-1471.

Emerling, B. M., F. Weinberg, C. Snyder, Z. Burgess, G. M. Mutlu, B. Viollet, G. R. S. Budinger and N. S. Chandel (2009). "Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio." Free Radic Biol Med **46**(10): 1386-1391.

Eperon, G., M. Balasegaram, J. Potet, C. Mowbray, O. Valverde and F. Chappuis (2014). "Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis." Expert Rev Anti Infect Ther **12**(11): 1407-1417.

Fenn, K. and K. R. Matthews (2007). "The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation." Curr Opin Microbiol **10**(6): 539-546.

Fenton, T. R. and I. T. Gout (2011). "Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases." Int J Biochem Cell Biol **43**(1): 47-59.

Ferrins, L., R. Rahmani and J. B. Baell (2013). "Drug discovery and human African trypanosomiasis: a disease less neglected?" Future Med Chem **5**(15): 1801-1841.

Florent, I. C., A. Raibaud and H. Eisen (1991). "A family of genes related to a new expression site-associated gene in *Trypanosoma equiperdum*." Mol Cell Biol **11**(4): 2180-2188.

Fontana, L., L. Partridge and V. D. Longo (2010). "Extending healthy life span--from yeast to humans." Science **328**(5976): 321-326.

Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2006). "mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s." *Curr Biol* **16**(18): 1865-1870.

Fry, A. M., L. O'Regan, S. R. Sabir and R. Bayliss (2012). "Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases." *J Cell Sci* **125**(Pt 19): 4423-4433.

Fryer, L. G., A. Parbu-Patel and D. Carling (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." *J Biol Chem* **277**(28): 25226-25232.

Garley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen and X. Jiang (2009). "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy." *J Biol Chem* **284**(18): 12297-12305.

Garcia-Haro, L., M. A. Garcia-Gimeno, D. Neumann, M. Beullens, M. Bollen and P. Sanz (2010). "The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells." *FASEB J* **24**(12): 5080-5091.

Garcia-Martinez, J. M. and D. R. Alessi (2008). "mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)." *Biochem J* **416**(3): 375-385.

Garrido-Maraver, J., M. V. Paz, M. D. Cordero, J. Bautista-Lorite, M. Oropesa-Avila, M. de la Mata, A. D. Pavon, I. de Lavera, E. Alcocer-Gomez, F. Galan, P. Ybot Gonzalez, D. Cotan, S. Jackson and J. A. Sanchez-Alcazar (2015). "Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease." *Biochim Biophys Acta* **1852**(11): 2535-2553.

Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes Dev* **15**(7): 807-826.

Gleason, C. E., D. Lu, L. A. Witters, C. B. Newgard and M. J. Birnbaum (2007). "The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* **282**(14): 10341-10351.

Gogvadze, V., B. Zhivotovsky and S. Orrenius (2010). "The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells." *Mol Aspects Med* **31**(1): 60-74.

Goldenberg, S. and A. R. Avila (2011). "Aspects of Trypanosoma cruzi stage differentiation." *Adv Parasitol* **75**: 285-305.

Gong, J., Z. Sun and P. Li (2009). "CIDE proteins and metabolic disorders." *Curr Opin Lipidol* **20**(2): 121-126.

Gowans, G. J., S. A. Hawley, F. A. Ross and D. G. Hardie (2013). "AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation." *Cell Metab* **18**(4): 556-566.

Grahame Hardie, D. (2014). "AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease." *J Intern Med* **276**(6): 543-559.

Graven, P., M. Tambalo, L. Scapozza and R. Perozzo (2014). "Purine metabolite and energy charge analysis of Trypanosoma brucei cells in different growth phases using an optimized ion-pair RP-HPLC/UV for the quantification of adenine and guanine pools." *Exp Parasitol* **141**: 28-38.

Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1." *Dev Cell* **11**(6): 859-871.

Gull, K. (1999). "The cytoskeleton of trypanosomatid parasites." *Annu Rev Microbiol* **53**: 629-655.

Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander and K. Davenport (1998). "MAP kinase pathways in the yeast Saccharomyces cerevisiae." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1264-1300.

Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30**(2): 214-226.

Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch and K. Yonezawa (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." Cell **110**(2): 177-189.

Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774-785.

Hardie, D. G. and S. A. Hawley (2001). "AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited." Bioessays **23**(12): 1112-1119.

Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern." Chem Biol **19**(10): 1222-1236.

Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 251-262.

Hardie, D. G. and K. Sakamoto (2006). "AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle." Physiology (Bethesda) **21**: 48-60.

Hardie, D. G., J. W. Scott, D. A. Pan and E. R. Hudson (2003). "Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system." FEBS Lett **546**(1): 113-120.

Hawley, S. A., M. D. Fullerton, F. A. Ross, J. D. Schertzer, C. Chevtzoff, K. J. Walker, M. W. Pegg, D. Zibrova, K. A. Green, K. J. Mustard, B. E. Kemp, K. Sakamoto, G. R. Steinberg and D. G. Hardie (2012). "The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase." Science **336**(6083): 918-922.

Hawley, S. A., D. A. Pan, K. J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A. M. Edelman, B. G. Frenguelli and D. G. Hardie (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." Cell Metab **2**(1): 9-19.

Hawley, S. A., F. A. Ross, C. Chevtzoff, K. A. Green, A. Evans, S. Fogarty, M. C. Towler, L. J. Brown, O. A. Ogunbayo, A. M. Evans and D. G. Hardie (2010). "Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation." Cell Metab **11**(6): 554-565.

Hedbacker, K. and M. Carlson (2008). "SNF1/AMPK pathways in yeast." Front Biosci **13**: 2408-2420.

Heitman, J., N. R. Movva and M. N. Hall (1991). "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast." Science **253**(5022): 905-909.

Hong, S. M., C. W. Park, H. J. Cha, J. H. Kwon, Y. S. Yun, N. G. Lee, D. G. Kim, H. G. Nam and K. Y. Choi (2013). "Rapamycin inhibits both motility through down-regulation of p-STAT3 (S727) by disrupting the mTORC2 assembly and peritoneal dissemination in sarcomatoid cholangiocarcinoma." Clin Exp Metastasis **30**(2): 177-187.

Hoogetboom, D., M. A. Essers, P. E. Polderman, E. Voets, L. M. Smits and B. M. Burgering (2008). "Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity." J Biol Chem **283**(14): 9224-9230.

Horman, S., D. Vertommen, R. Heath, D. Neumann, V. Mouton, A. Woods, U. Schlattner, T. Wallimann, D. Carling, L. Hue and M. H. Rider (2006). "Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491." J Biol Chem **281**(9): 5335-5340.

Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro and N. Mizushima (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20**(7): 1981-1991.

Huang, G., A. E. Vercesi and R. Docampo (2013). "Essential regulation of cell bioenergetics in *Trypanosoma brucei* by the mitochondrial calcium uniporter." Nat Commun **4**: 2865.

Huffman, T. A., I. Mothe-Satney and J. C. Lawrence, Jr. (2002). "Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 1047-1052.

Hughes, A. L. (1994). "The evolution of functionally novel proteins after gene duplication." Proc Biol Sci **256**(1346): 119-124.

Hurley, R. L., K. A. Anderson, J. M. Franzone, B. E. Kemp, A. R. Means and L. A. Witters (2005). "The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases." J Biol Chem **280**(32): 29060-29066.

Imamura, K., T. Ogura, A. Kishimoto, M. Kaminishi and H. Esumi (2001). "Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line." Biochem Biophys Res Commun **287**(2): 562-567.

Itani, S. I., A. K. Saha, T. G. Kurowski, H. R. Coffin, K. Tornheim and N. B. Ruderman (2003). "Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase." Diabetes **52**(7): 1635-1640.

Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." Nat Cell Biol **6**(11): 1122-1128.

Jenne, D. E., H. Reimann, J. Nezu, W. Friedel, S. Loff, R. Jeschke, O. Muller, W. Back and M. Zimmer (1998). "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase." Nat Genet **18**(1): 38-43.

Jensen, B. C., D. Sivam, C. T. Kifer, P. J. Myler and M. Parsons (2009). "Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*." BMC Genomics **10**: 482.

Jones, N. G., E. B. Thomas, E. Brown, N. J. Dickens, T. C. Hammarton and J. C. Mottram (2014). "Regulators of *Trypanosoma brucei* cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen." PLoS Pathog **10**(1): e1003886.

Jones, R. G., D. R. Plas, S. Kubek, M. Buzzai, J. Mu, Y. Xu, M. J. Birnbaum and C. B. Thompson (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." Mol Cell **18**(3): 283-293.

Jorgensen, P. and M. Tyers (2004). "How cells coordinate growth and division." Curr Biol **14**(23): R1014-1027.

Jung, C. H., S. H. Ro, J. Cao, N. M. Otto and D. H. Kim (2010). "mTOR regulation of autophagy." FEBS Lett **584**(7): 1287-1295.

Kabani, S., K. Fenn, A. Ross, A. Ivens, T. K. Smith, P. Ghazal and K. Matthews (2009). "Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*." BMC Genomics **10**: 427.

Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling and D. G. Hardie (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." Cell Metab **1**(1): 15-25.

Kaizuka, T., T. Hara, N. Oshiro, U. Kikkawa, K. Yonezawa, K. Takehana, S. Iemura, T. Natsume and N. Mizushima (2010). "Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly." J Biol Chem **285**(26): 20109-20116.

Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng and Z. J. Chen (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." Mol Cell **15**(4): 535-548.

Kelly, M., M. S. Gauthier, A. K. Saha and N. B. Ruderman (2009). "Activation of AMP-activated protein kinase by interleukin-6 in rat skeletal muscle: association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization." Diabetes **58**(9): 1953-1960.

Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2003). "GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive

pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR." Mol Cell **11**(4): 895-904.

Kim, J., M. Kundu, B. Viollet and K. L. Guan (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." Nat Cell Biol **13**(2): 132-141.

Kim, J. E. and J. Chen (2004). "regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis." Diabetes **53**(11): 2748-2756.

Kim, J. W., Y. H. You, D. S. Ham, H. K. Yang and K. H. Yoon (2015). "The Paradoxical Effects of AMPK on Insulin Gene Expression and Glucose-Induced Insulin Secretion." J Cell Biochem.

Kobilka, B. K. (2007). "G protein coupled receptor structure and activation." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 794-807.

Kola, B., M. Boscaro, G. A. Rutter, A. B. Grossman and M. Korbonits (2006). "Expanding role of AMPK in endocrinology." Trends Endocrinol Metab **17**(5): 205-215.

Kolev, N. G., K. Ramey-Butler, G. A. Cross, E. Ullu and C. Tschudi (2012). "Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein." Science **338**(6112): 1352-1353.

Kolev, N. G., E. Ullu and C. Tschudi (2014). "The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*." Cell Microbiol **16**(4): 482-489.

Kolli, S., C. I. Zito, M. H. Mossink, E. A. Wiemer and A. M. Bennett (2004). "The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling." J Biol Chem **279**(28): 29374-29385.

Konstantinova, I. M., A. S. Tsimokha and A. G. Mittenberg (2008). "Role of proteasomes in cellular regulation." Int Rev Cell Mol Biol **267**: 59-124.

Kovacic, S., C. L. Soltys, A. J. Barr, I. Shiojima, K. Walsh and J. R. Dyck (2003). "Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart." J Biol Chem **278**(41): 39422-39427.

Krauth-Siegel, R. L. and M. A. Comini (2008). "Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism." Biochim Biophys Acta **1780**(11): 1236-1248.

Krawiec, B. J., G. J. Nystrom, R. A. Frost, L. S. Jefferson and C. H. Lang (2007). "AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(6): E1555-1567.

Kunz, J., U. Schneider, I. Howald, A. Schmidt and M. N. Hall (2000). "HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast." J Biol Chem **275**(47): 37011-37020.

Lamia, K. A., U. M. Sachdeva, L. DiTacchio, E. C. Williams, J. G. Alvarez, D. F. Egan, D. S. Vasquez, H. Juguilon, S. Panda, R. J. Shaw, C. B. Thompson and R. M. Evans (2009). "AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation." Science **326**(5951): 437-440.

Landree, L. E., A. L. Hanlon, D. W. Strong, G. Rumbaugh, I. M. Miller, J. N. Thupari, E. C. Connolly, R. L. Haganir, C. Richardson, L. A. Witters, F. P. Kuhajda and G. V. Ronnett (2004). "C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism." J Biol Chem **279**(5): 3817-3827.

Lantier, L., J. Fentz, R. Mounier, J. Leclerc, J. T. Treebak, C. Pehmoller, N. Sanz, I. Sakakibara, E. Saint-Amand, S. Rimbaud, P. Maire, A. Marette, R. Ventura-Clapier, A. Ferry, J. F. Wojtaszewski, M. Foretz and B. Viollet (2014). "AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity." FASEB J **28**(7): 3211-3224.

Laplante, M. and D. M. Sabatini (2009). "mTOR signaling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 20): 3589-3594.

Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.

Laxman, S., A. Riechers, M. Sadilek, F. Schwede and J. A. Beavo (2006). "Hydrolysis products of cAMP analogs cause transformation of *Trypanosoma brucei* from slender to stumpy-like forms." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19194-19199.

Lee, P., S. M. Paik, C. S. Shin, W. K. Huh and J. S. Hahn (2011). "Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding." Mol Microbiol **79**(3): 633-646.

Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." Cell **132**(1): 27-42.

Li, X. N., J. Song, L. Zhang, S. A. LeMaire, X. Hou, C. Zhang, J. S. Coselli, L. Chen, X. L. Wang, Y. Zhang and Y. H. Shen (2009). "Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin." Diabetes **58**(10): 2246-2257.

Liang, J., S. H. Shao, Z. X. Xu, B. Hennessy, Z. Ding, M. Larrea, S. Kondo, D. J. Dumont, J. U. Gutterman, C. L. Walker, J. M. Slingerland and G. B. Mills (2007). "The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis." Nat Cell Biol **9**(2): 218-224.

Liu, Z. and J. F. Habener (2008). "Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation." J Biol Chem **283**(13): 8723-8735.

Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell **10**(3): 457-468.

Loffler, A. S., S. Alers, A. M. Dieterle, H. Keppeler, M. Franz-Wachtel, M. Kundu, D. G. Campbell, S. Wesselborg, D. R. Alessi and B. Stork (2011). "Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop." Autophagy **7**(7): 696-706.

Long, Y. C. and J. R. Zierath (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." J Clin Invest **116**(7): 1776-1783.

Lynch, M. and J. S. Conery (2000). "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes." Science **290**(5494): 1151-1155.

Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and P. P. Pandolfi (2005). "Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis." Cell **121**(2): 179-193.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

Madeira da Silva, L. and S. M. Beverley (2010). "Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 11965-11970.

Mancini, P. E. and C. L. Patton (1981). "Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei brucei* in the rat." Mol Biochem Parasitol **3**(1): 19-31.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2003). "Rheb fills a GAP between TSC and TOR." Trends Biochem Sci **28**(11): 573-576.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan and I. Grummt (2004). "mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability." Genes Dev **18**(4): 423-434.

McBride, A., S. Ghilagaber, A. Nikolaev and D. G. Hardie (2009). "The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor." Cell Metab **9**(1): 23-34.

McCartney, R. R. and M. C. Schmidt (2001). "Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit." J Biol Chem **276**(39): 36460-36466.

Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman and V. Hannaert (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-1477.

Momcilovic, M., S. P. Hong and M. Carlson (2006). "Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro." J Biol Chem **281**(35): 25336-25343.

Mony, B. M., P. MacGregor, A. Ivens, F. Rojas, A. Cowton, J. Young, D. Horn and K. Matthews (2014). "Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*." Nature **505**(7485): 681-685.

Mony, B. M. and K. R. Matthews (2015). "Assembling the components of the quorum sensing pathway in African trypanosomes." Mol Microbiol **96**(2): 220-232.

Moreno, D., R. Viana and P. Sanz (2009). "Two-hybrid analysis identifies PSMD11, a non-ATPase subunit of the proteasome, as a novel interaction partner of AMP-activated protein kinase." Int J Biochem Cell Biol **41**(12): 2431-2439.

Motta, M. C. (2008). "Kinetoplast as a potential chemotherapeutic target of trypanosomatids." Curr Pharm Des **14**(9): 847-854.

Navarro, M. and K. Gull (2001). "A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*." Nature **414**(6865): 759-763.

Nolan, D. P., S. Rolin, J. R. Rodriguez, J. Van Den Abbeele and E. Pays (2000). "Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress." Eur J Biochem **267**(1): 18-27.

Nunes, C., L. F. Primavesi, M. K. Patel, E. Martinez-Barajas, S. J. Powers, R. Sagar, P. S. Fevereiro, B. G. Davis and M. J. Paul (2013). "Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate." Plant Physiol Biochem **63**: 89-98.

Oakhill, J. S., J. W. Scott and B. E. Kemp (2012). "AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase." Trends Endocrinol Metab **23**(3): 125-132.

Oberholzer, M., G. Marti, M. Baresic, S. Kunz, A. Hemphill and T. Seebeck (2007). "The *Trypanosoma brucei* cAMP phosphodiesterases TbrPDEB1 and TbrPDEB2: flagellar enzymes that are essential for parasite virulence." FASEB J **21**(3): 720-731.

OMS (2014). "La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño). Nota descriptiva N° 259."

Owen, M. R., E. Doran and A. P. Halestrap (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-614.

Pan, Y. and G. S. Shadel (2009). "Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density." Aging (Albany NY) **1**(1): 131-145.

Pang, T., B. Xiong, J. Y. Li, B. Y. Qiu, G. Z. Jin, J. K. Shen and J. Li (2007). "Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits." J Biol Chem **282**(1): 495-506.

Pantovic, A., A. Krstic, K. Janjetovic, J. Kocic, L. Harhaji-Trajkovic, D. Bugarski and V. Trajkovic (2013). "Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." Bone **52**(1): 524-531.

Parsons, M., E. A. Worthey, P. N. Ward and J. C. Mottram (2005). "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*." BMC Genomics **6**: 127.

Pays, E. (2005). "Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*." Trends Parasitol **21**(11): 517-520.

Pays, E., S. Lips, D. Nolan, L. Vanhamme and D. Perez-Morga (2001). "The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts." Mol Biochem Parasitol **114**(1): 1-16.

Pearce, L. R., X. Huang, J. Boudeau, R. Pawlowski, S. Wullschleger, M. Deak, A. F. Ibrahim, R. Gourlay, M. A. Magnuson and D. R. Alessi (2007). "Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2." Biochem J **405**(3): 513-522.

Pearce, L. R., E. M. Sommer, K. Sakamoto, S. Wullschleger and D. R. Alessi (2011). "Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney." Biochem J **436**(1): 169-179.

Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leever, J. R. Griffiths, Y. L. Chung and A. Schulze (2008). "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth." Cell Metab **8**(3): 224-236.

Priest, J. W. and S. L. Hajduk (1994). "Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*." J Bioenerg Biomembr **26**(2): 179-191.

Queiroz, R., C. Benz, K. Fellenberg, J. D. Hoheisel and C. Clayton (2009). "Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons." BMC Genomics **10**: 495.

Ramanathan, A. and S. L. Schreiber (2009). "Direct control of mitochondrial function by mTOR." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22229-22232.

Raught, B., A. C. Gingras and N. Sonenberg (2001). "The target of rapamycin (TOR) proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7037-7044.

Ravnskjaer, K., M. Boergesen, L. T. Dalgaard and S. Mandrup (2006). "Glucose-induced repression of PPARalpha gene expression in pancreatic beta-cells involves PP2A activation and AMPK inactivation." J Mol Endocrinol **36**(2): 289-299.

Rencurel, F., A. Stenhouse, S. A. Hawley, T. Friedberg, D. G. Hardie, C. Sutherland and C. R. Wolf (2005). "AMP-activated protein kinase mediates phenobarbital induction of CYP2B gene expression in hepatocytes and a newly derived human hepatoma cell line." J Biol Chem **280**(6): 4367-4373.

Reuner, B., E. Vassella, B. Yutzy and M. Boshart (1997). "Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture." Mol Biochem Parasitol **90**(1): 269-280.

Rico, E., F. Rojas, B. M. Mony, B. Szoor, P. Macgregor and K. R. Matthews (2013). "Bloodstream form pre-adaptation to the tsetse fly in *Trypanosoma brucei*." Front Cell Infect Microbiol **3**: 78.

Richter, E. A. and N. B. Ruderman (2009). "AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease." Biochem J **418**(2): 261-275.

Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann and B. Seraphin (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." Nat Biotechnol **17**(10): 1030-1032.

Rodrigues, A., M. Adamo, P. Crozet, L. Margalha, A. Confraria, C. Martinho, A. Elias, A. Rabissi, V. Lumberras, M. Gonzalez-Guzman, R. Antoni, P. L. Rodriguez and E. Baena-Gonzalez (2013). "ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*." Plant Cell **25**(10): 3871-3884.

Rosner, M. and M. Hengstschlager (2008). "Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1." Hum Mol Genet **17**(19): 2934-2948.

Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi and J. Blenis (2004). "Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13489-13494.

Rubenstein, E. M., R. R. McCartney, C. Zhang, K. M. Shokat, M. K. Shirra, K. M. Arndt and M. C. Schmidt (2008). "Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase." J Biol Chem **283**(1): 222-230.

Ruderman, N. B., C. Keller, A. M. Richard, A. K. Saha, Z. Luo, X. Xiang, M. Giral, V. B. Ritov, E. V. Menshikova, D. E. Kelley, J. Hidalgo, B. K. Pedersen and M. Kelly (2006). "Interleukin-6

regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome." *Diabetes* **55 Suppl 2**: S48-54.

Ruiz, A., X. Xu and M. Carlson (2011). "Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(16): 6349-6354.

Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst and S. H. Snyder (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." *Cell* **78**(1): 35-43.

Sabers, C. J., M. M. Martin, G. J. Brunn, J. M. Williams, F. J. Dumont, G. Wiederrecht and R. T. Abraham (1995). "Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells." *J Biol Chem* **270**(2): 815-822.

Saldivia, M., A. Barquilla, J. M. Bart, R. Diaz-Gonzalez, M. N. Hall and M. Navarro (2013). "Target of rapamycin (TOR) kinase in *Trypanosoma brucei*: an extended family." *Biochem Soc Trans* **41**(4): 934-938.

Salt, I., J. W. Celler, S. A. Hawley, A. Prescott, A. Woods, D. Carling and D. G. Hardie (1998). "AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform." *Biochem J* **334 ( Pt 1)**: 177-187.

Sanders, M. J., P. O. Grondin, B. D. Hegarty, M. A. Snowden and D. Carling (2007). "Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade." *Biochem J* **403**(1): 139-148.

Sanz, P. (2008). "AMP-activated protein kinase: structure and regulation." *Curr Protein Pept Sci* **9**(5): 478-492.

Sanz, P., T. Rubio and M. A. Garcia-Gimeno (2013). "AMPKbeta subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex." *FEBS J* **280**(16): 3723-3733.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." *Curr Biol* **14**(14): 1296-1302.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard and D. M. Sabatini (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." *Mol Cell* **22**(2): 159-168.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-1101.

Scott, J. W., S. A. Hawley, K. A. Green, M. Anis, G. Stewart, G. A. Scullion, D. G. Norman and D. G. Hardie (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." *J Clin Invest* **113**(2): 274-284.

Scott, J. W., B. J. van Denderen, S. B. Jorgensen, J. E. Honeyman, G. R. Steinberg, J. S. Oakhill, T. J. Iseli, A. Koay, P. R. Gooley, D. Stapleton and B. E. Kemp (2008). "Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes." *Chem Biol* **15**(11): 1220-1230.

Schieke, S. M., D. Phillips, J. P. McCoy, Jr., A. M. Aponte, R. F. Shen, R. S. Balaban and T. Finkel (2006). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity." *J Biol Chem* **281**(37): 27643-27652.

Schimmack, G., R. A. Defronzo and N. Musi (2006). "AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications." *Diabetes Obes Metab* **8**(6): 591-602.

Shao, D., S. Oka, T. Liu, P. Zhai, T. Ago, S. Sciarretta, H. Li and J. Sadoshima (2014). "A redox-dependent mechanism for regulation of AMPK activation by Thioredoxin1 during energy starvation." *Cell Metab* **19**(2): 232-245.

Shapiro, S. Z., J. Naessens, B. Liesegang, S. K. Moloo and J. Magondu (1984). "Analysis by flow cytometry of DNA synthesis during the life cycle of African trypanosomes." *Acta Trop* **41**(4): 313-323.

Sharma, R., E. Gluenz, L. Peacock, W. Gibson, K. Gull and M. Carrington (2009). "The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly." Trends Parasitol **25**(11): 517-524.

Shaw, R. J. (2009). "LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth." Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 65-80.

Shaw, R. J., N. Bardeesy, B. D. Manning, L. Lopez, M. Kosmatka, R. A. DePinho and L. C. Cantley (2004). "The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling." Cancer Cell **6**(1): 91-99.

Shertz, C. A., R. J. Bastidas, W. Li, J. Heitman and M. E. Cardenas (2010). "Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom." BMC Genomics **11**: 510.

Siegel, T. N., K. Gunasekera, G. A. Cross and T. Ochsenreiter (2011). "Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing." Trends Parasitol **27**(10): 434-441.

Siegel, T. N., D. R. Hekstra, X. Wang, S. Dewell and G. A. Cross (2010). "Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites." Nucleic Acids Res **38**(15): 4946-4957.

Sim, A. T. and D. G. Hardie (1988). "The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **233**(2): 294-298.

Soliman, G. A. (2011). "The integral role of mTOR in lipid metabolism." Cell Cycle **10**(6): 861-862.

Soulard, A., A. Cohen and M. N. Hall (2009). "TOR signaling in invertebrates." Curr Opin Cell Biol **21**(6): 825-836.

Stein, S. C., A. Woods, N. A. Jones, M. D. Davison and D. Carling (2000). "The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation." Biochem J **345 Pt 3**: 437-443.

Steinberg, G. R. and B. E. Kemp (2009). "AMPK in Health and Disease." Physiol Rev **89**(3): 1025-1078.

Suter, M., U. Riek, R. Tuerk, U. Schlattner, T. Wallimann and D. Neumann (2006). "Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **281**(43): 32207-32216.

Suzuki, T., D. Bridges, D. Nakada, G. Skiniotis, S. J. Morrison, J. D. Lin, A. R. Saltiel and K. Inoki (2013). "Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3." Mol Cell **50**(3): 407-419.

Szoor, B., I. Ruberto, R. Burchmore and K. R. Matthews (2010). "A novel phosphatase cascade regulates differentiation in *Trypanosoma brucei* via a glycosomal signaling pathway." Genes Dev **24**(12): 1306-1316.

Szoor, B., J. Wilson, H. McElhinney, L. Taberner and K. R. Matthews (2006). "Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes." J Cell Biol **175**(2): 293-303.

Tetaud, E., C. Giroud, A. R. Prescott, D. W. Parkin, D. Baltz, N. Biteau, T. Baltz and A. H. Fairlamb (2001). "Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **116**(2): 171-183.

Thomson, D. M., S. T. Herway, N. Fillmore, H. Kim, J. D. Brown, J. R. Barrow and W. W. Winder (2008). "AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family." J Appl Physiol (1985) **104**(2): 429-438.

Thornton, C., M. A. Snowden and D. Carling (1998). "Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle." J Biol Chem **273**(20): 12443-12450.

Timms, M. W., F. J. van Deursen, E. F. Hendriks and K. R. Matthews (2002). "Mitochondrial development during life cycle differentiation of African trypanosomes: evidence for a kinetoplast-dependent differentiation control point." Mol Biol Cell **13**(10): 3747-3759.

Towler, M. C. and D. G. Hardie (2007). "AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling." *Circ Res* **100**(3): 328-341.

Turner, C. M. (1990). "The use of experimental artefacts in African trypanosome research." *Parasitol Today* **6**(1): 14-17.

Tyson, J. J., K. C. Chen and B. Novak (2003). "Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 221-231.

Urano, J., M. J. Comiso, L. Guo, P. J. Aspuria, R. Deniskin, A. P. Tabancay, Jr., J. Kato-Stankiewicz and F. Tamanoi (2005). "Identification of novel single amino acid changes that result in hyperactivation of the unique GTPase, Rheb, in fission yeast." *Mol Microbiol* **58**(4): 1074-1086.

van Dam, T. J., F. J. Zwartkruis, J. L. Bos and B. Snel (2011). "Evolution of the TOR pathway." *J Mol Evol* **73**(3-4): 209-220.

Vander Haar, E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D. H. Kim (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." *Nat Cell Biol* **9**(3): 316-323.

Vanderheyden, N., J. Wong and R. Docampo (2000). "A pyruvate-proton symport and an H<sup>+</sup>-ATPase regulate the intracellular pH of *Trypanosoma brucei* at different stages of its life cycle." *Biochem J* **346 Pt 1**: 53-62.

Vassella, E., R. Kramer, C. M. Turner, M. Wankell, C. Modes, M. van den Bogaard and M. Boshart (2001). "Deletion of a novel protein kinase with PX and FYVE-related domains increases the rate of differentiation of *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* **41**(1): 33-46.

Vassella, E., B. Reuner, B. Yutzy and M. Boshart (1997). "Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway." *J Cell Sci* **110 ( Pt 21)**: 2661-2671.

Vonlaufen, N., S. M. Kanzok, R. C. Wek and W. J. Sullivan, Jr. (2008). "Stress response pathways in protozoan parasites." *Cell Microbiol* **10**(12): 2387-2399.

Wedaman, K. P., A. Reinke, S. Anderson, J. Yates, 3rd, J. M. McCaffery and T. Powers (2003). "Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **14**(3): 1204-1220.

Wilson, W. A., S. A. Hawley and D. G. Hardie (1996). "Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio." *Curr Biol* **6**(11): 1426-1434.

Witczak, C. A., C. G. Sharoff and L. J. Goodyear (2008). "AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism." *Cell Mol Life Sci* **65**(23): 3737-3755.

Wiza, C., E. B. Nascimento and D. M. Ouwens (2012). "Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**(12): E1453-1460.

Woods, A., D. Azzout-Marniche, M. Foretz, S. C. Stein, P. Lemarchand, P. Ferre, F. Foufelle and D. Carling (2000). "Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6704-6711.

Woods, A., K. Dickerson, R. Heath, S. P. Hong, M. Momcilovic, S. R. Johnstone, M. Carlson and D. Carling (2005). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab* **2**(1): 21-33.

Wu, S. H., J. F. Bi, T. Cloughesy, W. K. Cavenee and P. S. Mischel (2014). "Emerging function of mTORC2 as a core regulator in glioblastoma: metabolic reprogramming and drug resistance." *Cancer Biol Med* **11**(4): 255-263.

Xi, X., J. Han and J. Z. Zhang (2001). "Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* **276**(44): 41029-41034.

Xiao, B., M. J. Sanders, E. Underwood, R. Heath, F. V. Mayer, D. Carmena, C. Jing, P. A. Walker, J. F. Eccleston, L. F. Haire, P. Saiu, S. A. Howell, R. Aasland, S. R. Martin, D. Carling and S. J. Gamblin (2011). "Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP." *Nature* **472**(7342): 230-233.

Xie, M., D. Zhang, J. R. Dyck, Y. Li, H. Zhang, M. Morishima, D. L. Mann, G. E. Taffet, A. Baldini, D. S. Khoury and M. D. Schneider (2006). "A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17378-17383.

Yang, Q., K. Inoki, T. Ikenoue and K. L. Guan (2006). "Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity." Genes Dev **20**(20): 2820-2832.

Zhang, H. R., J. M. Chen, Z. Y. Zeng and W. Z. Que (2013). "Knockdown of DEPTOR inhibits cell proliferation and increases chemosensitivity to melphalan in human multiple myeloma RPMI-8226 cells via inhibiting PI3K/AKT activity." J Int Med Res **41**(3): 584-595.

Zhang, Y., Y. Wang, C. Bao, Y. Xu, H. Shen, J. Chen, J. Yan and Y. Chen (2012). "Metformin interacts with AMPK through binding to gamma subunit." Mol Cell Biochem **368**(1-2): 69-76.

Zhao, Y., X. Xiong and Y. Sun (2011). "DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy." Mol Cell **44**(2): 304-316.

Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and D. E. Moller (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-1174.

Zmijewski, J. W., S. Banerjee, H. Bae, A. Friggeri, E. R. Lazarowski and E. Abraham (2010). "Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **285**(43): 33154-33164.

Zungu, M., J. C. Schisler, M. F. Essop, C. McCudden, C. Patterson and M. S. Willis (2011). "Regulation of AMPK by the ubiquitin proteasome system." Am J Pathol **178**(1): 4-11.