



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL O BIOMEDICINA

Estudio celular y molecular de profilina en *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Juan Felipe Osorio Méndez

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. Ana María Cevallos Gaos
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Nuria Sánchez Puig
Instituto de Química, UNAM
Dr. Juan Miranda Ríos
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, Ciudad de México AGOSTO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL O BIOMEDICINA

Estudio celular y molecular de profilina en *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Juan Felipe Osorio Méndez

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. Ana María Cevallos Gaos
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Nuria Sánchez Puig
Instituto de Química, UNAM
Dr. Juan Miranda Ríos
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, Ciudad de México AGOSTO, 2017.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de mayo del 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **OSORIO MENDEZ JUAN FELIPE** con número de cuenta **511451366** con la tesis titulada "**Estudio celular y molecular de profilina en *Trypanosoma cruzi***", realizada bajo la dirección de la Dra. Ana María Cevallos Gaos:

Presidente: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJIA
Vocal: DR. JAVIER AMBROSIO HERNÁNDEZ
Secretario: DRA. NURIA SÁNCHEZ PUIG
Suplente: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ
Suplente: DRA. PATRICIA TALAMÁS ROHANA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de junio del 2017.


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.
- Al Conacyt por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado (Número de becario: 245674) y por la financiación recibida a través del donativo 239715.
- Especialmente, a mi comité tutorial por su valiosa guía durante estos años:

Dra. Ana María Cevallos Gaos (Tutora principal)

Dra. Nuria Sánchez Puig

Dr. Juan Miranda Ríos

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

- Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández Fernández, en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Agradezco el apoyo brindado para el éxito del proyecto.
- Un agradecimiento especial a mi tutora, la Dra. Ana María Cevallos, por sus enseñanzas, apoyo y paciencia en estos años. Gracias por su tiempo, confianza y, sobretodo, por ser una gran persona.
- A mis sinodales por la lectura crítica y detallada de mi tesis. Sus comentarios y preguntas contribuyeron enormemente a mejorarla.
- A los profesores y tutores que durante mi formación fueron y serán un ejemplo de dedicación, profesionalismo y ética: Dra. Ana María Cevallos, Dr. Roberto Hernández, Dra. Nuria Sánchez, Dr. Juan Miranda, Dr. Santiago Martínez, Dr. Javier Ambrosio, Dra. Imelda López, Dr. René Cerritos, Dra. Yalbi Balderas.
- A la M. en C. Juliana Herrera por el apoyo técnico general.
- A la Dra. Silvia Ivonne Mora por su apoyo técnico en procedimientos de análisis de proteínas.
- Al Dr. Miguel Tapia por su apoyo en microscopía confocal.
- A la Dra. Rebecca Manning por los estadios de mamífero de *T. cruzi*. Claudia Márquez Dueñas realizó las infecciones para obtener estas células.
- A los integrantes de mi laboratorio. De manera especial a Andrea y Ernesto por todo lo que aprendimos juntos.
- Al laboratorio de la Dra. Imelda Lopez Villaseñor por valiosos aportes.
- A Linnette por todo su cariño.
- A mi familia en México: Amanda, Andrea, Carlota, Claudia, Ernesto, Ester, Gerardo, Mari, Panty, Tomas y Yuko.
- A todos mis amigos en Colombia.
- A mi familia por su apoyo incondicional. De manera especial a mi padre, hermana y sobrinos.

***Dedicado a mi abuela y familia materna.
Gracias por toda una vida de amor y enseñanzas.***

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CITOESQUELETO EUCARIONTE	2
1.2. CITOESQUELETO DE ACTINA	3
1.2.1. Estructura 3D de la actina	3
1.2.2. Polimerización <i>in vitro</i> de la actina	3
1.2.3. Proteínas de unión a actina	5
1.2.3.1. <i>Proteínas de unión a actina G y de corte</i>	7
1.2.3.2. <i>Nucleadores y elongadores de la actina</i>	8
1.2.3.3. <i>Proteínas de unión a microfilamentos</i>	9
1.3. PROFILINA: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN	10
1.3.1. Estructura de la profilina	10
1.3.2. Regulación de la polimerización de la actina por la profilina	10
1.3.3. Regulación de la profilina	12
1.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN EL CITOESQUELETO DE ACTINA	13
1.5. <i>Trypanosoma cruzi</i> : GENERALIDADES Y CITOESQUELETO	14
1.5.1. Estructura celular y ciclo de vida	14
1.5.2. Ultraestructura de <i>T. cruzi</i>	16
1.5.3. Citoesqueleto de <i>T. cruzi</i> desde el genoma	16
1.5.3.1. <i>Familia de actinas en T. cruzi</i>	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.2.1. Estrategia experimental	21
4.2.2. Análisis de secuencias de aminoácidos	21
4.2.3. Crecimiento de parásitos	22
4.2.4. Inmunodetección por Western blot	22
4.2.5. Inmunodetección por microscopía de fluorescencia	23
4.2.6. Fraccionamiento celular con detergentes	24
4.2.7. Ensayos de co-purificación con GST-profilina	24
4.2.8. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida	25
4.2.9. Ensayos de viabilidad celular	25
4.2.10. Construcción de plásmidos	26
4.2.11. Transfección de epimastigotes	26

5. RESULTADOS	28
5.1. Análisis de secuencia de la profilina de los tripanosomátidos	28
5.2. La profilina se expresa en diferentes estadios de <i>T. cruzi</i>	28
5.3. La profilina se expresa como una proteína citoplasmática y asociada al citoesqueleto en <i>T. cruzi</i>	30
5.4. La profilina co-purifica con actina, tubulina y proteínas no citoesquéticas <i>in vitro</i>	32
5.5. El genoma de <i>T. cruzi</i> codifica para otros posibles ligandos de la profilina	34
5.6. Efectos de la inhibición de las forminas en los epimastigotes	35
5.7. Sobre-expresión de la profilina en <i>T. cruzi</i>	38
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES	44
8. PERSPECTIVAS	45
9. REFERENCIAS	47
10. ANEXOS	54
10.1. Anexo 1. Caracterización de sueros anti-profilina	54
10.2. Anexo 2. Secuencias homólogas a la profilina en tripanosomátidos	55
10.3. Anexo 3. Especificidad del anticuerpo anti-profilina en inmunofluorescencia	56
10.4. Anexo 4. Inmunodetección de profilina y actina en microscopia de fluorescencia	57
10.5. Anexo 5. Confiabilidad de identificación de las proteínas de <i>T. cruzi</i> que co-purificaron con GST-profilina	57
10.6. Anexo 6. Proteínas con motivos de poli-prolina en <i>T. cruzi</i>	59
11. PUBLICACIÓN	60

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS	Página
Figura 1. Estructura 3D de la actina	4
Figura 2. Hidrólisis de ATP y polaridad en los microfilamentos	5
Figura 3. Reacciones catalizadas por proteínas de unión a actina	6
Figura 4. Nucleadores de la actina	9
Figura 5. Estructura terciaria de la profilina	11
Figura 6. Estructura celular y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	15
Figura 7. Ultraestructura de los epimastigotes	17
Figura 8. Familia de actinas en <i>T. cruzi</i>	19
Figura 9. Estrategia experimental	21
Figura 10. Análisis <i>in silico</i> de la profilina de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 11. Expresión de la profilina en <i>T. cruzi</i>	30
Figura 12. Inmunolocalización de la profilina en <i>T. cruzi</i>	31
Figura 13. Fraccionamiento celular en <i>T. cruzi</i>	32
Figura 14. Estrategia co-purificación de proteínas con GST-profilina	33
Figura 15. Proteínas de <i>T. cruzi</i> que co-purifican con GST-profilina	41
Figura 16. Ligandos potenciales de la profilina con motivos de poli-prolina	37
Figura 17. Efectos de SMIFH2 en epimastigotes	39
Figura 18. Sobre-expresión de profilina en epimastigotes	40
Figura 19. Herramientas para la sobre-expresión inducible de profilina	41
Figura 20. Hipótesis de la dinámica polimerización de actina en <i>T. cruzi</i>	46
Figura 21. Evaluación sueros policlonales anti-profilina	54
Figura 22. Especificidad anticuerpo anti-profilina en inmunofluorescencia	56
Figura 23. Inmunodetección de profilina en tripomastigotes y amastigotes por microscopia de fluorescencia	57

TABLAS	Página
Tabla 1. Características de los microfilamentos y los microtúbulos	2
Tabla 2. Proteínas de unión a actina identificadas en <i>T. cruzi</i>	7
Tabla 3. Genomas de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>L. major</i>	17
Tabla 4. Anticuerpos usados en los ensayos de Western blot	23
Tabla 5. Oligonucleótidos usados en reacciones de PCR	27
Tabla 6. Vectores de expresión para <i>T. cruzi</i>	27
Tabla 7. Proteínas de <i>T. cruzi</i> co-purificadas con GST-profilina	36
Tabla 8. Proteínas de unión a actina con motivos de poli-prolina en <i>T. cruzi</i>	37
Tabla 9. Características de las forminas de <i>T. cruzi</i>	38
Tabla 10. Secuencias homólogas a profilina en tripanosomátidos	55
Tabla 11. Confiabilidad de identificación de proteínas de <i>T. cruzi</i> co-purificaron en dos experimentos con GST-profilina	57
Tabla 12. Confiabilidad de identificación de proteínas de <i>T. cruzi</i> co-purificaron en un experimento con GST-profilina	58
Tabla 13. Confiabilidad de identificación de proteínas de <i>T. cruzi</i> co-purificaron con GST	58
Tabla 14. Proteínas con motivos de poli-prolina en <i>T. cruzi</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP: Proteína de unión a actina	Actina G: Actina globular o monomérica
Actina F: Actina filamentosa	ADF: Factor despolimerizador de actina
ATP: Adenosín trifosfato	Aip1: Proteína de interacción con actina 1
ARP: Proteína relacionada con actina	BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BSA: Albumina sérica de bovino	CAP: Proteína asociada a ciclasa
DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol	DFG: Dispersed gene family protein
DIC: Microscopía de contraste por interferencia diferencial	DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico	DTT: Ditioneitol
EB1: End-binding protein 1	<i>E. coli:</i> <i>Escherichia coli</i>
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	EF1-α: Factor de elongación 1-alfa
Ena/VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatador	FH: Dominio con homología a forminas
Fi: Fosfato inorgánico	GAP: Proteína activadora de GTPasa
GBD: Dominio de unión a GTPasa	GEF: Factor intercambiador de guanina
GFP: Proteína verde fluorescente	GST: Glutación S transferasa
GTP: Guanosín trifosfato	HFF: Fibroblastos de prepucio humano
HRP: Peroxidasa de rabano	Hyg: Higromicina B
IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	LIT: Infusión hígado triptosa
MASP: Mucin-associated surface protein	MBP: Proteína de unión a maltosa
MCS: Sitio múltiple de clonación	mRNA: RNA mensajero
NPF: Factor promotor de la nucleación del complejo Arp2/3	OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm
PBS: Tampón fosfato salino	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pI: Punto isoeléctrico	PLGS: ProteinLynx Global Server
PI(4,5)P₂: Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato	PI(3,4,5)P₃: Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
PVDF: Polifluoruro de vinilideno	RFP: Proteína roja fluorescente
RHP: Retrosposon Hotspot Protein	RNA: Ácido ribonucleico
RNA pol I: RNA polimerasa I	SDS: Sodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	SMIFH2: Molécula pequeña inhibidora de FH2
TetR: Represor de tetraciclina	WASH: Proteína con homología a WASP
WASP: Proteína del síndrome Wiskott–Aldrich	QTOF-MS/MS: Espectrometría de masas en tándem con cuadrupolos

RESUMEN

Métodos tradicionalmente usados para observar microfilamentos no han sido exitosos para detectar estructuras basadas en actina en *Trypanosoma cruzi*. Los análisis iniciales del genoma de este parásito protista sugirieron una dependencia reducida del sistema de actina al encontrar pocas proteínas involucradas en su dinámica de polimerización. Sin embargo, estudios posteriores han identificado un repertorio expandido de actinas y sus reguladores potenciales, sugiriendo la presencia de funciones no reconocidas de la actina. Una de los posibles reguladores de la actina identificados fue la profilina. Esta proteína eucarionte mantiene una poza de actina monomérica al evitar la nucleación, así como la elongación en los extremos en punta de los microfilamentos. A su vez, la profilina dirige la elongación a los extremos barbados al interactuar con factores presentes en estas regiones. Por estas razones, consideramos que la caracterización de la expresión y localización de la profilina, así como la identificación de sus ligandos, podría revelar funciones y rutas reguladoras de la actina en *T. cruzi*. En este trabajo, demostramos que el gen que codifica para la profilina en *T. cruzi* es expresado en diferentes estadios de desarrollo. Observaciones por microscopía confocal y fraccionamiento celular indican que la profilina es predominantemente citoplasmática, con una fracción pequeña asociada con fracciones citoesqueléticas. Además, identificamos ligandos posibles de la profilina mediante ensayos de co-purificación de extractos de proteína del parásito usando GST-profilina como carnada. Los ligandos de la profilina identificados por espectrometría de masas en muestras de estos ensayos incluyen a la actina y a los componentes de los microtúbulos. Se detectaron además proteínas hipotéticas, del metabolismo de carbohidratos, metaloproteasas y factores de traducción. Análisis *in silico* nos sugieren que la profilina podría unir además otros reguladores de la actina a través de motivos ricos en prolina. En conclusión, nuestro trabajo sugiere la expresión en *T. cruzi* de una profilina con las propiedades típicas de unión a actina y otros de sus factores reguladores. Además, la presencia de ligandos no relacionados con la regulación de la actina sugiere que la profilina puede estar involucrada en funciones no conocidas en este parásito.

Palabras clave. Profilina, Actina, Ligandos, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Traditional methods to observe microfilaments have been unsuccessful to detect actin-based structures in *Trypanosoma cruzi*. Early analysis of its genome sequence suggested a reduced dependency on the actin cytoskeleton, as there was only a few canonical actin-binding proteins. However, further searches revealed an expanded set of actins and its regulatory factors, suggesting the presence of unrecognized functions for actin in this parasite. One of the putative actin regulatory proteins found in these searches was profilin. This eukaryotic protein holds a pool of monomeric actin by preventing nucleation and elongation at the microfilament's pointed ends. Profilin also promotes the barbed end elongation by interacting with factors present at this region of the microfilament. For these reasons, we considered that the study of profilin's expression and localization, as well as the identification of its ligands, would uncover functions and regulatory networks in which actin participate in *T. cruzi*. In this work, we demonstrated the expression of profilin in different developmental stages of the parasite. Confocal microscopy and cell fractionation experiments identify profilin as a cytoplasmic protein. A small fraction of profilin seems to be associated with the cytoskeleton. In addition, we identified potential ligands of profilin in *T. cruzi* by pull-down assays of parasite protein extracts using GST-profilin as a bait. The parasite proteins bound to the recombinant protein were identified by mass spectrometry. The profilin ligands included actin and the main microtubule components, α and β tubulins. Proteins annotated as hypothetical, from the carbohydrate metabolism, metalloproteases, and translation factors were also detected in these assays. Sequence analysis suggests that profilin may bind to other canonical actin regulators through proline-rich motifs. Our work suggests that in *T. cruzi* there is expression of a profilin with typical properties with respect to the control of actin dynamics. Additionally, the identification of profilin ligands with no obvious association with actin suggests that this protein could be involved in unknown functions in this species.

1. INTRODUCCIÓN

Los microfilamentos y los microtúbulos son filamentos formados por polímeros de proteínas altamente conservadas: la actina y dímeros de tubulinas α/β . Estas estructuras son los elementos más conservados del citoesqueleto eucarionte. La formación de microfilamentos a partir de la actina es un evento regulado por una gran diversidad de proteínas de unión a actina (dos Remedios et al., 2003). Esta regulación es necesaria para que la formación de los microfilamentos se presente en el lugar y momento adecuado, generando además estructuras con la morfología apropiada para su función. De esta manera, las proteínas de unión a actina controlan todos los procesos relacionados con la dinámica de formación de los microfilamentos y su función en la célula. Los procesos que modulan las funciones de la actina incluyen la iniciación de la polimerización, la adición de subunidades a filamentos existentes, así como la longitud, localización y propiedades mecánicas de los microfilamentos.

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar la función y regulación del citoesqueleto de actina en el parásito protista *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas en el humano. *T. cruzi* forma parte de los tripanosomátidos, un grupo de organismos parásitos obligados que infectan una gran diversidad de especies. Junto con *T. cruzi*, los tripanosomátidos más conocidos son *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* sp., los responsables de causar la enfermedad del sueño Africano y diversos tipos de leishmaniasis. Por estudios ultraestructurales se ha sugerido que los tripanosomátidos tienen un citoesqueleto atípico (Gull, 1999; Souza, 2009). La mayor parte de las estructuras del citoesqueleto están constituidas por microtúbulos, sin la presencia evidente de microfilamentos. Los primeros análisis de las secuencias genómicas de los tripanosomátidos detectaron un número reducido de proteínas de unión a actina, llevando a proponer una dependencia reducida del citoesqueleto de actina compensada por un elaborado sistema de microtúbulos (Berriman et al., 2005). Sin embargo, estudios posteriores han revelado nuevas proteínas de unión a actina, así como familias expandidas de actinas y miosinas, particularmente para *T. cruzi* (Cevallos et al., 2011; De Melo et al., 2008; El-Sayed et al., 2005; Kollmar et al., 2012). Lo anterior sugiere un sistema de actina funcional, regulado y con una complejidad poco explorada.

Como estrategia para comprender la regulación de la actina en *T. cruzi* caracterizamos a la profilina, una de las proteínas de unión a actina que se identificaron en el genoma de los tripanosomátidos. Escogimos esta proteína ya que es considerada un factor central en la regulación de la dinámica de polimerización de la actina en los eucariontes (Jockusch et al., 2007). La profilina puede unirse de manera simultánea a la actina y a una gran diversidad de ligandos involucrados con la regulación de la formación de microfilamentos (Witke, 2004). Por esta razón, la consideramos una carnada atractiva para identificar proteínas reguladoras de la actina o relacionadas con su función en *T. cruzi*. Además, un estudio previo demostró la expresión de la profilina en *T. brucei* a nivel de mRNA y la capacidad del gen que la codifica de complementar una mutante negativa de levadura para esta proteína (Wilson & Seebeck, 1997). Esto nos sugirió que en *T. cruzi* la profilina se expresaba y conservaba sus propiedades funcionales típicas. En el presente trabajo, demostramos la expresión de la profilina en diversos estadios de desarrollo del parásito. Estudios de localización, de co-purificación con profilina recombinante y análisis *in silico* sugieren que, como ocurre con

profilinas de otros organismos, la expresada por *T. cruzi* se localiza predominantemente en el citoplasma y una actina. Detectamos otros ligandos potenciales de la profilina que podrían representar reguladores novedosos de la actina o estar relacionados con la función de los microfilamentos en el parásito.

1.1. CITOESQUELETO EUCARIONTE

El citoesqueleto es un entramado de fibras proteicas que se encuentra en todas las células eucariontes. El ensamble de estas fibras genera estructuras que participan en procesos celulares elementales como son mantener la integridad física de la célula, adhesión al sustrato, transporte intracelular, diversos tipos de motilidad celular y la separación de los cromosomas y el citoplasma durante la mitosis. Los dos elementos más conservados del citoesqueleto a lo largo de la evolución son los microtúbulos y los microfilamentos. Las proteínas constituyentes de estas estructuras forman filamentos con polaridad y unen un nucleótido que pueden hidrolizar. Los microtúbulos están compuestos de heterodímeros de tubulinas α y β . Estos complejos forman polímeros cabeza-cola llamados protofilamentos, los cuales interactúan de manera lateral hasta formar un cilindro de 13 elementos de este tipo. Por su parte, los microfilamentos están formados por una proteína globular llamada actina. La actina forma polímeros cabeza-cola, pero que tienen forma helicoidal. Los microtúbulos y los microfilamentos exhiben diferencias importantes en la regulación de su ensamblaje y en sus propiedades físicas (Tabla 1). Estas diferencias se incrementan si se tienen en cuenta los diferentes grupos de proteínas motoras que se unen a lo largo de estos filamentos y las proteínas reguladoras que se unen a ellos. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio del citoesqueleto de actina del parásito protista *Trypanosoma cruzi*. El presente proyecto está enfocado en su regulación por parte de proteínas de unión a actina, en particular la profilina. En las siguientes secciones describiremos algunos de los mecanismos reguladores de la actina con base en la información derivada del estudio de organismos modelo.

Tabla 1. Algunas características de los microfilamentos y los microtúbulos.

Característica	Microfilamentos	Microtúbulos
Composición	Actina	Dímeros tubulinas α y β
Nucleótido unido	ATP	GTP
Actividad ATPasa/GTPasa	ATPasa	GTPasa solo en la subunidad β
Forma del polímero	Helicoidal	Cilíndrico
Polaridad del polímero	Si	Si
Proteínas motoras y dirección de movimiento	Miosinas (-) \rightarrow (+)	Dineínas (+) \rightarrow (-) Cinecinas (-) \rightarrow (+)
Dinámica de polimerización	Fase estable o <i>treadmilling</i>	Inestabilidad dinámica

1.2. CITOESQUELETO DE ACTINA

1.2.1. Estructura 3D de la actina

La actina se encuentra en la célula en dos formas: monomérica y filamentosa. La estructura de la actina monomérica, también llamada actina globular o actina G, se ha resuelto a partir de difracción por rayos X de cristales de actina en complejo con diversas proteínas y moléculas pequeñas que inhiben su polimerización (e.g. DNasa I, profilina, timosina β -4, latrunculina). Mediante estos estudios se ha determinado que la estructura en 3D de la actina G consiste en una molécula plana con una hendidura en la cual se unen una molécula de ATP y un catión divalente (Figura 1A). El catión es Mg^{+2} en condiciones fisiológicas, y se encarga de estabilizar la interacción de la actina con el nucleótido. En la cara opuesta de la proteína se encuentra una hendidura hidrofóbica y de menor profundidad a la que se unen la mayoría de proteínas de unión a actina que se han identificado (Dominguez, 2004). La estructura de la actina se ha dividido en 4 subdominios que se denominan con números del 1 al 4. Los subdominios 1 y 3 son similares estructuralmente y forman el bolsillo hidrofóbico, mientras que los 2 y 4 forman la hendidura de unión a ATP. El subdominio 2 posee un asa que se une con alta afinidad a la DNasa I (Dominguez & Holmes, 2011). Por otro lado, la estructura de la actina filamentosa o actina F se ha determinado mediante observaciones por microscopía electrónica. Se han generado varios modelos de la actina F, de los cuales el más aceptado la describe como una hélice formada por una única hebra cuyas subunidades rotan a mano izquierda (Figura 1B), con giros que se repiten cada ~ 13 moléculas (Fujii et al., 2010). Las subunidades que forman el filamento se disponen en una orientación cabeza-cola y rotan $\sim 166^\circ$ con respecto a la molécula anterior. Debido a esta disposición, en uno de los extremos del filamento queda expuesta la hendidura de unión a ATP de una de las subunidades y en el otro extremo la región expuesta es el bolsillo hidrofóbico. Este hecho le brinda polaridad al filamento, lo cual tiene implicaciones importantes en la dinámica de polimerización que serán explicadas en la siguiente sección.

1.2.2. Polimerización *in vitro* de la actina

Una de las características que le permite a la actina participar en todos los procesos celulares en los que está involucrada es su capacidad de formar filamentos. La regulación de la polimerización de la actina se ha estudiado principalmente en condiciones *in vitro* (Dominguez & Holmes, 2011). En presencia de sales e iones monovalentes o divalentes, la actina forma filamentos de manera espontánea. La dinámica de la polimerización en estas condiciones se ha dividido en 3 fases. En la primera, llamada nucleación, se forman dímeros y trímeros de actina que sirven como núcleos para la formación de un nuevo filamento. Estos núcleos de actina son inestables y se disocian rápidamente, por lo que se representan como una fase de retardo en el tiempo durante el proceso de polimerización. Posteriormente, se adicionan nuevas subunidades de actina a los dos extremos de los oligómeros formados durante la nucleación, presentándose la elongación de los filamentos. La proporción de actina filamentosa con respecto a la monomérica aumenta hasta llegar a un punto de equilibrio en el que la cantidad de actina G se mantiene estable. En inglés, a este comportamiento se le denomina *treadmilling*. En este punto, se presenta un recambio en las subunidades en los filamentos, pero no un incremento en la masa de actina filamentosa. La

concentración de actina G que se observa al llegar al estado de equilibrio se le denomina concentración crítica.

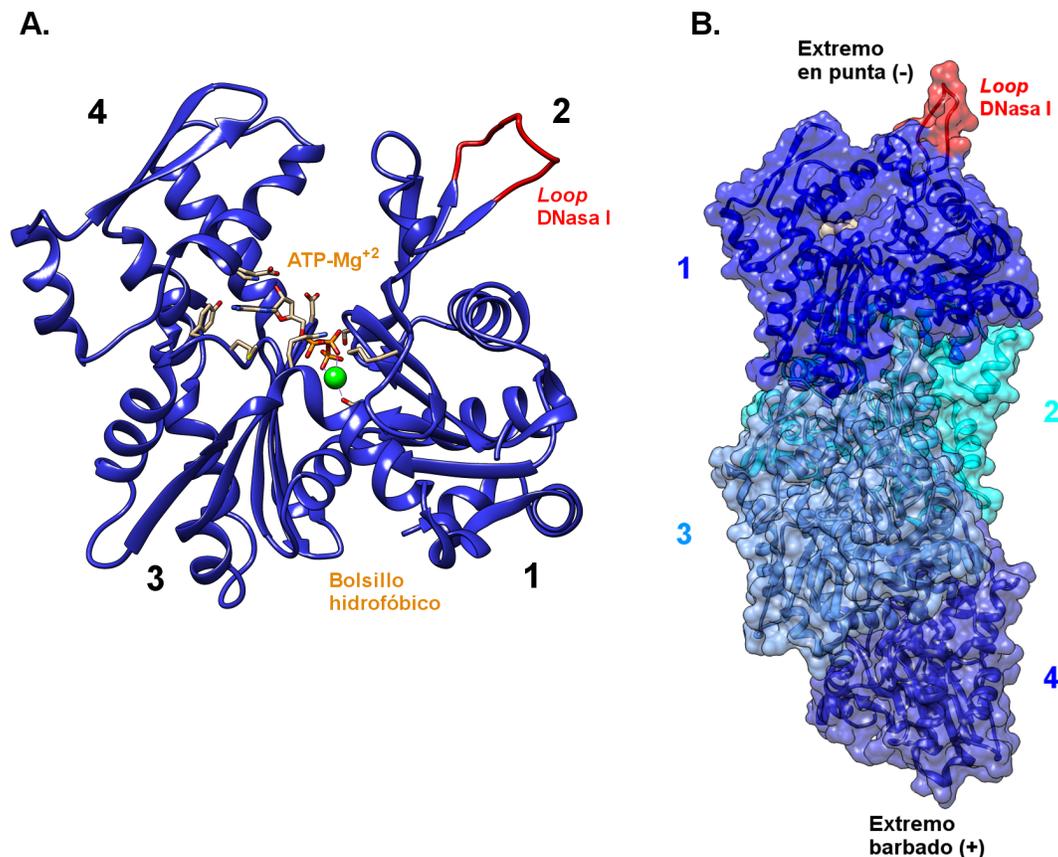


Figura 1. Estructura 3D de la actina monomérica y filamentosa **A.** Representación de cintas de la estructura de la actina G obtenida de un complejo de la β -actina con la profilina de bovino (Schutt et al., 1993) (PDB: 2BTF). Se señalan los subdominios de la actina con números del 1 al 4, la hendidura de unión a ATP-Mg²⁺ y el bolsillo hidrofóbico, así como el asa de unión a DNasa I (Rojo) **B.** Modelo de la estructura de la actina F en la que se representan 4 subunidades (Fujii et al., 2010) (PDB: 3MFP). Se muestra la superficie y la representación de cintas de cada subunidad, las cuales se identifican con una tonalidad diferente de azul y por números del 1 al 4. Como referencia a la estructura de la actina G, se muestra el asa de unión a DNasa I de la primera subunidad en color rojo. Las imágenes fueron generadas en Chimera (Pettersen et al., 2004) por el autor.

Uno de los factores reguladores más importantes en la dinámica de polimerización de la actina es la hidrólisis de ATP. La actina monomérica tiene actividad ATPasa intrínseca débil, la cual es estimulada cuando se incorpora como subunidad en un filamento (Dominguez & Holmes, 2011). Esto genera filamentos formados por subunidades de actina que pueden estar unidos a ATP, a ADP con fosfato inorgánico y a ADP (Figura 2A). La hidrólisis del ATP y la posterior liberación del fosfato inorgánico generado dan pie a la disociación de la molécula de actina-ADP resultante. Por esta razón, se ha propuesto que la hidrólisis de ATP actúa como un temporizador del proceso de polimerización de la actina (Pollard & Borisy, 2003). La subunidad de actina-ADP liberada puede ser reciclada en una nueva ronda de polimerización una vez se presente el recambio del ADP por un ATP presente en el medio. La adición y la

despolimerización de la actina se presentan por los dos extremos del filamento, pero con tasas diferentes. En el bolsillo hidrofóbico, la concentración crítica para la polimerización es menor que en el extremo de unión a ATP (Pollard & Borisy, 2003). Esto se traduce en una tasa neta de adición de subunidades mayor en el bolsillo hidrofóbico. Por estas diferencias en la cinética de polimerización, en estado polimérico al bolsillo hidrofóbico se le denomina (+) y al extremo de unión a ATP (-). Estos extremos también son conocidos como extremos barbados y en punta, respectivamente, debido al aspecto que tienen cuando se observan microfilamentos decorados con moléculas de miosina en el microscopio electrónico (Figura 2B). Por esta propiedad, en estado estable se presenta elongación en el extremo barbado y una disminución equivalente en el extremo en punta, sin crecimiento del filamento (Pollard, 2016). La dinámica de polimerización descrita en condiciones *in vitro* no refleja el comportamiento *in vivo*. Sin embargo, ha servido como modelo de estudio de la regulación por parte de las proteínas de unión a actina.

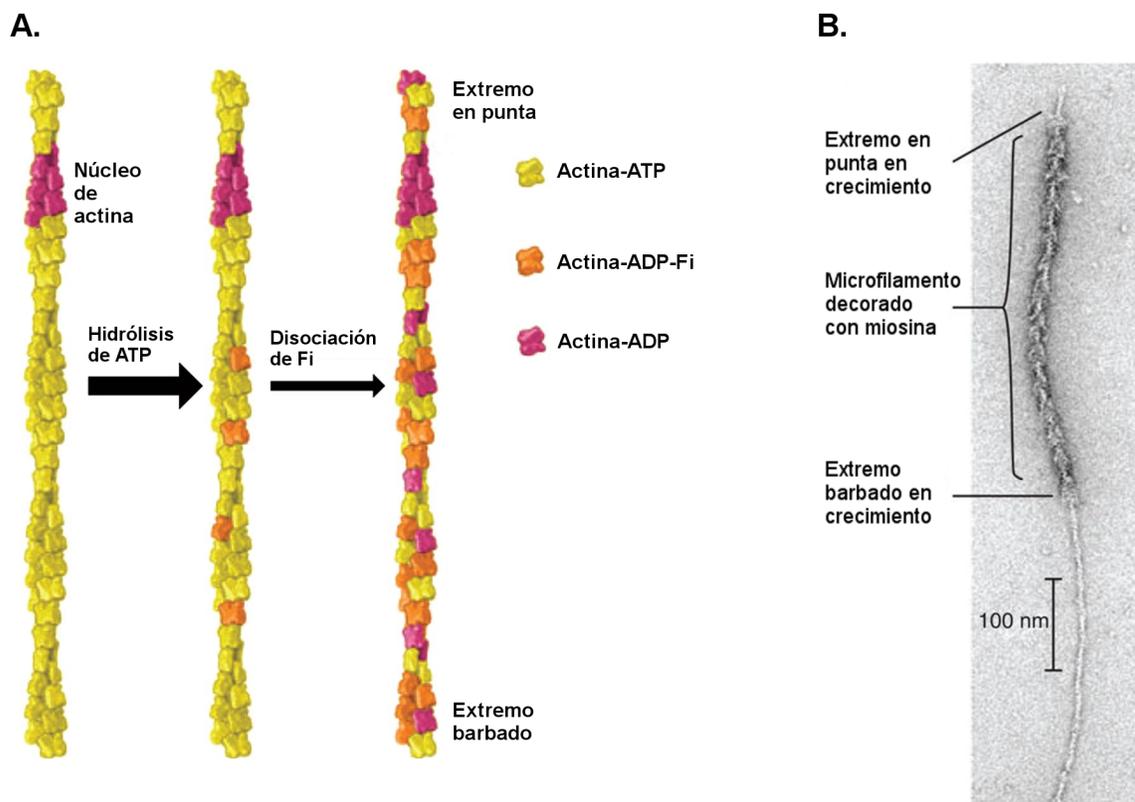


Figura 2. Papel de la hidrólisis de ATP y la polaridad de los microfilamentos en la polimerización de la actina **A.** Representación de las reacciones de hidrólisis de ATP que ocurren durante la formación de un microfilamento. Después de la adición a un extremo libre, la actividad ATPasa de la actina se estimula generando moléculas de actina unidas a ADP y fosfato inorgánico (Fi). El Fi es posteriormente liberado, produciendo subunidades unidas a ADP **B.** Micrografía electrónica de un microfilamento decorado con moléculas de miosina. El filamento decorado fue usado como núcleo para permitir la elongación de filamentos sin miosina. Se observa mayor crecimiento en el extremo barbado que en el extremo en punta. Tomada de Pollard, 2016.

1.2.3. Proteínas de unión a actina

La dinámica de polimerización *in vitro* descrita anteriormente no puede explicar muchos de los comportamientos dependientes de actina observados en la célula. El ensamble coordinado y la morfología de las estructuras basadas en actina requeridas en procesos celulares como la motilidad celular, la división celular y el tráfico intracelular solo se pueden explicar con ayuda de proteínas auxiliares. A estas se les denomina proteínas de unión a actina o ABPs. Las ABPs interactúan con las formas monomérica y/o polimérica de la actina y regulan su función (Figura 3). Algunas de las ABPs se unen a los monómeros de actina y evitan la nucleación y/o elongación, mientras que otras catalizan estos procesos y generan estructuras con la morfología apropiada para su función. Otras ABPs se unen a los extremos barbados o en punta de los microfilamentos o los cortan para restringir su longitud, promover el desensamble del filamento o generar nuevos extremos barbados que faciliten la elongación. Existen también ABPs que estabilizan estructuras basadas en microfilamentos como las redes o los haces; mientras que otras vinculan a los microfilamentos con los microtúbulos o con otros componentes celulares. Por último, las ABPs sirven como efectores de vías de señalización que regulan la dinámica de la actina en la célula en respuesta a diversos estímulos (Bezanilla et al., 2015). El repertorio de ABPs que expresa una célula puede variar con el tipo celular y la especie. Sin embargo, algunas de ellas se expresan de manera constitutiva y se encuentran distribuidas en la mayor parte de linajes eucariontes (dos Remedios et al., 2003; Pollard, 2016). Se han descritos cientos de ABPs en organismos modelo (e.g. células de mamífero, levaduras, plantas). Por simplicidad este documento se enfocará en aquellas que poseen genes homólogos identificados en el genoma de *T. cruzi* (Tabla 2). Las ABPs serán clasificadas de acuerdo a su actividad en las siguientes categorías: 1. Proteínas de unión a actina G y de corte; 2. Nucleadores y elongadores; 3. Proteínas de unión a microfilamentos.

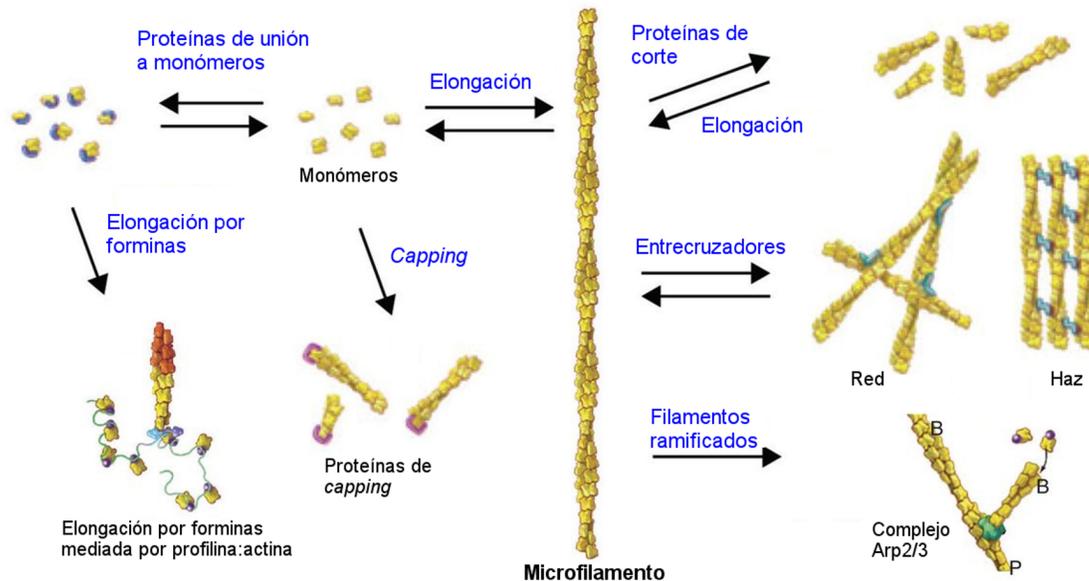


Figura 3. Representación de algunas de las reacciones catalizadas por las proteínas de unión a actina expresadas por las células eucariontes. Modificada de Pollard, 2016.

Tabla 2. Homólogos de proteínas de unión a actina identificados en la secuencia genómica de *T. cruzi*.

Anotación	TriTrypDB IDs	Funciones	Referencia
Proteínas de unión a actina G y de corte			
Profilina	TcCLB.458759.10	- Inhibir nucleación espontánea - Dirigir elongación a extremos barbados	Berriman et al., 2005
CAP	TcCLB.509799.30	- Catalizar intercambio ADP por ATP en la actina	Berriman et al., 2005
Twinfilina	TcCLB.506559.300	- Secuestrar a la actina-ADP en estado no polimerizable	Berriman et al., 2005
ADF/cofilina	TcCLB.508411.10	- Corte y desensamble de microfilamentos	Berriman et al., 2005
Aip-1	TcCLB.510329.80	- Modular actividad de ADF/cofilina	Berriman et al., 2005
Nucleadores y elongadores			
Formina A	TcCLB.511755.80	- Nucleación y ensamble de microfilamentos lineales	De Melo et al., 2008
Formina B	TcCLB.508641.320		
Formina C	TcCLB.511393.30		
ARP2	TcCLB.508899.110	- Componentes del complejo nucleador Arp2/3 - Nucleación y ensamble de microfilamentos ramificados	Berriman et al., 2005
ARP3	TcCLB.503913.20		
ARPC1	TcCLB.511275.30		
ARPC2	TcCLB.509569.90		
ARPC3	TcCLB.508625.30		
ARPC4	TcCLB.508737.194		
ARPC5	TcCLB.511635.30		
Proteínas de unión a microfilamentos			
Cap-Z alfa	TcCLB.506177.120	- Inhibición de la elongación y desensamble en los extremos barbados	Berriman et al., 2005
Cap-Z beta	TcCLB.506975.49		
Coronina	TcCLB.509859.80	- Estabilización de microfilamentos	De Melo et al., 2008
EB-1	TcCLB.506145.20	- Comunicación microfilamentos y microtúbulos	De Melo et al., 2008

1.2.3.1. Proteínas de unión a actina G y de corte

Se han descrito varias proteínas que se unen de manera preferencial a los monómeros de actina, así como otras que se unen a los microfilamentos y promueven su corte y desensamble. Estas proteínas ayudan a mantener una poza de actina monomérica y regulan la dinámica de recambio de subunidades en los filamentos (Pollard 2003). Las proteínas de unión a actina G poseen actividades diferentes, pero complementarias. Una de ellas es la profilina, una proteína que se une a la actina-ATP e inhibe la nucleación y la elongación en los extremos en punta, favoreciendo a su vez la adición de subunidades en los extremos barbados. Profilina, y otras proteínas como CAP (proteína asociada a ciclasa), pueden además catalizar el intercambio de ADP por ATP en la actina y recargar la poza de subunidades competentes para polimerizar (Jansen et al., 2014; Lu & Pollard, 2001). En algunas especies y tipos celulares la función de la profilina es asistida por proteínas como la twinfilina y CAP (Dominguez & Holmes, 2011; Ono, 2013; Poukkula et al., 2011). Contrario a la profilina, la unión de estas proteínas a la actina inhibe todas sus reacciones de

polimerización (nucleación y elongación en los dos extremos). La profilina compite con las otras proteínas de unión a actina G por la poza de actina monomérica, manteniendo así una fracción competente para polimerizar (profilina:actina) y un reservorio no polimerizable (twinfilina:actina, CAP:actina) (Ono, 2013; Pollard & Borisy, 2003; Poukkula et al., 2011). En este sistema de control también actúan proteínas de corte como las pertenecientes a la familia de las cofilinas. Proteínas de este tipo, como son ADF (factor despolimerizador de la actina) y las cofilinas, se unen a los microfilamentos y promueven su corte y desensamble (Poukkula et al., 2011). La actividad de corte de las cofilinas puede ser estimulada por proteínas como Aip1 (proteína de interacción con actina 1), las coroninas y CAP (Chen et al., 2015; Jansen et al., 2015; Normoyle & Briehner, 2012). Dos consecuencias principales pueden derivarse de la acción conjunta de estas proteínas: 1. Incrementar o mantener la poza de monómeros de actina; 2. Generar nuevos extremos barbados a los cuales se incorporen subunidades adicionales. De esta forma, la célula cuenta con monómeros y extremos barbados libres disponibles para ensamblar rápidamente estructuras basadas en actina en el lugar y momento requerido.

1.2.3.2. Nucleadores y elongadores de la actina

La formación de los núcleos de actina necesarios para la formación de microfilamentos *de novo* es un proceso rápido, pero genera complejos poco estables (Campellone & Welch, 2010). Además, en la célula gran parte de la actina monomérica se encuentra unida a factores que inhiben la nucleación (e.g. profilina, twinfilina, CAP) (Pollard, 2016). Por estas razones, son necesarias proteínas que induzcan la nucleación de la actina en el lugar y tiempo adecuado. Otros factores son requeridos para modular la tasa de elongación y la arquitectura de las estructuras basadas en actina para que sean adecuadas para su función. Estas actividades son llevadas a cabo por proteínas llamadas nucleadoras y elongadoras (Dominguez & Holmes, 2011). Se han caracterizado diversas proteínas y complejos de proteínas de este tipo. Algunas de ellas poseen solo un tipo de actividad (e.g. Arp2/3, Ena/VASP, Spire, Cordon Bleu), mientras que otras catalizan la nucleación y la elongación (forminas). Por su presencia en los tripanosomátidos (Tabla 2), en este documento se describirán algunos detalles de las forminas y el complejo Arp2/3.

Las forminas son una familia eucarionte de proteínas de alto peso molecular (~100 kDa) que se encuentran en los genomas como familias multigénicas (Chalkia et al., 2008). La característica que define a las forminas es la presencia de un dominio de unión a actina llamado FH-2 (Dominio de homología con forminas 2). FH-2 genera homodímeros que tienen forma de anillo, los cuales estabilizan dímeros de actina y son los responsables de su actividad nucleadora (Xu et al., 2004). Los homodímeros de FH-2 permanecen unidos a los extremos barbados del microfilamento mientras se produce la elongación (Otomo et al., 2005). A diferencia de otras proteínas que se unen a los extremos barbados, la unión de las forminas no inhibe la elongación. Por el contrario, la mayoría de forminas la estimulan ya que reclutan complejos de profilina:actina al extremo barbado a través de la interacción de la profilina con regiones ricas en prolina ubicadas hacia el extremo N-terminal del dominio FH-2 (Figura 4A) (Romero et al., 2004). El otro tipo de nucleador conservado en la mayoría de las células eucariontes es el complejo Arp2/3. Este complejo genera estructuras ramificadas ya que induce la polimerización de la actina uniéndose al costado de un microfilamento pre-existente (Figura 4B) (Rotty et al., 2013). El complejo Arp2/3 está formado por 7 proteínas

conservadas, dos de las cuales son proteínas relacionadas con la actina (ARP2 y ARP3) junto con 5 subunidades adicionales llamadas ARPC 1-5. El complejo Arp2/3 requiere de proteínas adicionales para su activación, las cuales se denominan factores promotores de la nucleación o NPFs. La interacción del complejo Arp2/3 con el microfilamento y un NPF promueve un cambio conformacional en el complejo que acomoda las subunidades ARP2 y ARP3 de tal forma que sirven como extremo barbado para el inicio de la polimerización (Pollard, 2016). Usando diferentes tipos de nucleadores y elongadores, como son las forminas y Arp2/3, la célula puede iniciar la formación de estructuras basadas en actina con diferente arquitectura y función.

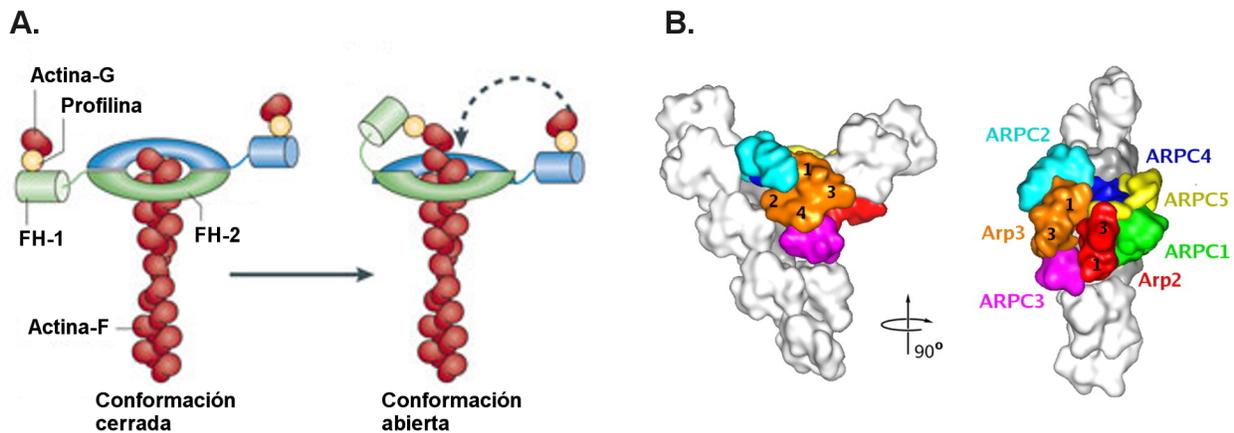


Figura 4. Nucleadores y elongadores de actina más conservados en los eucariontes **A.** Elongación de la actina mediada por las forminas y complejos profilina:actina. En el modelo presentado el dímero de FH-2 unido al extremo barbado alterna entre una conformación cerrada, que no permite la incorporación de nuevas subunidades, y una abierta que sí lo hace. Una región con segmentos ricos en prolina, llamada también dominio FH-1, recluta complejos de profilina:actina **B.** Modelo de la estructura del complejo Arp2/3 activado sobre un microfilamento. Se indica la posición de las moléculas de actina en blanco y gris, y las subunidades del complejo Arp2/3 en colores diferentes. ARP2 y ARP3 tienen una estructura similar a la actina en la que también se identifican cuatro subdominios. Tomadas de Campellone & Welch, 2010; Rouiller et al., 2008.

1.2.3.3. Proteínas de unión a microfilamentos

Se han descrito proteínas y complejos que se unen a la actina filamentosa, donde tienen diferentes actividades. Un grupo de ellas se une a los extremos de los microfilamentos e inhiben la incorporación de nuevas subunidades y la disociación del filamento. Estas proteínas se denominan proteínas de cobertura (*capping* en inglés). El factor de este tipo que se ha estudiado con más detalle es CapZ, un heterodímero formado por subunidades α y β que es ubicuo en las células eucariontes. Este complejo es altamente estable en el citoplasma y se une con alta afinidad a los extremos barbados de los microfilamentos (Yamashita et al., 2003). La actividad inhibitoria de los extremos barbados por factores como CapZ ayuda a mantener la poza de actina monomérica al limitar los sitios activos de polimerización (Pollard, 2016). Se han descrito un número grande de proteínas de unión a microfilamentos además de CapZ. De ellas, solo las coroninas y EB1 han sido identificadas en los tripanosomátidos (Tabla 2). Las coroninas forman oligómeros que se unen al costado de los microfilamentos y modulan la actividad de corte y despolimerización de las cofilinas (Utrecht & Bear, 2006). Por otro lado, proteínas como EB1 y las coroninas, pueden

interactuar con los microfilamentos y otros componentes celulares (Alberico et al., 2016; Gatfield et al., 2005; Goode et al., 1999). Por esta razón, se ha propuesto que están involucradas en la interacción física o en la comunicación del citoesqueleto de actina con otros elementos de la célula. Desde los análisis iniciales de los genomas de los tripanosomátidos llamo la atención la ausencia de otras proteínas de unión a microfilamentos (Berriman et al. 2005). Entre ellas cabe destacar la ausencia de proteínas como la fascina, la α -actinina, la filamina, la cortactina y las tropomiosinas.

1.3. PROFILINA: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN

1.3.1. Estructura de la profilina

La profilina es una proteína pequeña (< 20 kDa) que se expresa en la mayoría de células eucariontes. Inicialmente se identificó como una proteína que co-purificaba con la actina de bovino e inhibía su polimerización (Carlsson et al., 1977). Estudios posteriores detectaron secuencias con similitud a profilina en una gran diversidad de organismos eucariontes, incluyendo animales, hongos, plantas y protistas. La similitud en secuencia de aminoácidos de las profilinas expresadas por diferentes especies, así como la de isoformas codificadas por un genoma, es por lo general baja (identidad < 25%) (Jockusch et al., 2007). Por esta razón, las profilinas se definen principalmente por una estructura terciaria altamente conservada formada por un núcleo de 7 hojas β plegadas antiparalelas rodeado por 4 hélices α (Figura 5A). La profilina une tres tipos de ligandos: actina, proteínas con regiones ricas en prolina (e.g. forminas, Ena/VASP, WASP, CAP) y los fosfoinositoles PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ (Jockusch et al., 2007). El sitio de unión con actina comprende una superficie amplia (2250 Å) y variable en secuencia que interactúa con aminoácidos de los subdominios 1 y 3 de la actina (Figura 5B) (Jockusch et al., 2007; Schutt et al., 1993). Por otro lado, el sitio de unión a poli-prolinas está formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos que se encuentran en las hélices α de los extremos N- y C-terminal (Ferron et al., 2007). Estos residuos están altamente conservados en todas las profilinas y, a pesar de estar distantes en la secuencia de aminoácidos, se encuentran cercanos en la estructura terciaria (Figura 5A). La disposición de los sitios de unión a actina y poli-prolinas en caras opuestas de la profilina permite que se puedan formar complejos ternarios actina:profilina:poli-prolina. En contraste, el sitio de unión con fosfoinositoles se sobrepone parcialmente con los de la actina y las poli-prolinas, por lo que la interacción de la profilina con el lípido y los otros dos ligandos es excluyente (Lambrechts et al., 2002; Lassing & Lindberg, 1985).

1.3.2. Regulación de la polimerización de la actina por la profilina

Desde su identificación hace casi 40 años se propuso que los complejos profilina:actina servían como un reservorio de actina monomérica para la célula (Carlsson et al., 1977). Este es un aspecto importante en la regulación de la dinámica de la actina, ya que la concentración de actina monomérica en el citoplasma supera 200–1000 veces la concentración crítica (Pollard & Borisy, 2003). Por esta razón, en ausencia de proteínas como la profilina, CAP y la twinfilina la mayor parte de la actina celular se encontraría en estado polimérico. Estudios posteriores mostraron que además de ayudar a mantener parte de la

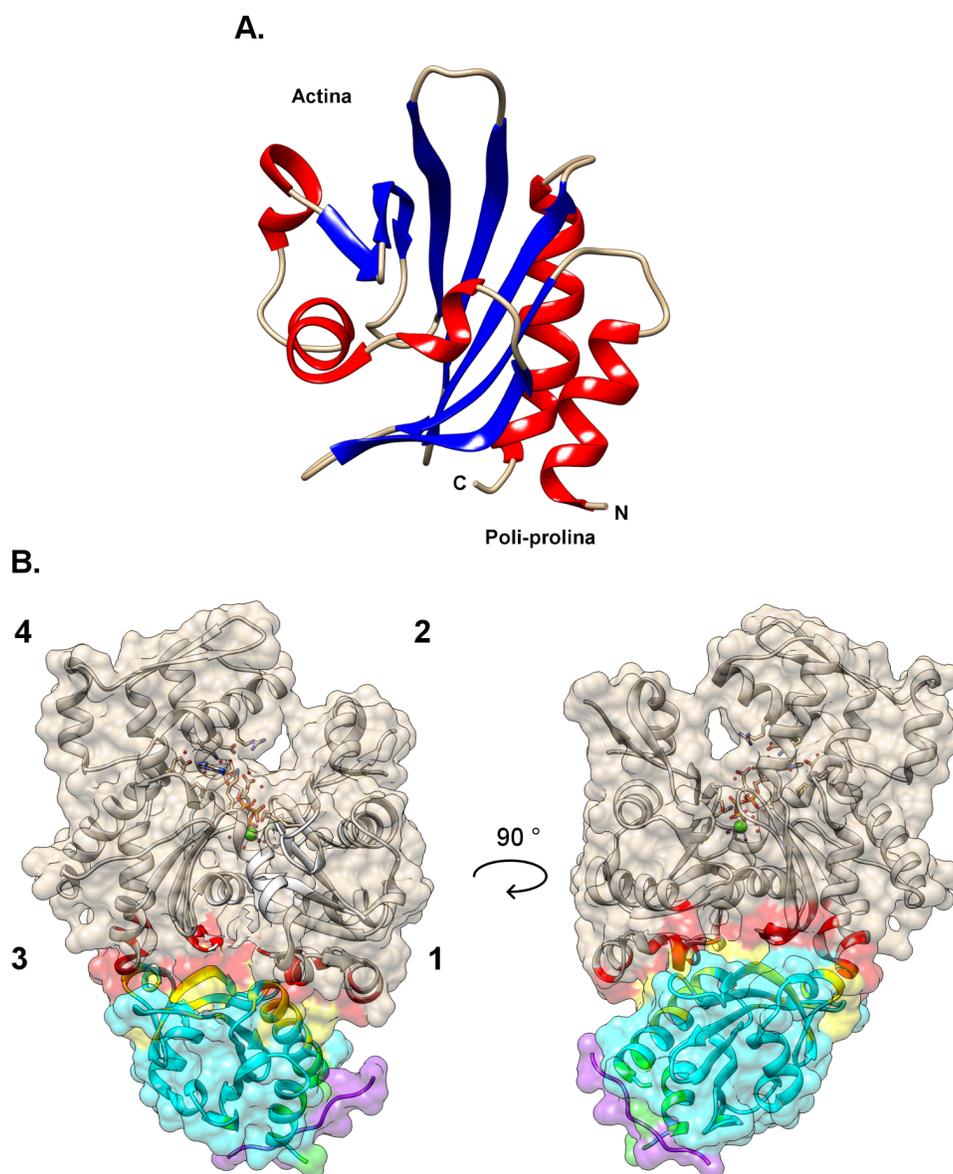


Figura 5. Representación de la estructura terciaria de la profilina de mamífero **A.** Representación en cintas de la estructura terciaria de la profilina de bovino (Schutt et al., 1993) (PDB: 2BTF). Se muestran el núcleo de hojas β (azul) rodeado por las hélices α (rojo). Se indican las posiciones aproximadas de los dominios de la proteína involucrados en la interacción con la actina y las poli-prolinas **B.** Representación en cintas y de la superficie del complejo ternario de la profilina humana (azul claro) con la β -actina (gris) y un fragmento de poli-prolinas (morado) proveniente del elongador VASP (Ferron et al., 2007) (PDB: 2PDB). Los aminoácidos involucrados en la interacción profilina:actina son indicados en amarillo (profilina) y rojo (actina), y los que participan en la interacción con la región de poli-prolina de Ena/VASP se indican en verde. Se señala la posición de los subdominios de la actina. Las figuras fueron generadas en Chimera (Pettersen et al., 2004) por el autor.

actina en estado monomérico, la profilina estimulaba la polimerización en los extremos barbados (Jockusch et al., 2007). Contrario a la twinfilina y CAP, la profilina se une al monómero de actina únicamente por el extremo barbado (Figura 5B). Esto permite que el

extremo en punta de un monómero de actina unido a profilina pueda asociarse con el extremo barbado libre de un microfilamento. Por esta razón, la profilina inhibe la nucleación y la elongación en los extremos en punta, pero no en los barbados. Además, se ha demostrado que la profilina puede interactuar de manera simultánea con la actina y con regiones ricas en prolina presentes en múltiples nucleadores y elongadores de la polimerización de actina, estimulando la actividad de estas proteínas al aumentar la concentración local de la actina (Blanchoin et al., 2014). Estos nucleadores y elongadores incluyen diversos NFPs del complejo Arp2/3 (Suetsugu et al., 1998), múltiples forminas (Michelot et al., 2005; Romero et al., 2004) y Ena/VASP (Ferron et al., 2007). Este dominio también media la interacción con CAP (Bertling et al., 2007), una proteína que se une de manera preferencial a monómeros de actina-ADP y cataliza el intercambio de ADP por ATP en esta molécula, promoviendo su reciclaje en nuevas rondas de polimerización (Mattila et al., 2004). Las profilinas de algunas especies también tienen esta actividad (Lu & Pollard, 2001; Mockrin & Korn, 1980), aunque se piensa que CAP es la principal responsable de llevarla a cabo en la célula (Ono, 2013).

Por todas estas propiedades, por mucho tiempo se pensó que los complejos profilina:actina servían como fuente de actina monomérica para las múltiples rutas de polimerización de actina activas en la célula. Sin embargo, datos recientes indican que la profilina tiene un papel más activo en la regulación de la polimerización de la actina. Estudios genéticos y de inhibición farmacológica han sugerido que los diferentes nucleadores y elongadores compiten por los monómeros de actina disponibles en el citoplasma y que la profilina es un factor que modula esta competencia. En levadura, los monómeros de actina unidos a la profilina se incorporan de manera preferencial en estructuras ensambladas por nucleadores de la familia de las forminas, inhibiendo al mismo tiempo la elongación de microfilamentos ramificados generados por el complejo Arp2/3 (Suarez et al., 2015). De manera similar, en fibroblastos de ratón los complejos profilina:actina sirven como fuente preferencial de subunidades para microfilamentos ensamblados por el elongador Ena/VASP (Rotty et al., 2015). Así, bajo este modelo, una alta proporción de profilina:actina favorecería la formación de microfilamentos lineales generados por proteínas como las forminas y Ena/VASP, llevando a su vez a una disminución en las ramificaciones generadas por el complejo Arp2/3. Observaciones en diversos tipos celulares y especies han sido explicadas recientemente bajo este modelo (Suarez & Kovar, 2016), por lo que parece ser conservado y relevante *in vivo*.

1.3.3. Regulación de la profilina

En la sección anterior se describieron las diferentes actividades que ejerce la profilina sobre la dinámica de polimerización de la actina. Sin embargo, no se ha explicado cómo se regulan sus funciones. Se han propuesto dos mecanismos principales de regulación de la profilina: 1. Secuestro de la profilina por fosfoinositoles de la membrana; 2. Modulación de la afinidad a sus ligandos por fosforilación. La profilina interactúa con PI(4,5)P₂, el fosfoinositol de membrana plasmática más abundante en la célula (Saarikangas et al., 2010). La profilina unida a PI(4,5)P₂ no puede interactuar con ninguno de sus ligandos proteicos, por lo que se ha sugerido que la unión con este lípido es un evento que secuestra a la profilina en la membrana. Con base en esta idea, se han sugerido dos modos de regulación no excluyentes de la profilina por parte de PI(4,5)P₂. En el primero, esta interacción disocia el complejo profilina:actina, promoviendo la liberación de la actina y su incorporación en microfilamentos (Alkam et al., 2016; Witke, 2004). En el segundo, la profilina secuestrada por PI(4,5)P₂ es

liberada por la acción de la fosfolipasa C activada, la cual hidroliza el lípido y disocia el complejo con la profilina (Goldschmidt-Clermont et al., 1991; Jockusch et al., 2007). Una vez en el citoplasma, la profilina compete por la poza de actina monomérica con otras proteínas de unión a actina G. Por otro lado, en cuanto al segundo mecanismo regulador, se ha demostrado que la profilina de diversas especies y tipos celulares es fosforilada en distintas posiciones (e.g. Fan et al., 2012; Guillén et al., 1999; Vemuri & Singh, 2001). Esta modificación post-traducciona l modula la afinidad de la profilina por sus ligandos, y por ende su actividad (Fan et al., 2012; Sathish et al., 2004). Este tipo de regulación se ha estudiado en detalle en células endoteliales, donde la fosforilación de la profilina en la posición Y129 induce un aumento en la afinidad por la actina y en la actividad de intercambio de ADP por ATP en el monómero inducido por profilina. Esto lleva a un incremento en la polimerización de la actina *in vitro*, lo cual está asociado con un incremento en la migración celular y la angiogénesis (Fan et al., 2012). Se han propuesto otras formas de regulación de la profilina, como cortes mediados por proteasas y la expresión de isoformas que unen proteínas diferentes y exhiben patrones de expresión específicos (Jockusch et al., 2007; Pečar Fonović et al., 2013).

1.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN EL CITOESQUELETO DE ACTINA

Hasta el momento se han descrito algunas de las proteínas de unión a actina encargadas de regular su dinámica de polimerización, haciendo énfasis en la profilina. Sin embargo, no se ha abordado cómo se coordina la actividad de estas proteínas para que la polimerización se presente en el lugar y momento requerido. Uno de los mecanismos que usa la célula para este fin son vías de señalización mediadas por ciertas familias de GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras (proteínas G de ahora en adelante). Las proteínas G actúan como interruptores moleculares que regulan una gran cantidad de efectores y desatan diversas respuestas celulares. Ellas pueden estar en forma activa o inactiva dependiendo del nucleótido al que se encuentren unidas (GTP= activa, GDP= inactiva) (Hall, 2005). En la célula, los niveles de proteína G en estado activo o inactivo dependen de la acción de un diverso grupo de factores llamados GEFs (factores intercambiadores de guanina) y GAPs (proteínas activadoras de GTPasas) (Bos et al., 2007; Hennig et al., 2015). Las GEFs inducen la activación de las proteínas G al catalizar el intercambio de GDP por GTP, mientras que las GAPs promueven la hidrólisis del GTP y por ende su inactivación. La localización y actividad de los GEFs y las GAPs están moduladas por diversos estímulos, incluyendo interacciones proteína-proteína o proteína-lípido, segundos mensajeros y modificaciones post-traduccionales. En el caso del citoesqueleto de actina, muchas de las proteínas de unión a actina discutidas en las secciones anteriores sirven como sustrato directo para proteínas G o para efectores corriente abajo de estas cascadas de señalización. En particular, de las 5 familias de proteínas G que se han descrito, Rho es la que más se ha asociado con el citoesqueleto de actina. En uno de los casos más caracterizados, las Rho activadas interactúan con dominios GBD (dominio de unión a GTPasa) presentes en nucleadores de la familia de las forminas y en diferentes NPFs del complejo Arp2/3, liberando estados autoinhibitorios y llevando a la polimerización de la actina (Bezani lla et al., 2015).

Las formas fosforiladas del fosfatidilinositol (fosfoinositoles) presentes en las membranas también juegan un papel importante en la regulación del citoesqueleto de actina. Los fosfatidilinositoles poseen como cabeza polar un anillo inositol que puede ser fosforilado en 3

posiciones (*D3*, *D4* y *D5*) por tres tipos de cinasas (PI3K, PI4K y PI5K). Estas moléculas se exponen en la cara interna de la membrana plasmática y en los sistemas internos de membrana, teniendo diferentes abundancias y localizaciones (Saarikangas et al., 2010). De las siete especies posibles de fosfoinositoles, la más abundante y la que se ha asociado con la regulación del citoesqueleto de actina es la forma fosforilada en las posiciones *D4* y *D5* (llamada PI(4,5)P₂). PI(4,5)P₂ se une directamente a diversas proteínas de unión a actina y regula sus actividades y localizaciones. En términos generales, esta interacción inhibe la actividad de proteínas que promueven el desensamble de la actina y estimula la de nucleadores y elongadores. En particular, se ha descrito que la unión de PI(4,5)P₂ es necesaria para la activación de NPFs del complejo Arp2/3. En contraste, se han observado interacciones inhibitorias de este lípido con proteínas de unión a actina G que secuestran a la actina en forma monomérica (e.g. profilina), así como de proteínas de corte y desensamble de microfilamentos de la familia de ADF/cofilina y del complejo de cobertura CapZ. De esta forma, se considera que PI(4,5)P₂ promueve la formación de estructuras basadas en actina asociadas con diversos sistemas de membrana (Bezanilla et al., 2015; Saarikangas et al., 2010).

1.5. *Trypanosoma cruzi*: GENERALIDADES Y CITOESQUELETO

1.5.1. Estructura celular y ciclo de vida

Trypanosoma cruzi es un protista parásito flagelado que es conocido por ser el agente causal de la enfermedad de Chagas en el humano. Las células de *T. cruzi* son alargadas y poseen un único flagelo, el cual utilizan para moverse y adherirse al sustrato (Figura 6A). El flagelo está unido al cuerpo celular a través de una estructura en forma de cremallera que circunda a la célula de manera helicoidal. Por esta disposición los tripanosomátidos exhiben una forma de motilidad característica en la que el batir del flagelo provoca que la célula gire sobre su eje y la propulse con el flagelo hacia adelante. Con base en esta característica, a la región distal del flagelo se le considera la parte anterior de la célula y al cuerpo celular la parte posterior. En el cuerpo celular son prominentes dos estructuras: el núcleo y el cinetoplasto. El núcleo ocupa gran parte del citoplasma y se encuentra cercano a un elemento alargado llamado cinetoplasto. Esta estructura contiene el DNA mitocondrial, que está organizado en una serie de maxicírculos y minicírculos concatenados que contienen los genes que codifican para los RNA ribosomales de la mitocondria, las subunidades de los complejos respiratorios y para un tipo especial de RNAs pequeños llamados RNA guías (Aphasizhev & Aphasizheva, 2014). La forma y posición del cinetoplasto en la célula son atributos clave para diferenciar los estadios morfológicos que presenta *T. cruzi* durante su ciclo de vida, como se aprecia en la Figura 6A.

T. cruzi puede infectar varias especies de chinches hematófagas que transmiten el parásito a diversos mamíferos, incluyendo el humano. De los estadios de desarrollo que se encuentran en los diferentes hospederos se pueden diferenciar tres tipos morfológicos (Figura 6B): epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes. El epimastigote es un estadio extracelular que se replica en el intestino de las chinches. Presenta un núcleo redondeado y un cinetoplasto alargado, que se encuentra ubicado en la parte anterior del cuerpo celular. El tripomastigote es una forma extracelular no replicativa y altamente infectiva que puede encontrarse en la cloaca de la chinche o en el torrente sanguíneo del mamífero. Cuando se encuentra en la chinche recibe el nombre tripomastigote metacíclico, mientras que en el mamífero se

denomina tripomastigote sanguíneo. A diferencia del epimastigote, el núcleo del tripomastigote es alargado y el cinetoplasto se desplaza al extremo posterior de la célula (Figura 6A). El origen del flagelo cambia acorde a la posición del cinetoplasto, uniéndose a lo largo de todo el cuerpo celular. Finalmente, el amastigote es el único estadio intracelular del parásito. Se replica en el interior de las células del mamífero y presenta un flagelo reducido. El núcleo y el cinetoplasto del amastigote tienen una apariencia y localización similar al observado en el epimastigote. En la Figura 6B se muestra una representación del ciclo de vida del parásito.

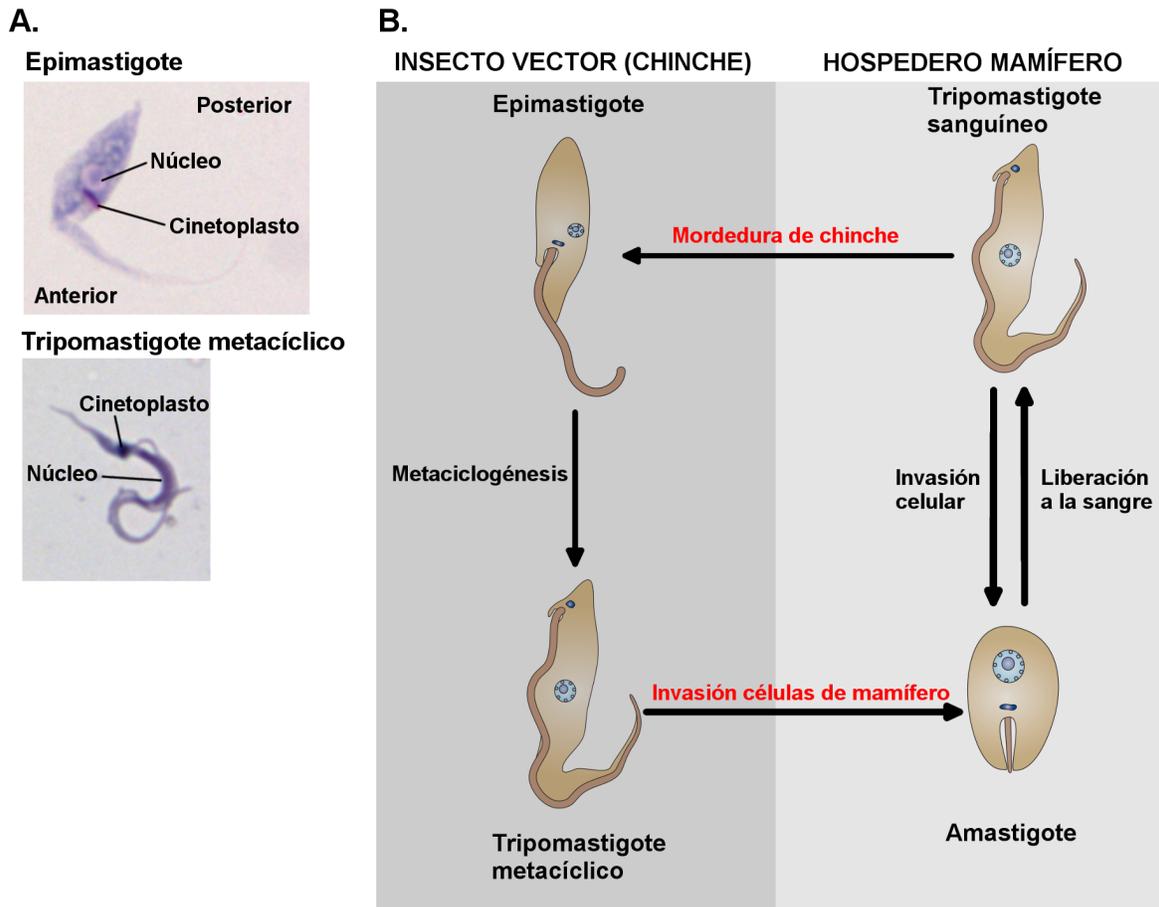


Figura 6. Estructura celular y ciclo de vida de *T. cruzi*. **A.** *T. cruzi* en los dos estadios de desarrollo presentes en la chinche (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos) donde se señalan la posición del núcleo y el cinetoplasto. Parásitos teñidos con HEMA-3 (Fisher Scientific) vistos en microscopio de luz a 100X. **B.** Representación del ciclo de vida de *T. cruzi*. El epimastigote se replica en el intestino de la chinche, migra y se adhiere en el epitelio de la cloaca, donde se diferencia a tripomastigote metacíclico mediante un proceso llamado metaciclogénesis. Estos parásitos son liberados por las heces cuando el insecto se alimenta de la sangre de un hospedero mamífero. Después, ingresan al torrente sanguíneo a través de una herida en la piel o de las mucosas. Los tripomastigotes invaden células y se replican intracelularmente como amastigotes, para posteriormente liberarse al torrente sanguíneo como tripomastigotes sanguíneos. Estos parásitos pueden invadir nuevas células en el hospedero mamífero y perpetuar la infección, o bien ser tomados por una chinche y completar el ciclo de vida. Figura del autor.

1.5.2. Ultraestructura de *T. cruzi*

La ultraestructura de *T. cruzi* se ha estudiado en forma extensa mediante diferentes enfoques de microscopía electrónica (Souza, 2009). A través de estos estudios se han observado en el citoplasma de *T. cruzi* los organelos típicos de una célula eucarionte, incluyendo un único núcleo, una mitocondria que contiene el cinetoplasto y sistemas internos de membrana como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Figura 7A). Por otro lado, se han descrito numerosas estructuras rodeadas de membrana con diferente aspecto y función. Entre ellos cabe destacar los glicosomas, los acidocalcisomas, los reservosomas y una vacuola contráctil. Estas estructuras tienen funciones metabólicas, de almacenaje de nutrientes y iones, y de control del pH y osmoregulación. El citoesqueleto del parásito muestra varias estructuras particulares. Está comprendido principalmente por los microtúbulos, los cuales forman el axonema del flagelo y un entramado de microtúbulos dispuestos en paralelo que atraviesan a la célula longitudinalmente (Figura 7B). Esta estructura se encuentra asociada a la cara interna de la membrana plasmática y se denomina corsé subpelicular. El axonema del flagelo tiene una composición clásica de dos pares de microtúbulos centrales y 9 pares periféricos, y está acompañado de una estructura de aspecto filamentoso llamada bastón paraflagelar. El flagelo emerge del cuerpo celular y se adhiere a él mediante una serie de proteínas transmembranales, formando la zona de anclaje flagelar. El centro organizador de microtúbulos del flagelo es un cuerpo basal que se encuentra físicamente asociado con el cinetoplasto (Ogbadoyi et al., 2003). Otra estructura peculiar del citoesqueleto de *T. cruzi* es el citostoma que, junto con el bolsillo flagelar, es el sitio donde se concentra la actividad endocítica de los epimastigotes (Porto-Carreiro et al., 2000). El citostoma es una invaginación de la membrana plasmática presente cerca de la base del flagelo que ingresa en el citoplasma formando una estructura en forma de embudo (Figura 7B). Está soportada por un grupo especializado de microtúbulos, circunda la región perinuclear y llega hasta la parte posterior de la célula. A lo largo de toda la estructura se presenta alta actividad de fisión de vesículas provenientes de la ruta endocítica (Alcantara et al., 2014). Los microfilamentos no han sido identificados en ningún tripanosomátido (Gull, 1999; Souza, 2009), a pesar de que se ha demostrado la expresión de la actina en diversas especies (García-Salcedo et al., 2004; Mortara, 1989; Sahasrabudde et al., 2004).

1.5.3. Citoesqueleto de *T. cruzi* desde el genoma

La secuenciación de los genomas de los tripanosomátidos *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major* permitió la identificación y comparación de los genes potencialmente asociados con diferentes estructuras y procesos biológicos (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005). En comparación con las otras dos especies, el genoma de *T. cruzi* es mayor en tamaño y contenido de genes (Tabla 3). Los genes codificadores de proteínas están dispuestos en unidades policistrónicas de cientos de genes que son transcritos y procesados post-transcripcionalmente para generar moléculas de mRNA maduras. Más del 50% del genoma está compuesto por secuencias repetidas, que consisten principalmente de grandes familias de genes que codifican para proteínas de superficie, retrotransposones y repeticiones subteloméricas. El análisis del genoma permitió identificar expansiones de familias génicas con respecto a otros linajes eucariontes, así como algunas específicas de *T. cruzi*. Entre ellas cabe destacar una familia compuesta por más de 40 cinecinas, proteínas motoras basadas en microtúbulos. También se identificaron representantes de 6 familias de

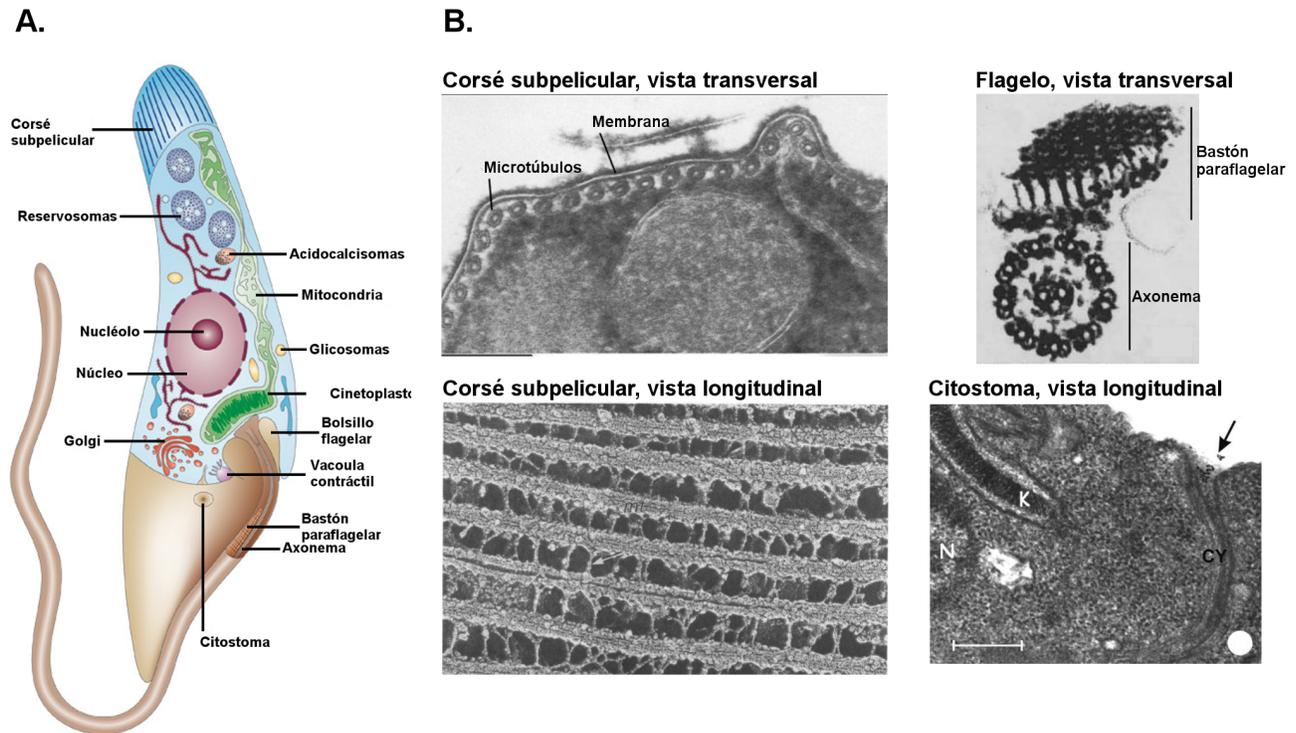


Figura 7. Ultraestructura de los epimastigotes de *T. cruzi* **A.** Esquema que representa las principales estructuras que se encuentran en el citoplasma de un epimastigote **B.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión donde se ilustran las estructuras mayoritarias del citoesqueleto del parásito. N= Núcleo, K= Cinetoplasto, CY= Citostoma. Figura 7A tomada de Docampo et al., 2005). Imágenes de la Figura 7B tomadas de Farina et al., 1986; Soares & de Souza, 1977; Souto-Pradrón et al., 1984; Souza, 2009.

tubulinas (α , β , γ , δ , ϵ y ζ) y múltiples miembros de proteínas presentes en centros organizadores de microtúbulos. A diferencia del citoesqueleto de microtúbulos, se identificó un repertorio reducido de proteínas de unión a actina, ninguna de ellas con propiedades de unión a microfilamentos. Además, en los tripanosomátidos solo se han encontrado dos clases de proteínas motoras de la familia de las miosinas, una perteneciente a una clase ampliamente distribuida en los eucariontes (miosina I) y una específica de linaje (miosina XXI). Estos análisis iniciales llevaron a proponer que durante la evolución de los tripanosomátidos se presentó una dependencia reducida del sistema de actina compensada por una elaboración del citoesqueleto de tubulina.

Tabla 3. Tamaño y contenido de genes de los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*.

Especie	Tamaño (Mb)	# genes
<i>T. cruzi</i>	60.37	12570
<i>T. brucei</i>	26.07	9068
<i>L. major</i>	32.81	8272

1.5.3.1. Familia de actinas en *T. cruzi*

En los genomas eucariontes generalmente se identifican genes que codifican para proteínas con una alta similitud en secuencia de aminoácidos a las actinas citoplasmáticas y musculares expresadas por los mamíferos. Estas proteínas se denominan actinas convencionales, y se considera que son las responsables de generar microfilamentos. En *T. cruzi*, 3 genes codifican para una actina idéntica que forma un clado con actinas convencionales de otros organismos (Figura 8A). Comparado con las actinas convencionales de humano y levadura, la secuencia de aminoácidos es similar en longitud (376 vs. 375 aminoácidos) y tiene una identidad del ~ 70%. En *T. cruzi* no se ha evaluado si esta proteína tiene las características bioquímicas de una actina convencional. Sin embargo, una versión recombinante de la secuencia ortóloga en *L. donovani* (identidad 89%) puede hidrolizar ATP y formar polímeros con características de microfilamentos en condiciones *in vitro* (Kapoor et al., 2008). Además, en esta misma especie la actina se observó asociada con el citoesqueleto de microtúbulos (Sahasrabudde et al., 2004), lo que es consistente con la presencia de formas poliméricas de la proteína *in vivo*. En *T. cruzi* sabemos que esta proteína se expresa constitutivamente y que genera al menos 5 isovariantes que son dependientes del estadio de desarrollo (Cevallos et al., 2011). Además, la proteína se localiza en la base del flagelo de los epimastigotes y en el citoplasma en un patrón similar al esperado para el aparato endocítico, así como también en parches a lo largo del flagelo (Figura 8B) (Cevallos et al., 2011; De Melo et al., 2008; Souza et al., 2013). No conocemos la relevancia biológica de las isovariantes ni de la localización en el flagelo. Sin embargo, se han observado fenotipos consistentes con una función en endocitosis al incubar epimastigotes con citocalasina B (Corrêa et al., 2008), una molécula que despolimeriza a los microfilamentos. El requerimiento de la actina en endocitosis ya fue demostrado usando ensayos de *knock-down* por RNA interferente en el estadio sanguíneo de *T. brucei* (García-Salcedo et al., 2004), así que es probable que el papel de la actina en este proceso sea un aspecto conservado en los tripanosomátidos.

La actina convencional generalmente se expresa junto con otros miembros de esta familia de proteínas. A estas subfamilias se les denomina proteínas relacionadas con actina o ARPs y se caracterizan por mantener el plegamiento general de la actina. Sin embargo, pueden ser divergentes en secuencia, localización y función. Las ARPs se originaron temprano en la evolución de los eucariontes, por lo que están ampliamente distribuidas. Otras proteínas de la familia de las actinas están restringidas a ciertos taxones, correspondiendo a duplicaciones génicas más recientes. A los productos de estos genes se ha propuesto llamarlos proteínas similares a actina o AcLs (Gordon & Sibley, 2005). En *T. cruzi*, búsquedas por similitud y análisis filogenéticos han identificado al menos 12 genes que codifican para miembros de la familia de las actinas, incluyendo una actina convencional (Figura 8A) (Cevallos et al., 2011). Tres de los genes restantes corresponden a subfamilias conservadas en otros eucariontes: ARP2, ARP3 y ARP6. ARP2 y ARP3 son dos de las siete subunidades del complejo nucleador de actina Arp2/3, y ARP6 es una proteína nuclear que forma parte de complejos remodeladores de la cromatina. El complejo Arp2/3 no ha sido caracterizado en ningún tripanosomátido, pero es probable que conserve su actividad en *T. cruzi* ya que se pueden identificar genes para todas las subunidades canónicas (De Melo et al., 2008). Lo mismo parece ocurrir con ARP6, que en *Leishmania donovani* se localiza en el núcleo y co-precipita con cromatina (Raza et al., 2007). De los demás genes de la familia de las actinas

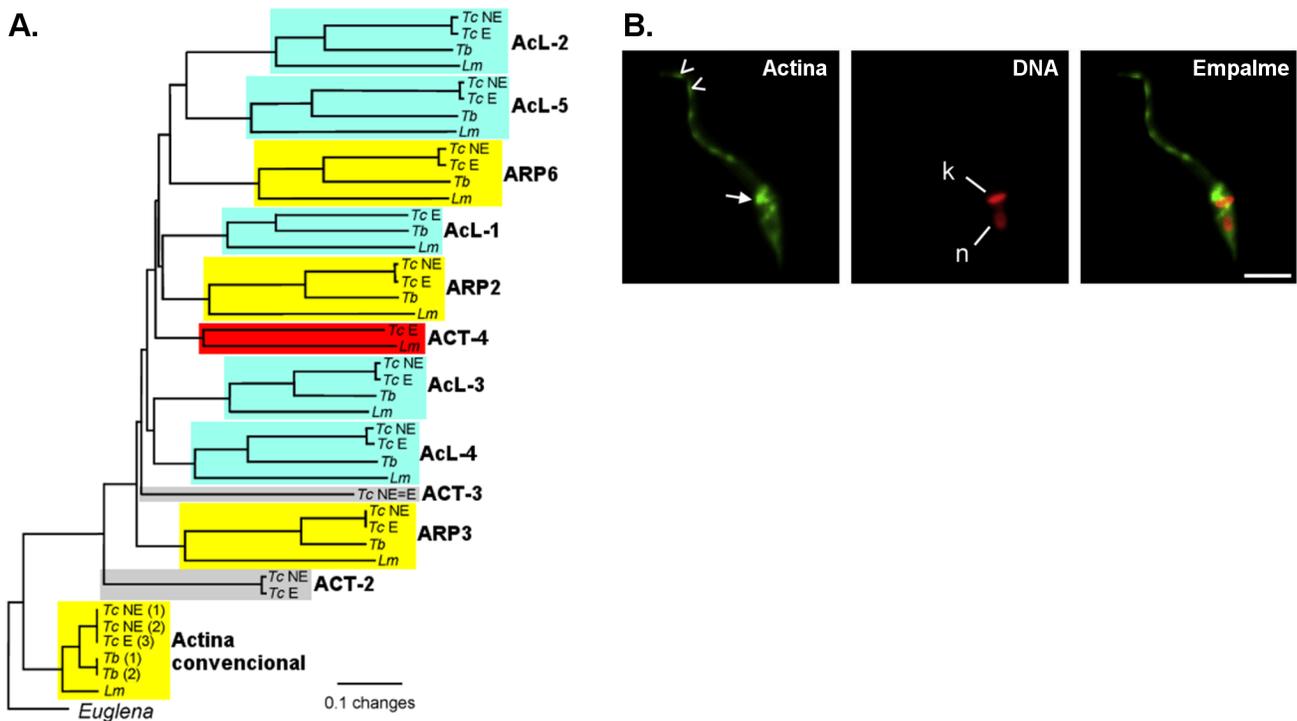


Figura 8. Familia de las actinas en *T. cruzi* **A.** Análisis filogenético de la familia de las actinas identificada en los tres tripanosomátidos modelo (Tc= *T. cruzi*, Tb= *T. brucei*, Lm= *L. major*). Para *T. cruzi* se incluyeron las secuencias de los haplotipos Esmeraldo (E) y No-Esmeraldo (NE) de la cepa de referencia CL-Brener. La actina de *Euglena* se usó como grupo externo. Se indica el número de secuencias incluidas en paréntesis y la distribución taxonómica de las proteínas en el siguiente código de colores: Amarillo= Conservadas en los eucariontes; Azul= Tc, Tb y Lm; Rojo= Tc y Lm; Gris= Tc. ACT= Actina; ARP= Proteína relacionada con actina; AcL= Proteína similar a actina **B.** Localización de la actina convencional en un epimastigote de *T. cruzi* por microscopía confocal. Se indica la concentración de actina en la base del flagelo (flecha) y los parches en el flagelo (punta de flecha). Se señala la posición del cinetoplasto (k) y el núcleo (n). Modificada de Cevallos et al., 2011.

identificados en *T. cruzi*, dos están ausentes en *T. brucei* y *L. major* y los seis restantes están presentes en las tres especies de tripanosomátidos modelo (con excepción de la actina 4, ausente en *T. brucei*). Datos no publicados de nuestro laboratorio demuestran que uno de los genes específicos de *T. cruzi* (anotado como actina 2) se expresa a lo largo del ciclo de vida del parásito. Además, la localización y comportamiento bioquímico de la proteína sugiere que su función es diferente a la de la actina convencional. El ortólogo de la proteína anotada como AcL-3 se localiza en la mitocondria de *L. donovani* y en el flagelo de *T. brucei* (Ersfeld & Gull, 2001; Singh et al., 2014). En nuestro conocimiento, ninguna de las demás proteínas de la familia de las actinas ha sido caracterizada.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los tripanosomátidos no se conoce con detalle la función y regulación del citoesqueleto de actina. Observaciones ultraestructurales han mostrado un citoesqueleto basado en microtúbulos (Gull, 1999). Además, inicialmente se reportó un repertorio reducido de proteínas de unión a actina en los análisis genómicos, llevando a sugerir una dependencia reducida del sistema de actina en estos organismos (Berriman et al., 2005). Sin embargo, búsquedas han identificado proteínas adicionales de la familia de las actinas, proteínas reguladoras de la formación de microfilamentos y miosinas en los genomas de estos organismos (Cevallos et al., 2011; De Melo et al., 2008; El-Sayed et al., 2005; Kollmar et al., 2012), particularmente en *Trypanosoma cruzi*. Por esta razón, pensamos que en *T. cruzi* la actina polimeriza en formas estructurales que no son detectadas por las técnicas de microscopia tradicionales y que participa en funciones no reconocidas a la fecha. Para detectar posibles regiones del parásito donde se podría presentar polimerización de actina e identificar proteínas que pudieran estar involucradas en su regulación y función, decidimos caracterizar uno de los elementos reguladores clave para la formación de los microfilamentos en los eucariontes: la profilina. De las proteínas de unión a actina identificadas en el genoma de *T. cruzi*, escogimos a la profilina ya que conocíamos de la expresión a nivel de mRNA del gen ortólogo a la profilina en la especie de tripanosomátido *Trypanosoma brucei* (Wilson & Seebeck, 1997). Este gen tiene además la capacidad de complementar una mutante negativa para profilina de levadura, sugiriéndonos que la profilina expresada por los tripanosomátidos puede interactuar con sus ligandos típicos y regular la dinámica de polimerización de la actina. En este trabajo, demostramos la expresión de la profilina en *T. cruzi*, estudiamos la localización subcelular de la proteína e identificamos por herramientas moleculares e *in silico* algunos de sus ligandos potenciales.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar la expresión de la profilina en *Trypanosoma cruzi* e identificar ligandos potenciales de la proteína en el parásito

3.2. Específicos

- Demostrar la expresión de la profilina en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*
- Determinar la localización subcelular de la profilina en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*
- Identificar ligandos potenciales de la profilina en *T. cruzi*
- Estudiar el papel de la profilina en la dinámica de polimerización de la actina en *T. cruzi*

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Estrategia experimental

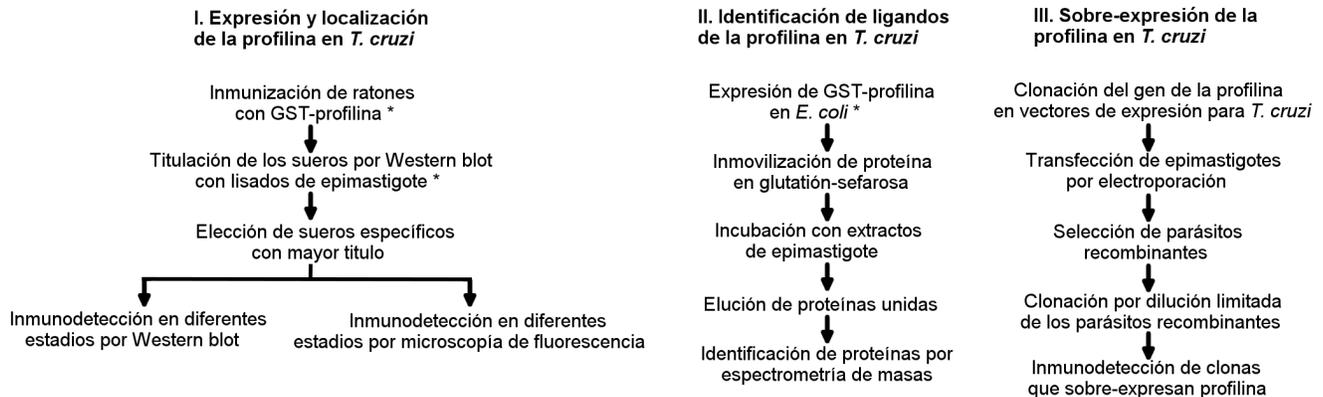


Figura 9. Diagrama de flujo de la estrategia experimental usada en la presente tesis. Se muestran las tres fases principales en las que se dividieron los experimentos realizados. Los asteriscos (*) indican los experimentos realizados como parte de una tesis de maestría previa (Osorio Méndez, 2012).

4.2.2. Análisis de secuencias de aminoácidos

Para identificar genes ortólogos a la profilina de *T. cruzi* en otras especies de tripanosomátidos, se realizaron búsquedas por BLASTP en la base de datos TriTrypDB (www.tritrypdb.org) usando la secuencia de aminoácidos de la profilina de *T. cruzi* como secuencia problema (TriTrypDB ID= TcCLB.458759.10). Se usaron los parámetros predeterminados para las búsquedas, usando como blanco las secuencias de proteína deducidas de los genomas de las 24 especies de tripanosomátidos disponibles. Para evaluar las secuencias de aminoácidos de las profilinas de los tripanosomátidos y de otros eucariontes, se descargaron las secuencias de UniProt (www.uniprot.org) y TriTrypDB (www.tritrypdb.org) en formato FASTA. Posteriormente, se cargaron en el servidor de Clustal Ω (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) para realizar alineamientos múltiples. Los alineamientos se inspeccionaron visualmente con ayuda del programa Jalview (Waterhouse et al., 2009) o por representaciones tipo Logo realizadas en el programa WebLogo (weblogo.berkeley.edu/logo.cgi). El modelo estructural de la profilina de *T. cruzi* se realizó por un método de homología usando el servidor del programa Phyre2 (Kelley et al., 2015). El modelo con la mayor puntuación fue descargado en formato PDB y cargado en el programa Chimera (Pettersen et al., 2004) para su análisis y para la generación de las representaciones del modelo.

Para identificar secuencias de proteínas con motivos de poli-prolina que pudieran interactuar con la profilina, se realizó una búsqueda en TriTrypDB (www.tritrypdb.org) usando la herramienta de Prosite. La búsqueda se realizó en las proteínas deducidas del genoma diploide de *T. cruzi* cepa CL-Brener usando como motivo problema una secuencia de 10 prolinas consecutivas (PPPPPPPPP). Las proteínas identificadas como posibles ligandos de la profilina por la estrategia descrita, así como por ensayos de co-purificación con GST-profilina (secciones 4.2.7. y 4.2.8.), se usaron para buscar dominios y motivos conservados

en los siguientes programas: Pfam (pfam.xfam.org/), Smart (smart.embl-heidelberg.de/), CDD (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) y Prosite (prosite.expasy.org/).

4.2.3. Crecimiento de parásitos

Se obtuvieron epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL-Brener en cultivo axénico a 28 °C usando medio LIT (Bone & Steinert, 1956) suplementado con suero fetal bovino 10 %, penicilina 60 µg/mL, estreptomycin 100 µg/mL y hemina 25 mg/L. Todos los experimentos se llevaron a cabo con epimastigotes en fase media logarítmica de crecimiento, la cual fue definida como una densidad celular de 10 - 20 x 10⁶ células/mL después de 3 – 4 días de crecimiento comenzando con un inóculo a una densidad de 1 – 2 x 10⁶ células/mL. Los tripomastigotes y amastigotes se obtuvieron infectando una línea celular HFF como se describió anteriormente (Cevallos et al., 2011). Las infecciones se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. Rebeca Manning del Cinvestav.

4.2.4. Inmunodetección por Western blot

Para la obtención de los extractos de proteína de *T. cruzi*, los parásitos fueron cosechados por centrifugación (1000 xg, 10 minutos, temperatura ambiente), lavados una vez en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4) y cosechados nuevamente. El paquete celular se resuspendió en tampón Laemmli 2X llevando a 0.5 x 10⁶ parásitos/µL y se calentó a 94 °C por 5 minutos. Para los ensayos realizados con epimastigotes, se cargaron 10 µL de extracto de proteína por carril. Los experimentos realizados con extractos de parásitos en estadio de tripomastigote y amastigote se llevaron a cabo con una cantidad similar de proteína, la cual fue evaluada visualmente en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Los extractos de proteína se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE. Para detectar proteínas menores a 20 kDa se usaron geles separadores al 12 o 15 %, y para las de mayor tamaño se usaron geles al 10 %. Los geles concentradores se prepararon al 4 %. La transferencia de las proteínas a membranas de PVDF se realizó en cámara húmeda por 1 hora a 350 mA en el cuarto frío (4 °C). Las soluciones y condiciones de corrida de los geles y de la transferencia de proteínas fueron los sugeridos por el fabricante (Bio-Rad). La transferencia correcta de las proteínas a las membranas fue verificada por tinción con rojo Ponceau (Sigma).

Las membranas con proteína de parásito se bloquearon con leche descremada al 5% preparada en una solución de Tritón X-100 al 0.05 % en PBS (PBS-T). Para los ensayos con anticuerpo anti-profilina se bloqueo toda la noche a 4 °C, y para los demás anticuerpos primarios por 2 horas a temperatura ambiente. Después de bloquear, se adicionó el anticuerpo primario disuelto en leche descremada al 2% en PBS-T, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-T por 5 minutos. Por último, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó como se describió anteriormente. En los experimentos en los que se usó fluorescencia para revelar la señal de la proteína de interés, el anticuerpo secundario estaba conjugado con una sonda Alexa-Fluor®. La señal quimioluminiscente se reveló incubando la membrana con el sustrato SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific) y exponiendo a placas autoradiográficas. La señal fluorescente se capturó en un equipo Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). El brillo y contraste de las las imágenes de

fluorescencia obtenidas se ajustaron en el programa ImageJ v. 1.49p. Las diluciones y anticuerpos usados se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Características y condiciones de los anticuerpos usados en los ensayos de inmunodetección por Western blot

Proteína	Dilución	IgG	Tipo	Origen	Anticuerpo secundario	Dilución
Profilina <i>T. cruzi</i> *	1:2000	Ratón	Policlonal	Osorio Méndez, 2012	Anti-IgG-HRP (Thermo, 31430)	1:10000
Actina <i>T. cruzi</i>	1:8000	Conejo	Policlonal	Cevallos et al., 2011	-Anti-IgG-HRP (Thermo, 31460) -Anti-IgG-Alexa® 594 (Molecular Probes, A21017)	-1:60000 -1:1000
Tubulina-α	1:100000	Ratón	Monoclonal	Sigma (T6199)	Anti-IgG-HRP (Thermo, 31430)	1:60000
Factor de elongación 1-α	1:32000	Ratón	Monoclonal	Millipore (05-235)	Anti-IgG-HRP (Thermo, 31430)	1:60000
mCherry	1:1000	Ratón	Monoclonal	Clontech (632543)	Anti-IgG-HRP (Thermo, 31430)	1:60000
Represor de tetraciclina	1:1000	Ratón	Monoclonal	Clontech (631131)	Anti-IgG-HRP (Thermo, 31430)	1:10000

* La composición y origen del anticuerpo se describe en el Anexo 1.

4.2.5. Inmunodetección por microscopía de fluorescencia

Los parásitos en los diferentes estadios de *T. cruzi* se cosecharon por centrifugación (1000 *xg*, 10 minutos, temperatura ambiente), se lavaron con un volumen de PBS y el paquete celular se resuspendió en paraformaldehído al 3.7 %. Las células se fijaron durante 10 minutos a 4 °C y posteriormente se adhirieron a portaobjetos silanizados por 10 minutos (Sigma). Después, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% por 5 minutos y se bloquearon con BSA al 2% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo anti-profilina en dilución 1:400 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. En algunos experimentos también se adicionó un suero policlonal contra la actina de *T. cruzi* generado en conejo a dilución 1:1000 (Cevallos et al., 2011). Después de incubar con los anticuerpos primarios, se realizaron de 3 a 5 lavados con BSA al 1% y se adicionaron anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y/o conejo conjugados con sondas fluorescentes Alexa-Fluor® 488 o 594 (Molecular Probes, A21020 y A21107). La incubación se realizó por 1 hora y se lavó como se describió anteriormente. Por último, el DNA se tiñó con TOTO®-3 o DAPI (Molecular Probes), y las muestras se montaron para fluorescencia usando medio de montaje marca Dako®. Todas las soluciones se disolvieron en PBS.

La captura de imágenes de fluorescencia de campo amplio se realizó en un microscopio Olympus BX-51 equipado con una cámara a color modelo Evolution VF Fast (Media Cybernetics) usando el programa QCapture v. 2.70.0. Las imágenes obtenidas se guardaron en formato TIFF a una profundidad de 8 bits para su posterior procesamiento. Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron en un microscopio Nikon A1R+ STORM ubicado en la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se tomaron imágenes apiladas en el plano Z y se escogieron aquellas que correspondieran aproximadamente al plano intermedio. La captura de imágenes de microscopía confocal se

realizó con la asesoría del Dr. Miguel Tapia. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo en el programa ImageJ v. 1.49p.

4.2.6. Fraccionamiento celular con detergentes

Realizamos fraccionamiento celular de epimastigotes usando Digitonina y Tritón X-100 basándonos en los protocolos descritos por Alonso et al., 2014 y Ramsby & Makowski, 2011. Para este fin, cosechamos 30 mL de cultivo de epimastigotes por centrifugación (1000 xg , 10 minutos, 4 °C) y lavamos las células dos veces con un volumen de PBS frío. Antes del último lavado se dividió el cultivo en 4 partes iguales y el paquete celular se resuspendió en 3 concentraciones de Digitonina (0.04 mM, 0.16 mM y 0.4 mM) disueltas en tampón de extracción (sacarosa 10%, NaCl 100 mM, PIPES 10 mM, MgCl₂ 6.7 μ M, EDTA 5 mM) suplementado con coctel de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche). Al cultivo restante se le adicionó tampón de extracción sin detergente. Se adicionó 1 mL de cada solución por cada 200 x 10⁶ células. Las células se incubaron a 28 °C por 20 minutos, se centrifugó (14000 xg , 2 minutos, 4°C) y se transfirieron los sobrenadantes (fracciones citoplasmáticas) a tubos nuevos. El precipitado celular se resuspendió en 1 volumen de tampón de extracción con Tritón X-100 al 0.5% y se incubó por 30 minutos a 4 °C con rotación. Las muestras se centrifugaron (5000 xg , 10 minutos, 4°C) y los sobrenadantes (fracciones membrana/organelos) se transfirieron a tubos nuevos. El precipitado final se resuspendió en un volumen de solución de SDS al 5% preparada en PBS para obtener la fracción de citoesqueleto/núcleo. Volúmenes equivalentes de cada fracción se analizaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y por inmunodetección por Western blot usando anticuerpos contra proteínas marcadoras de citoplasma (factor de elongación 1-alfa) y citoesqueleto (tubulina-alfa), así como contra la actina y la profilina de *T. cruzi*. Las condiciones de estos ensayos se describen en la sección 4.2.4.

4.2.7. Ensayos de co-purificación con GST-profilina

Para los ensayos de co-purificación de proteínas de *T. cruzi* con profilina recombinante, se indujo una cepa de *E. coli* BL-21 transformada con un vector de expresión (pGEX4T1) que codifica para una fusión de profilina con GST (GST-profilina) y otra que expresa la proteína GST sola. Los plásmidos y cepas de *E. coli* necesarias para expresar estas proteínas se obtuvieron en una tesis previa (Osorio Méndez, 2012). La inducción se realizó con IPTG 1 mM durante 1 hora a 37 °C partiendo de una OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.7. Las bacterias inducidas se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) en presencia de lisozima 100 μ g/mL por 30 minutos a temperatura ambiente con rotación. La proteína se solubilizó adicionado Tritón X-100 al 1% e incubando por 1 hora adicional. Posteriormente, las proteínas recombinantes fueron inmovilizadas por afinidad en una matriz de glutatión-sefarosa (GE Healthcare) durante 1 hora a temperatura ambiente. La matriz fue lavada tres veces con Tritón X-100 al 1 % disuelto en PBS para remover las proteínas bacterianas unidas inespecíficamente. Para producir los extractos de proteína de parásito, se cosecharon cultivos de 150 mL de epimastigotes en fase media logarítmica de crecimiento por centrifugación (1000 xg , 10 minutos, temperatura ambiente). Las células fueron lavadas en 1 volumen de PBS, resuspendidas en tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% en PBS) suplementado con coctel de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche). La lisis celular se realizó por 15 minutos en hielo. Después, el detrito celular se cosechó por centrifugación

(13000 \times g, 20 minutos, 4 °C) y la proteína soluble fue recuperada y cuantificada por el método DC (Bio-Rad) usando curvas estándar de BSA. Posteriormente, se adicionaron de 2 a 3 mg de proteína soluble a 100 - 200 μ L de matriz con GST-profilina o GST unida y se incubó toda la noche a 4 °C con rotación. Por último, se cosechó la matriz por centrifugación (1000 \times g, 5 minutos, temperatura ambiente), se lavó 5 veces con PBS mezclando por inversión y se eluyeron las proteínas unidas resuspendiendo en un volumen de tampón Laemmli 2X y calentando a 94 °C por 5 minutos. La presencia de proteínas en las muestras eluidas se evaluó en geles de SDS-PAGE al 12 % teñidos con nitrato de plata.

4.2.8. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida

Las muestras obtenidas de los ensayos de co-purificación descritos en la sección 4.2.7. se cargaron en geles de SDS-PAGE concentradores al 10 % y se corrieron por 5 - 10 minutos para permitir el ingreso de las proteínas en el gel. De esta forma, esperábamos obtener una única banda con todas las proteínas contenidas la muestra. Los geles concentradores se tiñeron con azul de Coomassie y la banda obtenida se cortó del gel y se envió al servicio de identificación de proteínas por espectrometría de masas de la Unidad de Proteómica de la Biosai, Facultad de Química, UNAM. Allí, las bandas se procesaron y analizaron de la siguiente manera. Primero, las porciones de gel se destiñeron con una solución de metanol 50 % y ácido acético 5 % por 12 horas y se lavaron con bicarbonato de amonio 100 mM por 15 minutos. Después, las muestras fueron reducidas con DTT 50 mM por 45 minutos, alquiladas con iodoacetamida 20 mM por 2 horas, deshidratadas con acetonitrilo 100 % y digeridas con 30 μ L de tripsina porcina 20 ng/ μ L por 18 horas a 37 °C. Los péptidos se extrajeron por sonicación en acetonitrilo 50 % y ácido fórmico 5 %, se resuspendieron en ácido fórmico 1 %, y se desalaron y concentraron en columnas Ziptip C18 usando acetonitrilo 3% y ácido fórmico 0.1% como la fase móvil. Finalmente, los péptidos se analizaron en un equipo de espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray modelo Synapt G2S (Waters) acoplado a cromatografía líquida.

La identificación de proteínas con los datos arrojados por el análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo en el programa ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters). Se usó a PLGS como algoritmo de búsqueda usando los parámetros para identificar proteínas digeridas con tripsina en un instrumento de tipo QTOF-MS/MS. Solo se consideraron aquellas proteínas que se identificaron con un nivel de confianza mayor al 95 %. Las búsquedas se llevaron a cabo en una base de datos de 19661 secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de *T. cruzi*. Las secuencias se descargaron en formato FASTA de la base de datos del genoma de los tripanosomátidos TriTrypDB (www.tritrypdb.org) en Septiembre de 2015. Se descargaron aquellas secuencias anotadas como pertenecientes a los alelos Esmeraldo, No-Esmerado y CL-Brener. Estos tres haplotipos son los derivados del genoma diploide de la cepa de referencia que usamos en el laboratorio (*T. cruzi* CL-Brener). La estrategia de identificación de ligandos de la profilina descrita en las secciones 4.2.7. y 4.2.8. se resume en la Figura 14.

4.2.9 Ensayos de viabilidad celular

Para determinar el efecto del inhibidor de las forminas SMIFH2 sobre la viabilidad de los epimastigotes, cosechamos parásitos cultivados en medio LIT por centrifugación (1000 \times g,

10 minutos, temperatura ambiente) y los resuspendimos en una solución de Dextrosa al 0.2 % diluida en PBS a una densidad de 30×10^6 células/mL. Después, adicionamos SMIFH2 a diferentes concentraciones e incubamos las células por 1 hora a 28 °C. Posteriormente, transferimos las células a cajas de 96 pozos que contenían 20 μ L del sustrato colorimétrico MTS (Abcam, ab197010). Se adicionaron 200 μ L de células por pozo (6×10^6 células), realizando triplicados de cada condición. Se agitó la caja por 5 segundos y se incubó a 28 °C durante 2 - 3 horas adicionales. Por último, se agitó nuevamente y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas iMark (Bio-Rad). La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de la absorbancia observada en las células sin tratar con respecto a las células tratadas con SMIFH2 o con el vehículo de la droga (DMSO 0.28 %). El inhibidor SMIFH2 fue comprado de Sigma (S4826). Una vez en solución, la actividad biológica de SMIFH2 se pierde rápidamente (Isogai et al., 2015), por lo que se realizaron alícuotas de único uso que se almacenaron a - 70 °C por un máximo de 2 semanas.

4.2.10. Construcción de plásmidos

Para la construcción de los plásmidos usados en este trabajo, primero se amplificaron los genes de interés por PCR usando DNA genómico (100 - 200 ng) de *T. cruzi* como molde. El DNA genómico se aisló de epimastigotes de *T. cruzi* usando el método descrito por Medina-Acosta & Cross, 1993. Los genes amplificados y los oligonucleótidos usados como iniciadores están listados en la Tabla 5. A cada juego de oligonucleótidos se le adicionaron secuencias de corte para las enzimas de restricción adecuadas, asegurándonos de mantener el marco de lectura y de evitar codones de inicio crípticos corriente arriba en los vectores de expresión usados. Se usaron DNA polimerasas de alta fidelidad en todas las reacciones. Los amplificados de PCR se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega), y los plásmidos recombinantes se aislaron y digirieron con las enzimas de restricción adecuadas para obtener el inserto de interés. Los insertos y vectores digeridos se purificaron de gel de agarosa usando columnas comerciales (Promega), se cuantificaron en gel de agarosa y se ligaron usando Ligasa T4 usando las condiciones sugeridas por el fabricante (Invitrogen). Por último, se transformaron *E. coli* JM109 competentes con el método Inoue (Sambrook & Russell, 2006) y se seleccionó con el antibiótico apropiado para el vector. Las clonas obtenidas se analizaron por PCR de colonia y/o análisis de restricción para determinar la presencia del inserto. Los insertos de todos los plásmidos usados en este estudio se corroboraron por secuenciación.

4.2.11. Transfección de epimastigotes

Se transfectaron epimastigotes con diferentes vectores para la expresión para *T. cruzi* (Tabla 6). Para este fin, se cosecharon las células por centrifugación (1000 xg , 10 minutos, 4 °C), se lavaron una vez en un volumen de medio LIT frío y se cosecharon nuevamente. El paquete celular se resuspendió en medio LIT frío y se transfirieron 20 - 50 $\times 10^6$ células en 350 μ L a celdas de electroporación de 2 mm marca BTX (01-000195-01). Posteriormente, se adicionó la cantidad indicada del vector de expresión en un volumen final de 50 μ L (Tabla 6), se mezcló con las células y se incubó en hielo por 5 minutos. Se le dio a cada celda un pulso en un electroporador modelo BTX Electro Cell Manipulator 600 con las siguientes condiciones: 360 V, 1500 μ F, 13 ohms. Por último, se mantuvieron las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente, se transfirieron las células a cajas de cultivo con 5 - 10 mL

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos usados como iniciadores en las reacciones de PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa GeneRunner (www.generunner.net/). En cursiva y subrayados se los indican sitios de corte para enzimas de restricción adicionados a cada oligonucleótido.

Gen amplificado	Oligonucleótidos	Vector de destino
Profilina	Directo: <u>GGATCC</u> ATGTCGTGGCAGGCGTATATCGATGACAG Reverso: <u>GATATC</u> CGTAATCCAACTGATAAGATACTCAGCGATCCGTTTC	pTcINDEX-C-myc (Taylor & Kelly, 2006)
EGFP*	Directo: <u>GGATCC</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC Reverso: <u>GATATC</u> CTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCC	pTcINDEX-C-myc (Taylor & Kelly, 2006)
Profilina	Directo: <u>GGATCC</u> GATGTCGTGGCAGGCG Reverso: <u>GAATTC</u> TTAGTAATCCAACTGATAAG	pRiboTEX (Martínez-Calvillo et al., 1997)

* Amplificado a partir de un plásmido construido en nuestro laboratorio (Guerrero-Sánchez et al., 2015).

de medio LIT complementado como se indicó en la sección 4.2.2 y se incubaron a 28 °C. El antibiótico de selección adecuado se adicionó 24 - 48 horas después de la electroporación. El crecimiento celular de los parásitos recombinantes típicamente se observó después ~ 30 días de selección. Los parásitos recombinantes obtenidos con el vector pRiboTEX-profilina se clonaron por dilución limitada. Para este fin, se llevaron cultivos a una densidad a la cual se obtuvieran aproximadamente 6 células por cada 9.6 mL de volumen. Estos inóculos se sembraron en cajas de 96 pozos (100 µL por pozo) y se incubaron a 28 °C hasta observar crecimiento en el microscopio invertido. La sobreexpresión de la profilina en las clonas obtenidas de esta forma se evaluó por inmunodetección por Western blot usando nuestro anticuerpo anti-profilina (sección 4.2.4.). Para estos experimentos se cargó la proteína derivada del mismo número de parásitos por cada carril (5 x 10⁶ parásitos). La cantidad de proteína se evaluó visualmente en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie que se corrieron en paralelo a los usados para llevar a cabo los ensayos de Western blot.

Tabla 6. Vectores de expresión para *T. cruzi* usados en este trabajo

Vector	Proteína expresada	DNA	Antibiótico	Referencia
pRiboTEX	Plásmido vacío	50 µg	G418 300 µg/mL	Martínez-Calvillo et al., 1997
pRiboTEX-mCherry-profilina	mCherry-profilina	50 µg	G418 300 µg/mL	Osorio Méndez, 2012
pRiboTEX-profilina	Profilina	50 µg	G418 300 µg/mL	Este trabajo
pLEW13	TetR y RNA pol T7	10 µg	G418 500 µg/mL	Wirtz et al., 1999
pTcINDEX	Plásmido vacío	10 µg *	Hyg 100 µg/mL	Taylor & Kelly, 2006
pTcINDEX-RFP	RFP	10 µg *	Hyg 100 µg/mL	Taylor & Kelly, 2006
pTcINDEX-EGFP-myc	EGFP-myc	10 µg *	Hyg 100 µg/mL	Este trabajo
pTcINDEX-profilina-myc	Profilina-myc	10 µg *	Hyg 100 µg/mL	Este trabajo

* Linearizado con *Spe I*

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de secuencia de la profilina de los tripanosomátidos

Identificamos por búsquedas de BLAST una secuencia homóloga a la profilina en el cromosoma 35 de *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener. Encontramos además genes ortólogos a esta secuencia en las 24 especies de tripanosomátidos con secuencias genómicas disponibles al inicio de este trabajo. En estos parásitos la profilina se encuentra codificada por genes de única copia, con la excepción de *T. vivax* que posee dos copias dispuestas en tándem. Todos los genes tienen la misma longitud (150 aminoácidos), poseen un peso molecular similar (~ 16 kDa) y tienen una identidad en secuencia de aminoácidos mayor al 74 % (Anexo 2). En un modelo de la estructura 3D generado por homología, la profilina de *T. cruzi* adopta el plegamiento típico reportado para otras profilinas (e.g. Schutt et al., 1993; Thorn et al., 1997), que consiste en un núcleo de 7 hojas β plegadas rodeadas por 4 hélices α (Figura 10A). Un alineamiento múltiple muestra que los aminoácidos involucrados en la interacción con actina están poco conservados (Figura 10B). Solo 5 de los 21 aminoácidos presentes en este dominio muestran similitud con las profilinas de humano y levadura. Por el contrario, la mayoría de residuos involucrados en la interacción con poliprolinas son idénticos. En un análisis ya publicado se reportó una inserción de 19 aminoácidos en la mitad C-terminal de la secuencia de la profilina de *T. brucei* (Wilson & Seebeck, 1997). En nuestro modelo teórico de la estructura 3D, esta inserción se pliega parcialmente como una hélice α (Figura 10A). Esta inserción se encuentra en las 25 secuencias de profilina identificadas en las 24 especies de tripanosomátidos examinadas, y posee la misma longitud y localización (posiciones 110 – 128). Además, presenta un mayor grado de conservación en la parte N-terminal (Figura 10C), la cual presenta un enriquecimiento en aminoácidos polares. En esta región también llama la atención la alta conservación de dos leucinas (L115 y L119), de dos ácidos aspárticos (D111 y D118) y de una lisina (K121). Los últimos 7 residuos de la inserción son variables (posiciones 122 - 128). Búsquedas con algoritmos de identificación de motivos conservados no arrojaron similitud de la inserción de la profilina de los tripanosomátidos con ninguna secuencia con función conocida.

5.2. La profilina se expresa en diferentes estadios de *T. cruzi*

En una tesis previa obtuvimos sueros policlonales contra la profilina de *T. cruzi* inmunizando ratones con una versión de la proteína fusionada a GST expresada en *E. coli* y purificada por afinidad (Osorio Méndez, 2012). De los sueros inmunes obtenidos seleccionamos dos para estudios adicionales. Estos dos sueros identifican una única banda del tamaño esperado para la profilina en extractos totales de epimastigotes y lo hacen con mayor intensidad que los demás (Anexo 1). Estos dos sueros se mezclaron en una relación 1:1, mezcla que llamamos anticuerpo anti-profilina de ahora en adelante. Con nuestro anticuerpo anti-profilina realizamos ensayos de inmunodetección por Western blot usando un extracto total de *E. coli* que expresaba una profilina recombinante fusionada a la MBP obtenida en un trabajo previo (Osorio Méndez, 2012). El anticuerpo anti-profilina detecta a la MBP-profilina recombinante (Figura 11A), pero no a la MBP sola. Dado que los anticuerpos se generaron contra una fusión con la GST, esto confirma el reconocimiento de epitopes de la profilina por parte de

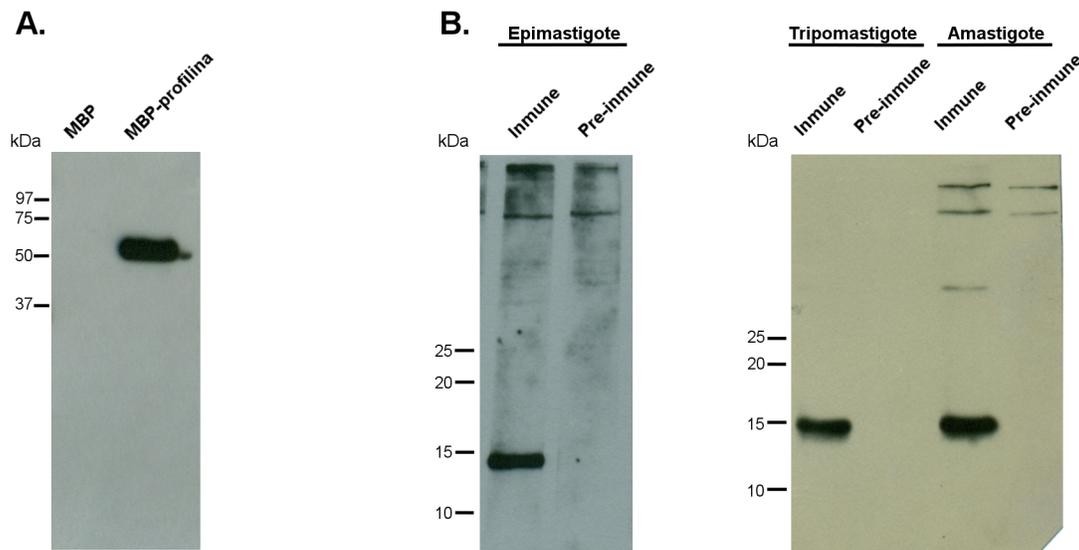


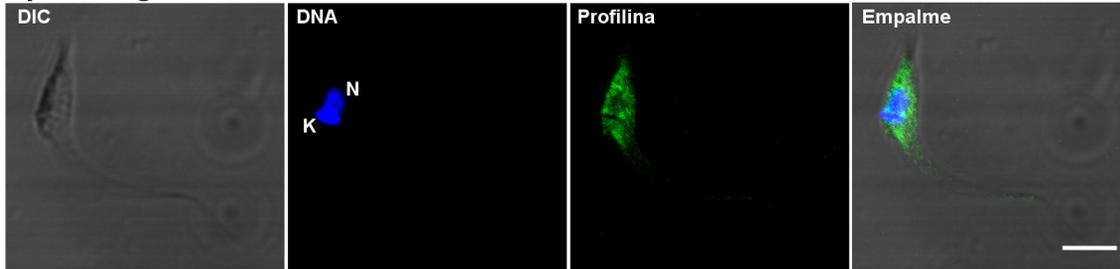
Figura 11. Expresión de la profilina en diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi* por ensayos de Western blot **A.** Caracterización del anticuerpo anti-profilina usando extractos totales de *E. coli* expresando la fusión MBP-profilina (59 kDa) y la etiqueta MBP sola (50 kDa) **B.** Identificación de la profilina nativa (16 kDa) por parte del anticuerpo anti-profilina en extractos totales de tres estadios de desarrollo del parásito. Se incluyen ensayos con una mezcla 1:1 de los sueros pre-inmunes como control, los cuales se usaron a la misma dilución (1:2000) y tiempo de exposición a la placa autoradiográfica (5 minutos).

5.3. La profilina se expresa como una proteína citoplasmática y asociada al citoesqueleto en *T. cruzi*

Para determinar la localización subcelular de la profilina en *T. cruzi*, realizamos ensayos de inmunolocalización por microscopía confocal usando nuestro anticuerpo anti-profilina. Antes de llevar a cabo estos experimentos, realizamos observaciones por microscopía de fluorescencia de campo amplio usando nuestro anticuerpo anti-profilina y los respectivos controles pre-inmunes (Anexo 3). Bajo las mismas condiciones de captura de imagen y dilución de anticuerpo primario y secundario, solo observamos señal de fondo con el control preinmune con respecto al anticuerpo anti-profilina. Lo anterior descarta el reconocimiento de epitopes estructura terciaria en los parásitos por anticuerpos presentes antes de la inmunización de los ratones con la profilina recombinante. En microscopía confocal el anticuerpo anti-profilina detecta a la proteína de manera difusa a lo largo del cuerpo celular en los epimastigotes (Figura 12, panel superior). En células humanas de la línea HFF infectadas con amastigotes intracelulares el anticuerpo detecta exclusivamente a los parásitos (Figura 12, panel inferior), lo que sugiere que no reconoce epitopes de estructura terciaria presentes en la profilina humana o en otra proteína de la célula hospedera. De manera similar a los epimastigotes, en los amastigotes intracelulares observamos la señal de la profilina de manera difusa en el citoplasma. En tripomastigotes derivados de células infectadas no logramos detectar señal suficiente para analizar la localización de la profilina. En este estadio la señal fluorescente observada con nuestro anticuerpo fue débil en comparación con los amastigotes (Anexo 4). Probamos varias condiciones de permeabilización como estrategia para solucionar este problema, pero no tuvimos éxito. Nuestros datos de inmunolocalización son consistentes con una distribución

predominantemente citoplasmática de la profilina en los epimastigotes y amastigotes intracelulares.

Epimastigotes



Células HFF infectadas con amastigotes

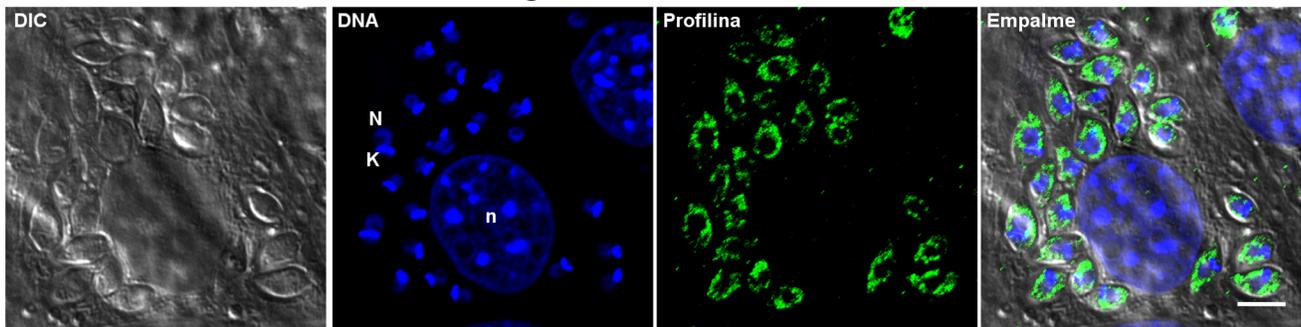


Figura 12. Inmunolocalización de la profilina en dos estadios de desarrollo *T. cruzi* por microscopía confocal. Para cada estadio se muestra una única sección seleccionada de la porción intermedia de varios planos capturados en Z. El DNA se tiñó con DAPI, que revela la localización del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) de cada parásito. Para los amastigotes intracelulares se señala además la posición del núcleo de la célula hospedera (n). Cada sección corresponde a un plano de 0.4 μm de espesor. Barra de escala = 5 μm .

Para caracterizar la distribución subcelular de la profilina con más detalle realizamos fraccionamientos celulares con detergentes de epimastigotes. Para esto, primero incubamos los parásitos con diferentes concentraciones de Digitonina, detergente que libera el contenido del citoplasma de los epimastigotes (Alonso et al., 2014). Posteriormente, adicionamos al precipitado Tritón X-100 para obtener una fracción enriquecida con proteínas de membrana y un precipitado formado principalmente por proteínas insolubles con elementos del citoesqueleto y la matriz nuclear (Ramsby & Makowski, 2011). Con este procedimiento obtuvimos fracciones de proteína electroforéticamente distinguibles (Figura 13A), que analizamos por ensayos de Western blot con anticuerpos contra proteínas marcadoras de citoplasma (factor de elongación 1-alfa, EF1- α) y citoesqueleto (tubulina-alfa, Tub- α). No contamos con un anticuerpo adecuado para analizar el enriquecimiento de proteínas de membrana en *T. cruzi*. Como esperábamos, detectamos el EF1- α específicamente en las fracciones incubadas con Digitonina (Figura 13B). Por su parte, la Tub- α se enriqueció en las fracciones solubles en Tritón X-100 y principalmente en el material insoluble, con solo una pequeña porción detectada en las fracciones solubles en Digitonina. Obtuvimos resultados similares con las 3 concentraciones de Digitonina probadas. De acuerdo con estos dos marcadores, obtuvimos fracciones enriquecidas con proteínas de citoplasma (solubles en Digitonina) y en componentes del citoesqueleto (insolubles en Digitonina-Tritón). Analizamos la distribución de la actina y de la profilina en estas fracciones. La actina se enriqueció en las

fracciones solubles en Digitonina, aunque también fue detectada en las dos restantes con menor intensidad. Detectamos a la profilina en las fracciones solubles en Digitonina y, en menor medida, en el material insoluble. No observamos señal de la profilina en las fracciones solubles en Tritón (Figura 13B). Nuestros resultados sugieren que la mayor parte de la profilina y de la actina en los epimastigotes se encuentra en forma soluble en el citoplasma. Además, identificamos una porción minoritaria de la profilina asociada al citoesqueleto y/o núcleo.

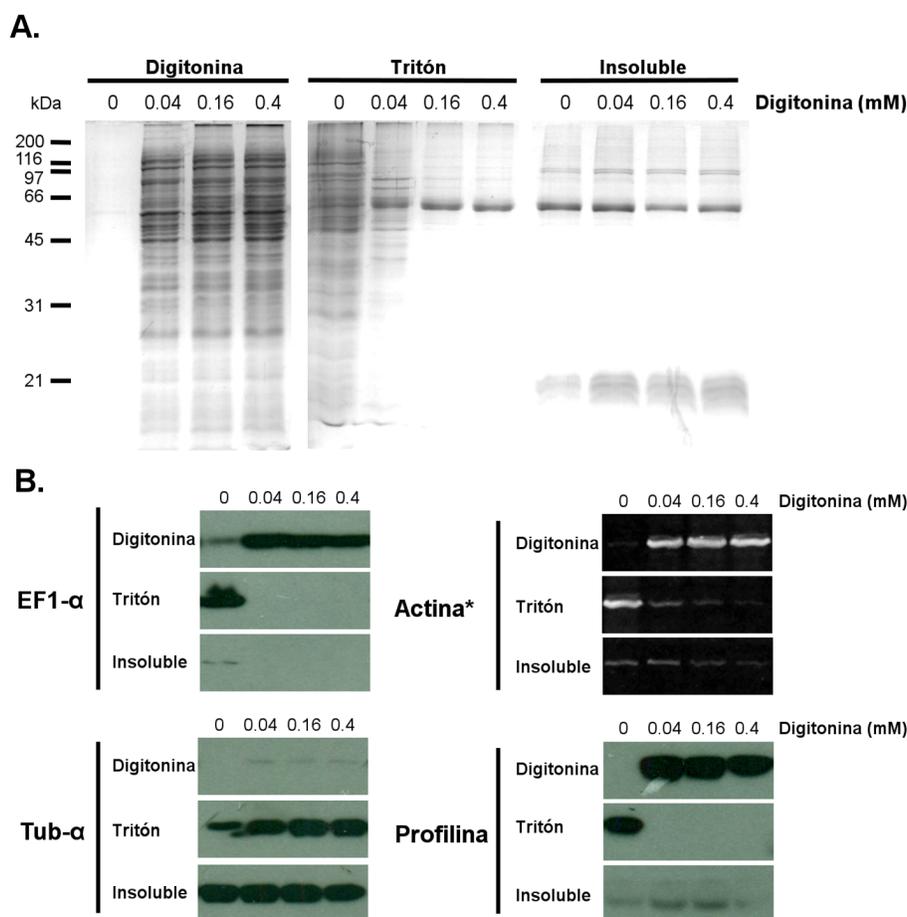


Figura 13. Fraccionamiento celular con detergentes de epimastigotes en *T. cruzi* **A.** Análisis por SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie de las fracciones solubles en Digitonina y Tritón X-100 y del material insoluble **B.** Inmunodetección por Western en las fracciones obtenidas de proteínas marcadoras de citoplasma (EF1-α) y citoesqueleto (tubulina-α), así como de la actina y la profilina de *T. cruzi*. * Ensayo de Western blot revelado con fluorescencia. Se cargaron volúmenes equivalentes de muestra en todos los carriles.

5.4. La profilina co-purifica con actina, tubulina y proteínas no citoesqueléticas *in vitro*

Para identificar ligandos potenciales de la profilina en *T. cruzi* realizamos ensayos de co-purificación de extractos de proteína de epimastigotes con GST-profilina. La estrategia usada para llevar a cabo estos experimentos fue la siguiente (Figura 14). Primero, expresamos GST-profilina en *E. coli* y la inmovilizamos por afinidad en glutatión-sefarosa. Para descartar las proteínas unidas a GST y no a la porción de profilina se inmovilizó también a GST como

control. Posteriormente, la glutatión-sefarosa con la proteína recombinante unida se incubó con extractos de proteína de epimastigote, y después se recuperó y se lavó para remover proteínas unidas inespecíficamente. El material unido a la glutatión-sefarosa se eluyó por calor y se evaluó la presencia de proteínas por electroforesis en geles de SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata. Por otro lado, se concentraron muestras por electroforesis en geles de SDS-PAGE concentradores en los que se buscaba obtener una única banda con la proteína recombinante y todas las proteínas de *T. cruzi* unidas a ella durante la incubación con los extractos del parásito. La banda obtenida de esta forma se tiñó con azul de Coomassie, se cortó del gel y se envió a un servicio de identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem. Allí, las proteínas se digirieron con tripsina y los péptidos se extrajeron del gel. Los péptidos obtenidos se separaron por cromatografía líquida, se sometieron a espectrometría de masas y los datos de masa/carga se usaron para la identificación de las proteínas por una estrategia de huella peptídica. Para este fin, se usó como base de datos de búsqueda a las secuencias de aminoácidos deducidas del proyecto genoma de *T. cruzi* CL-Brener, la cepa de trabajo que usamos en el laboratorio. Se descartaron como posibles ligandos de la profilina aquellas proteínas de *T. cruzi* identificadas en los ensayos con GST-profilina y en los controles con GST. La metodología detallada se describe en las secciones 4.2.7. y 4.2.8. de Material y Métodos.

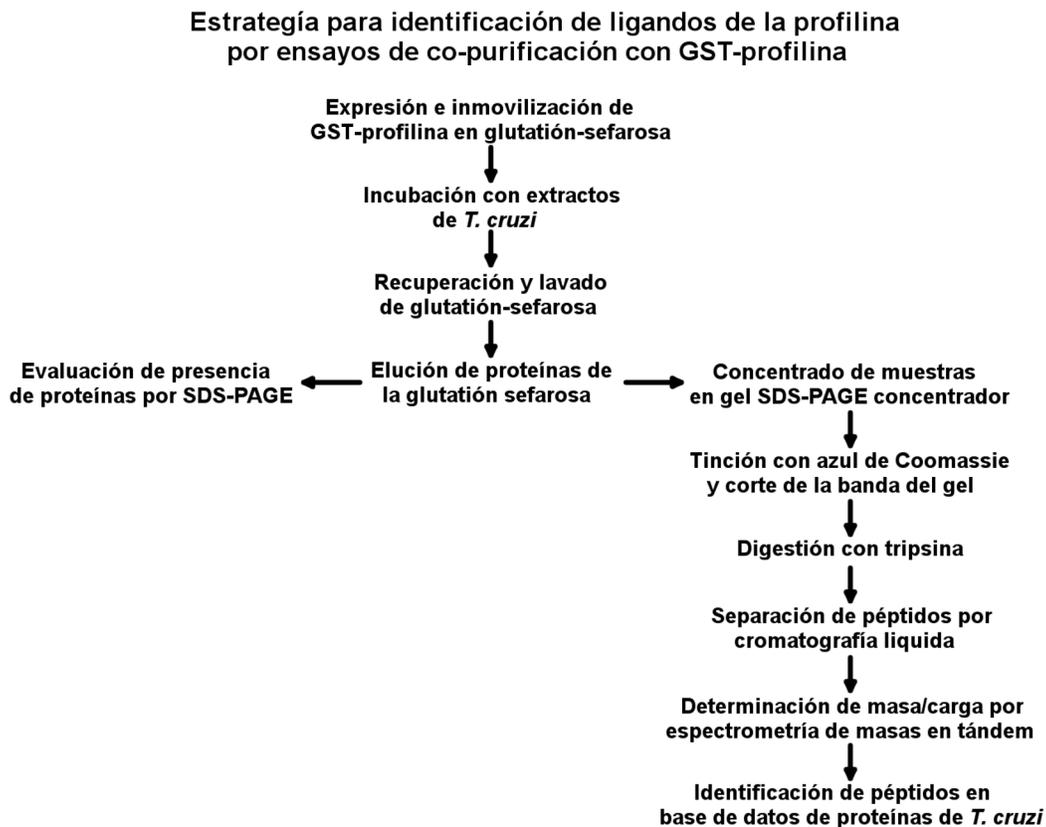


Figura 14. Estrategia de identificación de posibles ligandos de la profilina de *T. cruzi* usando ensayos de co-purificación con GST-profilina.

En los eluidos después de la incubación con los extractos de *T. cruzi* observamos varias bandas con los ensayos con GST-profilina que no se detectaron en los controles con GST (Figura 15A). De manera similar, observamos pocas bandas de origen bacteriano, además de las proteínas recombinantes, antes de la incubación de la glutatión-sefarosa con los extractos de proteína de epimastigote. Este patrón electroforético nos sugirió que varias proteínas del parásito se unieron de manera específica a la porción de la profilina durante la incubación con extractos de epimastigote. Siguiendo la estrategia descrita anteriormente (Figura 14), enviamos a un servicio de identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem dos muestras independientes de ensayos de co-purificación con GST-profilina y GST. En total, identificamos 23 proteínas de *T. cruzi* exclusivamente en los ensayos realizados con GST-profilina, los cuales fueron clasificados de acuerdo a su localización o función deducida (Figura 15B). Estos posibles ligandos de la profilina son listados en la Tabla 7. La identificación de todas las proteínas está soportada por dos o más péptidos y por un nivel de confiabilidad mayor al 95 % de acuerdo al algoritmo de búsqueda del programa PLGS (Anexo 5). Siete de las proteínas se identificaron en los dos experimentos. De estas, la profilina se detectó con mayor confiabilidad en cuanto a cobertura y número de péptidos, lo cual es de esperarse debido a que la GST-profilina se presenta con gran abundancia en la muestra. Otras cuatro de las proteínas identificadas en los dos experimentos corresponden a ligandos conocidos de la profilina en otros organismos: actina (Witke, 2004), las tubulinas α y β (Nejedla et al., 2016) y el factor de elongación 1-alfa (Umikawa et al., 1998). Las dos proteínas restantes corresponden a una proteína mitocondrial y una metaloproteasa. De las proteínas identificadas en un solo experimento, diez son específicas de tripanosomátidos (Figura 15B). Una de ellas es el ortólogo de la proteína de superficie del glicosoma de *T. brucei* Gim5A (Maier et al., 2001). Otras cuatro corresponden a la familia multigénica RHP, proteínas asociadas a retrotransposones cuya función no ha sido explorada. Las cinco secuencias restantes están anotadas como hipotéticas. De las proteínas adicionales, dos son del metabolismo de carbohidratos y una es una metaloproteasa.

5.5. El genoma de *T. cruzi* codifica para otros posibles ligandos de la profilina

Los ligandos proteicos típicos de la profilina son la actina y proteínas con regiones ricas en prolina presentes en otros reguladores de la actina. En nuestros ensayos de co-purificación con GST-profilina identificamos a la actina, pero no proteínas con motivos de poli-prolina en su secuencia. Esto a pesar del alto grado de conservación de los aminoácidos del dominio de unión a poli-prolinas en la profilina de *T. cruzi* (Figura 16A). Por esta razón, decidimos buscar posibles ligandos de esta naturaleza en las proteínas deducidas de la secuencia genómica de *T. cruzi* CL-Brener. Por estudios con péptidos de poli-prolinas sintéticos se ha determinado que se requieren 10 o más prolinas consecutivas para una interacción de alta afinidad con la profilina (Perelroizen et al., 1994). Identificamos 35 secuencias con motivos de este tipo, la mayoría pertenecientes a familias multigénicas grandes codificadas en el genoma del parásito (DFG-1 y MASP) y a proteínas anotadas como hipotéticas (Figura 16B y Anexo 6). Tres de las secuencias restantes están anotadas como nucleadores de actina de la familia de las forminas y una como un miembro de la familia WASH de factores promotores de la nucleación del complejo Arp2/3 (TcCLB.510241.40). Dos de estas secuencias

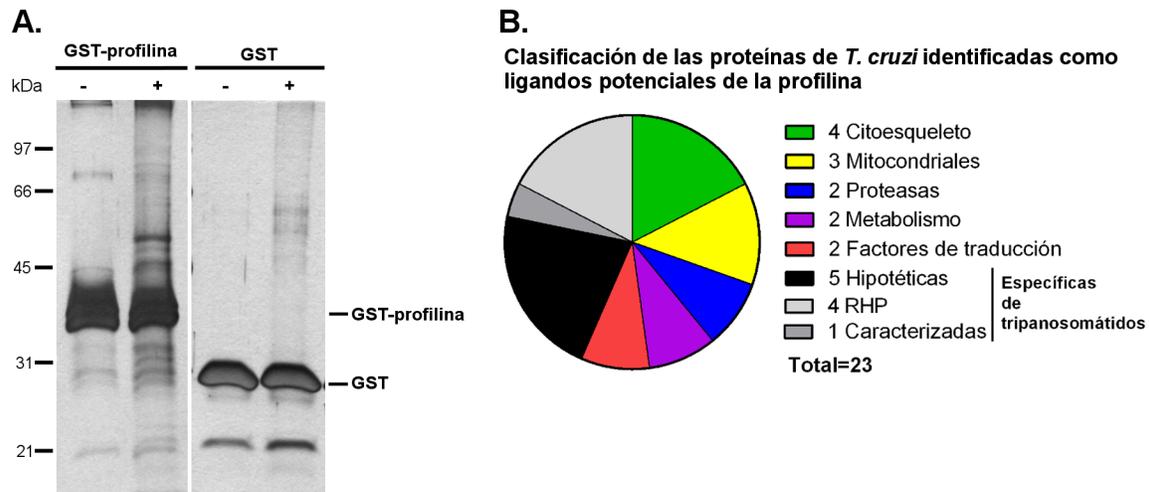


Figura 15. Proteínas de *T. cruzi* que co-purifican con GST-profilina identificadas por espectrometría de masas en tándem **A.** Análisis de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de un ensayo de co-purificación representativo. Se analizan muestras de experimentos usando GST-profilina (42 kDa) y GST (26 kDa), las cuales se eluyeron de la glutatión-sefarosa antes (-) y después (+) de la incubación con los extractos de proteína de *T. cruzi* **B.** Gráfica de pastel donde se indican el número de proteínas de *T. cruzi* detectadas de acuerdo a la función o localización deducida de su anotación. Se indica el número de proteínas presente en cada grupo.

(TcCLB.511755.80 y TcCLB.508641.320) se identificaron en una búsqueda anterior y se nombraron Forminas A y B (De Melo et al., 2008). Otra secuencia (TcCLB.510187.230) está anotada erróneamente como formina en la base de datos, por lo que la consideramos una secuencia hipotética. Buscamos motivos de poli-prolina en otras proteínas de unión a actina reportadas en la literatura (Berriman et al., 2005; De Melo et al., 2008; Ono, 2013). Identificamos regiones de poli-prolina en un tercer miembro de la familia de las forminas llamado Formina C (TcCLB.511393.30) y en una homóloga a CAP (TcCLB.504137.80). Los motivos de poli-prolina presentes en estas proteínas varían en número, longitud y localización en la secuencia de aminoácidos, y en ocasiones están interrumpidos por otros residuos (Tabla 8). En conclusión, identificamos 37 secuencias con motivos de poli-prolina que podrían servir como sustrato para la interacción con profilina, incluyendo 5 proteínas de unión a actina.

5.6. Efectos de la inhibición de las forminas en los epimastigotes

De las 5 proteínas de unión a actina con motivos de poli-prolina decidimos caracterizar con más detalle a las 3 pertenecientes a la familia de las forminas. Las Forminas A y B se encuentran conservadas en *T. brucei* y *L. major*, y la Formina C es exclusiva de *T. cruzi* (Tabla 9). El análisis de las secuencias sugiere que las tres proteínas poseen un dominio de unión a actina FH-2 precedido de una región FH-1 con motivos de poli-prolina para reclutar profilina:actina (Figura 17A). Las Forminas B y C poseen además dominios accesorios en el extremo N-terminal. La Formina B tiene un sitio de unión a PI(4,5)P₂ llamado PTEN-like, y la Formina C un dominio autoinhibidor GBD-FH-3. Se ha reportado un inhibidor comercial de las forminas llamado SMIFH2 (Rizvi et al., 2009). Como estrategia inicial para caracterizar la función de estas proteínas en *T. cruzi*, incubamos epimastigotes con diferentes

Tabla 7. Proteínas de *T. cruzi* que co-purifican GST-profilina identificadas por huella peptídica usando datos derivados de espectrometría de masas en tándem. Las proteínas identificadas en los dos ensayos realizados se muestran en negrita. Solo consideramos aquellas proteínas que se identificaron en ninguno de los ensayos control con GST. La confiabilidad de identificación de cada proteína se muestra en el Anexo 5.

#	TriTrypDB ID	Anotación	Función/localización deducida
Citoesqueleto			
1	TcCLB.458759.10	Profilin	Polimerización de actina
2	TcCLB.510571.30	Actin	Microfilamentos
3	TcCLB.411235.9	Alpha-tubulin	Microtúbulos
4	TcCLB.506563.40	Beta-tubulin	
Mitocondria			
5	TcCLB.506211.160	ADP ATP carrier protein 1	Transporte, membrana interna mitocondria
6	TcCLB.508741.229	Mitochondrial outer membrane protein porin	Transporte, membrana externa mitocondria
7	TcCLB.507029.30	Heat shock 70 kDa protein	Plegamiento de proteínas
Metabolismo			
8	TcCLB.506297.190	Pyruvate phosphate dikinase	Metabolismo de carbohidratos
9	TcCLB.510105.100	UDP glucose dehydrogenase	
Proteasas			
10-11	TcCLB.510837.9, TcCLB.509213.120	Peptidase M20/M25/M40 superfamily	Metaloproteasas
Factores de traducción			
12	TcCLB.511369.30	Elongation factor 1-alpha	Síntesis de proteínas, unión a actina
13	TcCLB.511585.190	Initiation factor 4-alpha	Síntesis de proteínas
Específicas de tripanosomátidos			
14	TcCLB.507009.10	Gim5A	Superficie del glicosoma en <i>T. brucei</i> (Maier et al., 2001)
15-18	TcCLB.507555.80, TcCLB.508285.10, TcCLB.509815.10, TcCLB.506845.60	Retrotransposon hot spot protein family	Asociado con regiones subteloméricas en <i>T. brucei</i> (Bringaud et al., 2002)
19	TcCLB.507771.30	Hypothetical	Motivo HIT <i>zinc finger</i> (Pfam: PF04438)
20	TcCLB.504019.3	Hypothetical	Dominio ATPasa (CDD: COG1196)
21	TcCLB.504137.50	Hypothetical (fragment)	Desconocido
22	TcCLB.508221.220	Hypothetical	Desconocido
23	TcCLB.506507.20	Hypothetical	Desconocido

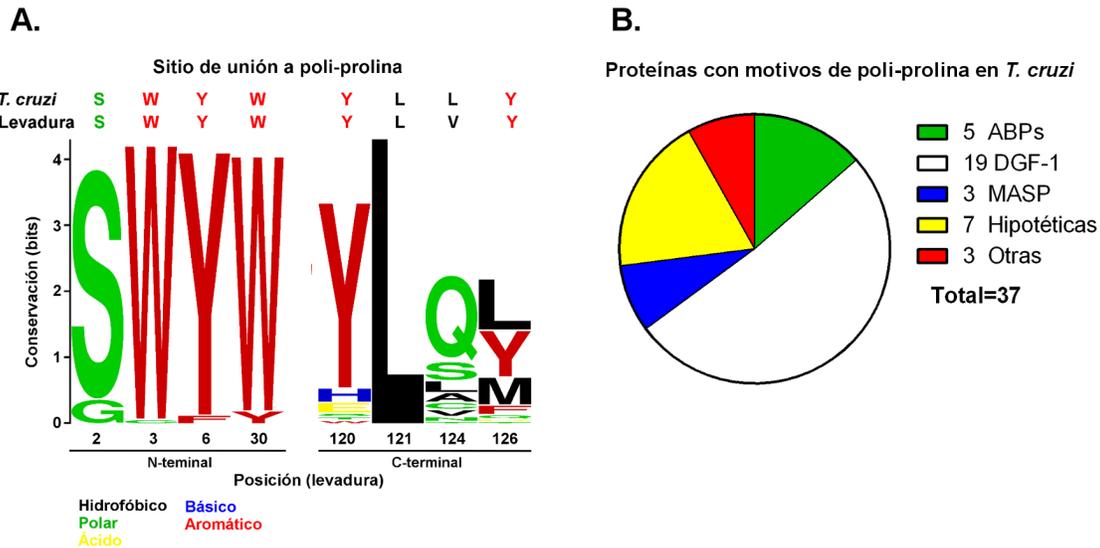


Figura 16. Dominio de unión a poli-prolinas y posibles ligandos de este tipo en el genoma de *T. cruzi* **A.** Representación Logo de un alineamiento múltiple de los residuos involucrados en la unión con poli-prolinas en 61 secuencias de profilina provenientes de animales (13), hongos (3), plantas (38) y protistas (7). En la parte superior se muestran las secuencias de la profilina de *T. cruzi* y levadura. Como referencia se indican las posiciones en la profilina de levadura **B.** Gráfica de pastel que indica el número de proteínas con motivos de poli-prolina en el genoma de *T. cruzi* CL-Brener. Las proteínas se clasificaron de acuerdo a su anotación así: ABPs= Proteínas de unión a actina; DGF-1= Dispersed gene family protein 1; MASP= Mucin-associated surface protein.

Tabla 8. Proteínas de unión a actina codificadas en el genoma de *T. cruzi* con motivos de poli-prolina. Los motivos de poli-prolina se señalan en negrita y subrayados. Se indica la posición de cada región en la secuencia de aminoácidos.

Anotación	TriTrypDB IDs	Motivos poli-prolina
Formina A	TcCLB.511755.80	515 - ASSGL PPPPPPPPPP GAGAKSGL PPPPPPPP GAGAKSGL PPP PPPPPPPGAGTKSGLPPPPPPPPGAGTKSGLPPPPPPPPGAGTKSGLP PPPPPPPKAKSG - 619
Formina B	TcCLB.508641.320	460 - SPSS PPRTPPPPPPPPP GKN APPPPPPPPPPHGKKAPPP PPPPPKIIGS - 513
Formina C	TcCLB.511393.30	438 - PKGEK PLPPPPPSLP VASQQHPQQRSALPAKAG PPPPPPPPPT SAGGKKGAPPPPPPPSGAKK - 502
WASH	TcCLB.510241.40	377 - SALE APPPPPPPPPPPPPPPPPPP AGK APPPIPPPPP GFKSMKA PPPPPPPPPPAMMMKTAVQPARTMTAIPPPPPPLSAEAAPLPISPIAPGP AARSLPKLGNPPAPPLPPPPPPRKNPV - 500
CAP	TcCLB.504137.80	1 - MPAPPPAPPPPPAPP KAASG - 22

concentraciones de SMIFH2. Para evitar en lo posible efectos inespecíficos de la molécula inhibidora, usamos concentraciones menores a 25 μ M y un tiempo de exposición de 1 hora, como se recomendó previamente (Isogai et al., 2015). Típicamente las forminas interactúan con actina y profilina, por lo que esperábamos que la inhibición específica de las forminas por SMIFH2 tuviera efecto en la localización de estas dos proteínas. Para evaluar esto, determinamos su distribución en parásitos tratados con SMIFH2. En células no tratadas o

incubadas con el vehículo de la molécula inhibidora, la profilina se distribuyó de manera difusa en el cuerpo celular y la actina se observó como parches en el flagelo y concentrada en la base del mismo (Figura 17B). No observamos estas concentraciones de la actina cuando las células fueron incubadas con concentraciones de SMIFH2 a partir de 15 μ M. En su lugar, tanto la actina como la profilina se distribuyeron en un patrón punteado. Esta localización se observó en todas las concentraciones de SMIFH2 probadas, aunque fue más evidente a 15 y 20 μ M. Estos cambios en localización estuvieron asociados con una disminución drástica en la viabilidad celular (Figura 17C), incluso con la menor concentración usada (5 μ M). Nuestros datos sugieren que las forminas de *T. cruzi* son susceptibles a inhibición por SMIFH2 y que son requeridas para la supervivencia del parásito.

Tabla 9. Algunas características de las secuencias homólogas a las forminas identificadas en los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. Para cada secuencia se indica el número de acceso en la base de datos TriTrypDB (TriTrypDB IDs), el peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (*pI*) teóricos, así como los porcentajes de identidad y similitud de las secuencias de *T. brucei* (Tb) y *L. major* (Lm) con respecto a las de *T. cruzi* (% ID/Sim).

Nombre	TriTrypDB IDs	PM (kDa)	<i>pI</i>	% ID/Sim
Formina A	TcCLB.511755.80	120.3	9.1	-
	Tb927.5.2300	102.0	8.1	26/41
	LmjF.17.0930	154.6	9.5	24/35
Formina B	TcCLB.508641.320	107.9	5.8	-
	Tb927.11.5740	110.7	6.1	45/59
	LmjF.24.1110	129.2	6.4	32/44
Formina C *	TcCLB.511393.30	104.6	8.2	-

* Ausente en *T. brucei* y *L. major*.

5.7. Sobre-expresión de la profilina en *T. cruzi*

Se han identificado fenotipos asociados con alteraciones en la dinámica de actina producto de la sobreexpresión de la profilina (e.g. McKinney et al., 2001; Rotty et al., 2015). Por esta razón, pensamos que una estrategia para obtener información sobre la función de la actina en *T. cruzi* sería sobreexpresar a la profilina en los epimastigotes. Para este fin, clonamos la secuencia codificante de la profilina como fusión con la proteína fluorescente mCherry en el vector de expresión para *T. cruzi* pRiboTEX (Martínez-Calvillo et al., 1997), el cual utiliza un promotor transcripcional fuerte para expresar el gen de interés (Figura 18A). Con el vector recombinante transfectamos epimastigotes y seleccionamos los parásitos transformados por su resistencia al antibiótico G418. Para evaluar la sobreexpresión de la proteína de fusión, realizamos ensayos de Western blot con nuestro anticuerpo anti-profilina y con un anticuerpo comercial contra mCherry. En extractos totales de proteína de los parásitos transfectados con el vector de expresión, nuestro anticuerpo anti-profilina detectó a la proteína nativa (16kDa) y a 3 bandas en el rango de tamaños de 50 a 25 kDa (Figura 18B), entre las que podría encontrarse mCherry-profilina (45 kDa) y/o versiones truncas de la misma. Sin embargo, ninguna de estas bandas fue detectada con el anticuerpo anti-mCherry. Además, no logramos observar fluorescencia en las células transfectadas por microscopía de fluorescencia de campo amplio. Decidimos entonces sobreexpresar a la profilina sin etiqueta, por lo que clonamos la secuencia codificante de la profilina nativa en el mismo vector. Transfectamos y seleccionamos a los parásitos recombinantes como ya se describió, y se

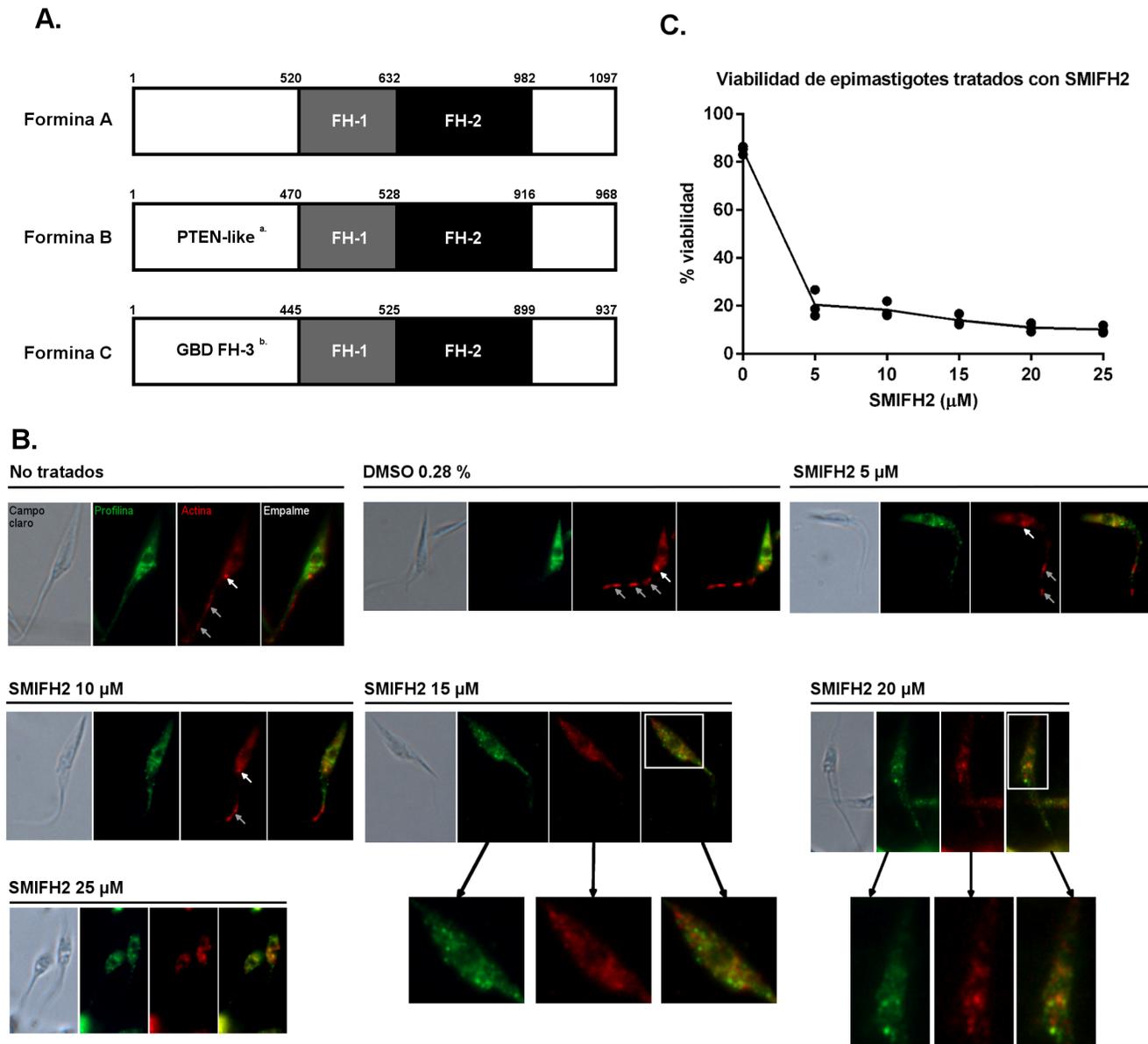


Figura 17. Efectos del inhibidor de forminas SMIFH2 sobre los epimastigotes de *T. cruzi*. **A.** Arquitectura de dominios de las tres forminas identificadas en *T. cruzi*. En la parte superior de cada esquema se indica la posición de inicio de cada dominio o región en la secuencia de aminoácidos ^a Identificado con Pfam (pfam.xfam.org/); ^b Identificado con Phyre2 (Kelley et al., 2015). **B.** Microscopía de fluorescencia de campo amplio donde se revela la localización de la profilina (verde) y la actina (rojo) en parásitos control (no tratados y DMSO) y tratados con diferentes concentraciones de SMIFH2. Las flechas blancas indican la concentración de actina en la base del flagelo y las grises los parches en el flagelo. En las células tratadas con SMIFH2 15 y 20 μ M se muestran imágenes magnificadas 2X en la región del cuerpo celular, que se señala con un recuadro blanco en las imágenes empalmadas. Se muestran imágenes capturas con un objetivo 100X. **C.** Viabilidad celular de epimastigotes tratados con diferentes concentraciones de SMIFH2 por 1 hora. El ensayo se realizó con el sustrato colorimétrico MTS. Los resultados se expresan como el porcentaje de la absorbancia (% viabilidad) obtenida en las células sin tratar con respecto a las diferentes tratamientos. La concentración 0 μ M corresponde a parásitos incubados con el vehículo de la droga (DMSO 0.28 %). Se representan los resultados de tres experimentos independientes (puntos) y el promedio (línea).

analizó la expresión de la profilina por ensayos de Western blot con nuestro anticuerpo anti-profilina. Cargamos en cada carril extractos de proteína derivados del mismo número de parásitos (5×10^6 células), lo cual fue evidenciado en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie cargados y corridos en paralelo a los usados para los ensayos de Western blot (Figura 18C, panel izquierdo). La intensidad de la banda de profilina fue similar en los parásitos transfectados con el vector recombinante y en los controles de parásitos silvestres y transfectados con el vector vacío (Figura 18C, panel derecho). Observamos lo mismo al analizar 7 clonas obtenidas por dilución limitada a partir de los parásitos transfectados (Figura 18D).

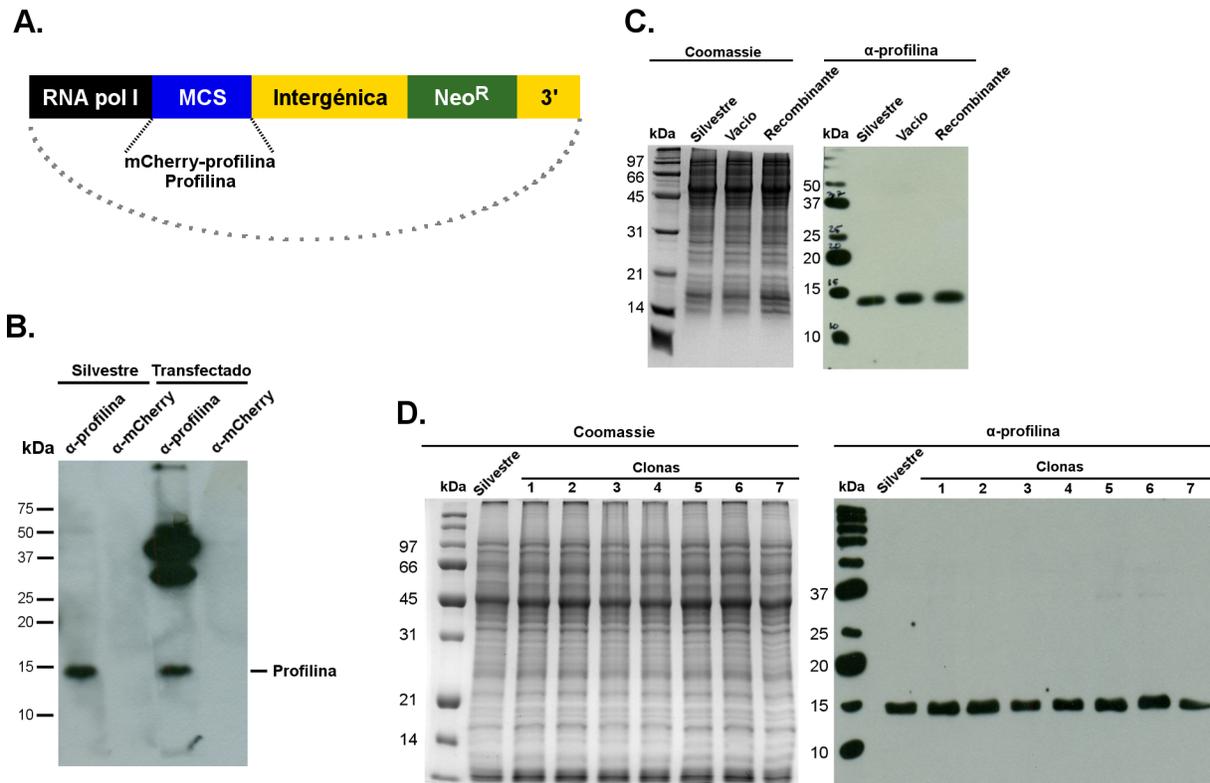


Figura 18. Sobre-expresión de la profilina en epimastigotes con un vector de expresión constitutivo **A.** Mapa del vector de expresión pRiboTEX usado para sobre-expresar a la profilina. Se indica la posición del promotor transcripcional para la RNA pol I, del sitio múltiple de clonación (MCS) donde se insertó a la profilina nativa y fusionada con mCherry, el gen de resistencia a neomicina (Neo^R) y a las secuencias que proveen las señales para el procesamiento del mRNA (intergénica y 3') **B.** Inmunodetección de la profilina por ensayos de Western blot en lisados totales de epimastigotes silvestres y transfectados con el vector recombinante que codifica para la fusión mCherry-profilina **C.** Inmunodetección de la profilina por ensayos de Western blot en lisados totales de epimastigotes silvestres y transfectados con el vector vacío o recombinante que codifica para la profilina nativa (panel derecho). Como control de carga se muestra un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie corrido en paralelo al usado para el ensayo de Western blot (panel izquierdo) **D.** Se repitió el ensayo descrito para la Figura 18C pero con clonas obtenidas por dilución limitada a partir de los parásitos recombinantes obtenidos con el vector que codifica para la profilina nativa.

No logramos sobre-expresar a la profilina a nivel de proteína usando un vector de expresión constitutivo para *T. cruzi*. Una alternativa para solucionar este problema es usar un sistema de expresión inducible, para lo cual clonamos la secuencia codificante de la profilina en un

vector de expresión inducible con tetraciclina diseñado para *T. cruzi* llamado pTclINDEX (Taylor & Kelly, 2006). Este plásmido expresa el gen de interés bajo un promotor para la RNA polimerasa del fago T7 que es controlado por un operador de tetraciclina (Figura 19A). Por esta razón, para usarlo es necesario generar una cepa de *T. cruzi* que exprese la RNA polimerasa mencionada y el represor de tetraciclina. Para este fin, transfectamos epimastigotes con un vector que expresa las secuencias codificantes para las dos proteínas y confiere resistencia al antibiótico G418. Después de la selección de los parásitos recombinantes, analizamos la expresión de la RNA polimerasa y el represor de tetraciclina por ensayos de Western blot con anticuerpos comerciales contra estas proteínas (Figura 19B). Como control positivo usamos extractos de proteína de una cepa de *T. brucei* que expresa las dos proteínas de interés. Con los anticuerpos usados, solo logramos detectar la expresión del represor de tetraciclina en la cepa recombinante obtenida (*T. cruzi* pLEW13). La señal proveniente de la RNA polimerasa T7 no fue observada en la cepa de *T. cruzi* ni en el control positivo. Dado que *T. cruzi* pLEW13 es resistente al antibiótico de selección y expresa el represor de tetraciclina, esperabamos que también expresara la RNA polimerasa T7. Por esta razón, decidimos co-transfectarla con pTclINDEX. En este vector clonamos a la profilina fusionada con la etiqueta de 10 aminoácidos *myc* para poder diferenciarla de la proteína nativa, usando como control una versión del plásmido en la que clonamos a EGFP. Seleccionamos los parásitos co-transfectados por su resistencia a higromicina. Realizamos varios ensayos de transfección con diferentes condiciones de electroporación y selección. Sin embargo, no logramos obtener parásitos resistentes a higromicina para caracterizar los efectos de la sobre-expresión de la profilina.

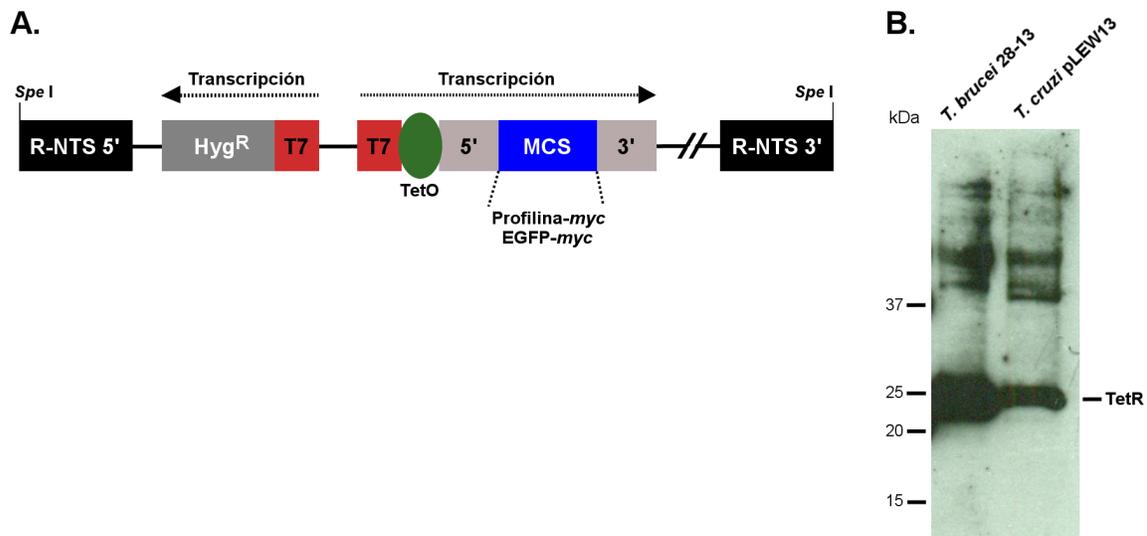


Figura 19. Herramientas para la sobreexpresión de profilina en *T. cruzi* usando un sistema inducible con tetraciclina **A.** Mapa del vector pTclINDEX en el que se indica la posición de los promotores para la RNA polimerasa de fago T7 (T7), el operador de tetraciclina (TetO), el gen de resistencia a higromicina (Hyg^R) y el sitio múltiple de clonación (MCS). El vector se integra por recombinación homóloga en el espaciador ribosomal no transcrito (R-NTS), una región con baja actividad transcripcional del genoma de *T. cruzi* **B.** Ensayo de Western blot donde se evaluó la expresión del represor de tetraciclina en *T. cruzi* pLEW13. Como control se utilizó un lisado de la cepa de *T. brucei* 28-13, la cual se sabe expresa esta proteína.

6. DISCUSIÓN

Durante el presente proyecto estuvimos interesados en el estudio del sistema de actina de *T. cruzi*, especialmente en su regulación por las proteínas de unión a actina. En este trabajo, utilizamos herramientas *in silico* y moleculares para caracterizar uno de los elementos más importantes en la regulación de la dinámica de actina en las células eucariontes: la profilina. Esta proteína tiene la capacidad de interactuar con la actina monomérica y modular su polimerización. La formación de complejos profilina:actina inhibe la nucleación espontánea y facilita la incorporación del monómero de actina solamente en los extremos barbados. Estas actividades se facilitan por la interacción de la profilina con la actina y con diversos factores involucrados con la regulación de la actina (e.g. forminas, WASP, CAP). Pensamos entonces que la profilina sería un buen candidato para identificar proteínas, localizaciones en la célula y rutas de polimerización de actina predominantes en *T. cruzi*. Para caracterizar a la profilina, primero demostramos su expresión a lo largo del ciclo de vida del parásito. Usando un anticuerpo policlonal específico contra la profilina de *T. cruzi*, logramos detectar la proteína en los estadios de epimastigote, tripomastigote y amastigote. Analizamos la localización de la profilina mediante fraccionamientos celulares con detergente y microscopía confocal. En otros estudios se ha localizado a la profilina en regiones de alta dinámica de polimerización de actina (e.g. Balasubramanian et al., 1994; Dong et al., 2000; Li et al., 2008; Mayboroda et al., 1997). Sin embargo, en *T. cruzi* la profilina se encuentra dispersa de manera difusa en el cuerpo celular de parásitos en los estadios epimastigotes y en los amastigotes intracelulares. No identificamos a la profilina en el flagelo ni enriquecida en la base de esta estructura, lo que contrasta con la localización de la actina convencional en estas regiones (Cevallos et al., 2011). Es probable que los anticuerpos anti-actina que hemos usado para localizarla no reconozcan formas estructurales que están unidas a la profilina, como se ha descrito previamente (Grenklo et al., 2004). Por esta razón, pensamos que la localización observada de la profilina con nuestro anticuerpo representa la suma de la que se encuentra unida a la actina convencional y a los demás ligandos de la proteína. Como esperábamos, detectamos gran parte de la profilina como una proteína soluble en el citoplasma. Sin embargo, una pequeña porción de la proteína fue identificada en fracciones enriquecidas con proteínas de citoesqueleto. Nuestros datos de microscopía confocal no nos sugieren la presencia de profilina en el núcleo, como ha sido reportado en otros estudios (Lederer et al., 2005; Skare et al., 2003; Stüven et al., 2003). Sin embargo, no podemos descartar esta posibilidad. Otra opción es la asociación directa de la profilina con el citoesqueleto del parásito. Aunque la profilina se ha considerado tradicionalmente como una proteína soluble y de unión a actina monomérica, recientemente se ha descrito que también puede unir actina filamentosa y microtúbulos (Courtemanche & Pollard, 2013; Nejedla et al., 2016).

Otro aspecto que abordamos en este proyecto fue la identificación de ligandos potenciales de la profilina en el parásito. Como estrategia inicial, intentamos expresar versiones etiquetadas de la proteína en epimastigotes para después realizar inmunoprecipitaciones que nos permitieran identificar las proteínas co-precipitadas con la profilina. Sin embargo, no logramos sobreexpresar a la profilina en el parásito. Como alternativa, decidimos realizar ensayos de co-purificación de extractos de parásito usando una versión recombinante de la profilina expresada en *E. coli* y fusionada a la GST. Mediante una estrategia de huella peptídica basada en datos de espectrometría de masas en tándem, logramos identificar en estos ensayos 22 ligandos potenciales de la proteína en el parásito. Inicialmente, la amplia

divergencia en los aminoácidos críticos para la interacción con actina en la profilina de *T. cruzi* nos sugirieron que esta profilina podría unir varias de las proteínas de la familia de las actinas codificadas por el genoma del parásito. Sin embargo, la única actina que co-purificó con GST-profilina fue la más similar a la actina convencional, lo que sugiere que la profilina de *T. cruzi* une de manera preferencial esta actina. Las tubulinas α y β , componentes de los microtúbulos, también se identificaron en estos ensayos. Una posible explicación es la alta abundancia de estas proteínas en el parásito. Sin embargo, es importante resaltar que ellas no fueron detectadas en ninguno de los controles de co-purificación de extractos de parásito usando GST. Además, en ensayos similares a los usados en este trabajo, pero usando extractos de cerebro de ratón, también se identificaron a las tubulinas como ligandos de la profilina (Witke et al., 1998). Otro dato consistente con la interacción entre la profilina y los microtúbulos es la co-localización de estos dos elementos en fibroblastos humanos y en células de melanoma de ratón (Grenklo et al., 2004; Nejedla et al., 2016). La interacción física entre profilina:microtúbulos también se demostró *in vitro* por ensayos de co-inmunoprecipitación (Nejedla et al., 2016). Estos trabajos sugieren que la profilina podría ser un elemento adicional en la comunicación y/o interacción entre los citoesqueletos de actina y tubulina. Los datos de fraccionamiento celular y de co-purificación con profilina recombinante de este trabajo sugieren una función similar para la profilina en *T. cruzi*.

Además de las proteínas citoesqueléticas detectadas como ligandos de la profilina, identificamos proteínas con otras funciones que co-purificaron con la profilina recombinante. Algunas no tienen similitud con proteínas reportadas, por lo que su identificación como ligando de profilina sugiere su posible participación en funciones relacionadas con el citoesqueleto de actina. Las demás proteínas están anotadas como elementos de diversos procesos celulares. Con base en la literatura disponible sobre estas proteínas, no es posible proponer una función plausible para su interacción con la profilina. Una posibilidad es que la fusión GST-profilina usada en nuestros ensayos de co-purificación difiera en conformación con respecto a la profilina expresada por el parásito. Por esta razón, no podemos descartar que algunas de las interacciones detectadas no tengan relevancia biológica. Sin embargo, otra alternativa es que algunas de estas proteínas sean co-optadas para funciones relacionadas con el citoesqueleto de actina. En inglés a este fenómeno se le conoce como *moonlighting*, y se refiere a los casos en los que una proteína participa en procesos biológicos diferentes (Jeffery, 2003). De los posibles ligandos de la profilina en *T. cruzi* cabe resaltar al factor de elongación 1-alfa (EF1- α). La razón es que un ejemplo relativamente bien documentado de *moonlighting* es la participación del EF1- α en la regulación del citoesqueleto de actina. EF1- α es un factor canónico de la traducción de proteínas. Sin embargo, hace varios años se reportó la interacción directa de la actina con el EF1- α en *Dictyostelium* (Yang et al., 1990). La unión de estas dos proteínas promueve la formación de haces de microfilamentos *in vitro* (Demma et al., 1990). La interacción actina:EF1- α está conservada en levadura, donde se han observado fenotipos en la organización del citoesqueleto de actina promovidos por la sobreexpresión de mutantes de EF1- α que no tienen efecto en la traducción de proteínas (Gross & Kinzy, 2005). En este organismo un complejo profilina:EF1- α también fue descrito (Umikawa et al., 1998). Por lo tanto, pensamos que algunas de las interacciones detectadas en este estudio, en particular profilina:EF1- α , pueden tener relevancia biológica. Sin embargo, es importante validarlas por otras estrategias.

Las profilinas se unen a motivos de poli-prolina, muchos de ellos presentes en otros factores reguladores de la actina. Estas interacciones se presentan a través de un dominio altamente conservado en las profilinas, incluyendo la de *T. cruzi*. El ortólogo de la profilina de *T. brucei*, que es similar en secuencia a la de *T. cruzi* (identidad= 84%), complementa una mutante de levadura negativa para la profilina (Wilson & Seebeck, 1997). Mutantes de la profilina de levadura que impiden la interacción con poli-prolinas no complementan mutantes negativas para esta proteína (Lu & Pollard, 2001), lo que nos sugiere que la profilina codificada por los tripanosomátidos puede interactuar con este tipo de ligandos y que estas interacciones no fueron detectadas en nuestros ensayos de co-purificación con GST-profilina. Una posible explicación es la presencia de la etiqueta GST en el extremo N-terminal de la profilina recombinante, región que forma parte del dominio de unión con poli-prolinas (Schutt et al., 1993). Por estas razones, realizamos búsquedas de proteínas con motivos de poli-prolinas en el genoma de *T. cruzi*. Identificamos 37 proteínas con motivos de poli-prolina que podrían servir como sustrato para la interacción con profilina. Otras proteínas que podrían interactuar con estos motivos son aquéllas con dominios SH-3 y repeticiones WW (Li, 2005), predichos en 15 secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de *T. cruzi* (basado en búsquedas de dominios Pfam de TriTrypDB). De las 37 secuencias con motivos de poli-prolina nos llamaron la atención cinco: las Forminas A-C, WASH y CAP. Estas proteínas típicamente están involucradas en la regulación de la dinámica de actina y han sido identificadas como ligandos de la profilina (Kovar, 2006; Ono, 2013). De ellas, realizamos estudios adicionales con las tres forminas. Nuestros análisis de secuencia sugieren la presencia de un dominio de unión a actina y una región con motivos de poli-prolina para unir profilina en las tres proteínas. Las forminas forman homodímeros que catalizan la nucleación de la actina y reclutan profilina:actina a los extremos barbados de los microfilamentos (Kovar, 2006). La toxicidad del inhibidor de forminas SMIFH2 sobre los epimastigotes y los cambios en localización de la profilina y la actina inducidos por esta molécula nos sugiere que estas proteínas se encuentran activas en el parásito y que su función es requerida para la supervivencia. Aspectos a evaluar en el futuro son efectos inhibitorios diferenciales sobre las tres forminas y la inhibición de blancos diferentes a las forminas por parte de SMIFH2 en el parásito. El primero es probable dada la amplia divergencia en secuencia de los dominios FH-2 de las tres forminas (identidad 18 – 24%), que es el blanco molecular de SMIFH2 (Rizvi et al., 2009). El segundo no lo podemos descartar, aunque las bajas concentraciones usadas y el reducido tiempo de exposición a la molécula inhibidora disminuyen esta posibilidad, como se reportó previamente en distintos tipos celulares (Isogai et al., 2015).

7. CONCLUSIONES

- En la mayoría de los tripanosomátidos el gen que codifica para la profilina es de única copia. A pesar de un bajo nivel de similitud global, de acuerdo a un modelo por homología la secuencia de la profilina de *T. cruzi* se pliega como una profilina típica. Las secuencias de profilina de los tripanosomátidos tienen una inserción de 19 aminoácidos en la mitad C-terminal cuya función no ha sido explorada.
- *T. cruzi* expresa a la profilina a nivel de proteína en los diferentes estadios de desarrollo del parásito que se evaluaron. Además, de acuerdo con nuestros datos, la profilina se distribuye

predominantemente como proteína soluble en el citoplasma y posiblemente como proteína asociada al citoesqueleto.

- En condiciones *in vitro* la profilina tiene como ligandos a la actina convencional y a los componentes de los microtúbulos, lo que nos sugiere que la función de profilina en la regulación de la dinámica de actina está conservada. Además, esto es consistente con una interacción entre la profilina con el citoesqueleto de microtúbulos.

- Detectamos varias proteínas de *T. cruzi* que posiblemente representan ligandos novedosos de esta proteína en el parásito. Algunas no tienen similitud con dominios o motivos conocidos, y otras corresponden a factores que participan en otros procesos celulares. Estas proteínas podrían representar funciones o elementos reguladores novedosos de la actina y/o la profilina.

- Identificamos varias proteínas con motivos de poli-prolina en *T. cruzi* que podrían representar ligandos adicionales de la profilina en el parásito. Cinco de ellos corresponden a factores reguladores de la actina de la familia de las forminas, CAP y al activador del complejo Arp2/3 WASH.

- El efecto en viabilidad de la molécula inhibidora de las forminas SMIFH2 sobre los epimastigotes de *T. cruzi* nos sugiere que la actividad de estas proteínas es requerida para la supervivencia del parásito.

8. PERSPECTIVAS

- La profilina frecuentemente es regulada por modificaciones post-traduccionales, principalmente fosforilación e interacción con fosfoinositoles de membrana. Un aspecto a estudiar a futuro es si la profilina de *T. cruzi* es blanco de este tipo regulación.

- Corroborar la interacción de la profilina con el citoesqueleto por otras estrategias, por ejemplo: 1. Estudios de co-localización de la profilina con la actina y las tubulinas en citoesqueletos de parásitos extraídos con detergente; 2. Determinar si la profilina de *T. cruzi* co-inmunoprecipita con microtúbulos aislados del citoesqueleto del parásito.

- Realizar experimentos de co-inmunoprecipitación usando anticuerpos contra la profilina nativa o contra una versión etiquetada expresada en el parásito. Esto posiblemente permitirá corroborar algunos de los ligandos encontrados en los ensayos de co-purificación con GST-profilina, así como identificar nuevas proteínas asociadas a la profilina.

- Realizar estudios de interacción proteína:proteína entre la profilina y las diferentes forminas identificadas en *T. cruzi*. Durante este proyecto, expresamos versiones recombinantes de las Forminas B y C para llevar a cabo estos experimentos. Estas proteínas nos permitirán además llevar a cabo estudios de polimerización *in vitro* de la actina para estudiar las actividades que tienen sobre la dinámica de polimerización y evaluar la especificidad del compuesto inhibidor de las forminas SMIFH2.

- Sobreexpresar a la profilina en los epimastigotes usando el vector de expresión inducible construido durante este proyecto y estudiar los efectos fenotípicos asociados.

- Por último, proponemos un modelo hipotético de la dinámica de polimerización de actina en *T. cruzi* (Figura 20). La mayor parte de este modelo no tiene respaldo experimental y está basado en los análisis genómicos publicados y en la literatura disponible sobre la función de los componentes de la maquinaria reguladora de la actina. Nuestra hipótesis se divide en 9 etapas: 1. ADF/cofilina une las porciones de microfilamento formados por actina-ADP y promueve el corte del polímero y la disociación de las subunidades. Esta actividad es favorecida por Aip1, que se une a los fragmentos de microfilamentos decorados con ADF/cofilina; 2. CAP y twinfilina compiten con ADF/cofilina por la actina-ADP liberada de los microfilamentos; 3. La interacción de twinfilina con actina-ADP inhibe el intercambio del nucleótido, secuestrando así la actina en estado monomérico y generando un reservorio de actina no polimerizable; 4. CAP cataliza el intercambio del ADP por ATP en los monómeros de actina, promoviendo el reciclaje de la actina en nuevas rondas de polimerización; 5. La actina-ATP se disocia de CAP y se une a la profilina. En esta transición posiblemente se

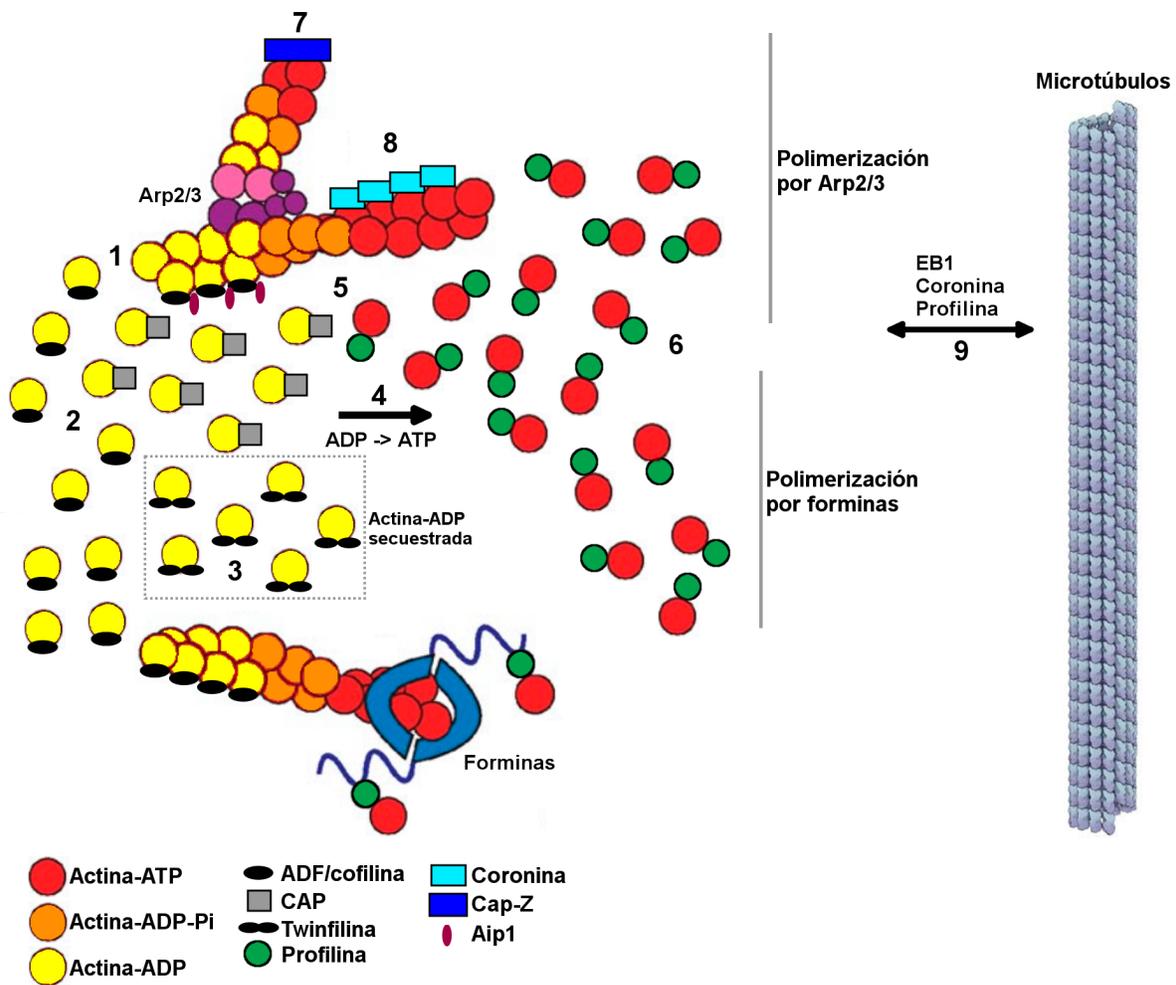


Figura 20. Modelo hipotético de regulación de la dinámica de polimerización de la actina en *T. cruzi*. Ver texto para detalles.

presente un complejo ternario actina:CAP:profilina, del cual se disocia CAP para dar origen a la forma polimerizable actina-ATP:profilina, como se ha descrito en otros trabajos (Bertling et al., 2007; Mattila et al., 2004); 6. Los complejos actina-ATP:profilina pueden incorporarse en los extremos barbados de microfilamentos ensamblados por el complejo Arp2/3 y las forminas; 7. La incorporación de las subunidades en los extremos barbados puede ser inhibida por el complejo Cap-Z; 8. Las coroninas se unen a los fragmentos de microfilamentos recién ensamblados (actina-ATP) y los protegen de la acción despolimerizadora de las cofilinas; 9. Finalmente, proteínas como EB1, coronina y profilina pueden mediar la interacción de los microfilamentos con los microtúbulos.

9. REFERENCIAS

- Alberico, E.O., Zhu, Z.C., Wu, Y.-F.O., Gardner, M.K., Kovar, D.R., Goodson, H.V., 2016. Interactions between the Microtubule Binding Protein EB1 and F-Actin. *J Mol Biol.* 428, 1304–1314.
- Alcantara, C.L., Vidal, J.C., de Souza, W., Cunha-e-Silva, N.L., 2014. The three-dimensional structure of the cytosome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Cell Sci.* 127, 2227–2237.
- Alkam, D., Feldman, E.Z., Singh, A., Kiaei, M., 2016. Profilin1 biology and its mutation, actin(g) in disease. *Cell Mol Life Sci.* 74, 967–981.
- Alonso, V.L., Villanova, G.V., Ritagliati, C., Machado Motta, M.C., Cribb, P., Serra, E.C., 2014. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 3 binds acetylated α -tubulin and concentrates in the flagellum during metacyclogenesis. *Eukaryot Cell.* 13, 822–831.
- Aphasizhev, R., Aphasizheva, I., 2014. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie.* 100, 125–131.
- Balasubramanian, M.K., Hirani, B.R., Burke, J.D., Gould, K.L., 1994. The *Schizosaccharomyces pombe* cdc3+ gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol.* 125, 1289–1301.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 309, 416–422.
- Bertling, E., Quintero-Monzon, O., Mattila, P.K., Goode, B.L., Lappalainen, P., 2007. Mechanism and biological role of profilin-Srv2/CAP interaction. *J Cell Sci.* 120, 1225–1234.
- Bezanilla, M., Gladfelter, A.S., Kovar, D.R., Lee, W.-L., 2015. Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. *J Cell Biol.* 209, 329–337.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J., 2014. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol Rev.* 94, 235–263.
- Bone, G.J., Steinert, M., 1956. Isotopes incorporated in the nucleic acids of *Trypanosoma mega*. *Nature.* 178, 308–309.
- Bos, J.L., Rehmann, H., Wittinghofer, A., 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 129, 865–877.

- Bringaud, F., Biteau, N., Melville, S.E., Hez, S., El-Sayed, N.M., Leech, V., Berriman, M., Hall, N., Donelson, J.E., Baltz, T., 2002. A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 1, 137–151.
- Campellone, K.G., Welch, M.D., 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11, 237–251.
- Carlsson, L., Nyström, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U., 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol*. 115, 465–483.
- Cevallos, A.M., Segura-Kato, Y.X., Merchant-Larios, H., Manning-Cela, R., Alberto Hernández-Osorio, L., Márquez-Dueñas, C., Ambrosio, J.R., Reynoso-Ducoing, O., Hernández, R., 2011. *Trypanosoma cruzi*: Multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. *Exp Parasitol*. 127, 249–259.
- Chalkia, D., Nikolaidis, N., Makalowski, W., Klein, J., Nei, M., 2008. Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments. *Mol Biol Evol*. 25, 2717–2733.
- Chen, Q., Courtemanche, N., Pollard, T.D., 2015. Aip1 promotes actin filament severing by cofilin and regulates constriction of the cytokinetic contractile ring. *J Biol Chem*. 290, 2289–2300.
- Corrêa, J.R., Atella, G.C., Batista, M.M., Soares, M.J., 2008. Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. *Exp Parasitol*. 119, 58–66.
- Courtemanche, N., Pollard, T.D., 2013. Interaction of profilin with the barbed end of actin filaments. *Biochemistry*. 52, 6456–6466.
- Cvrčková, F., 2013. Formins and membranes: anchoring cortical actin to the cell wall and beyond. *Front Plant Sci*. 4, 436.
- De Melo, L.D.B., SANT'ANNA, C., Reis, S.A., Lourenço, D., De Souza, W., Lopes, U.G., Cunha-e-Silva, N.L., 2008. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology*. 135, 955–965.
- Demma, M., Warren, V., Hock, R., Dharmawardhane, S., Condeelis, J., 1990. Isolation of an abundant 50,000-dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amoebae*. *J Biol Chem*. 265, 2286–2291.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S.N.J., 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*. 3, 251–261.
- Dominguez, R., 2004. Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci*. 29, 572–578.
- Dominguez, R., Holmes, K.C., 2011. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys*. 40, 169–186.
- Dong, J., Radau, B., Otto, A., Müller, E., Lindschau, C., Westermann, P., 2000. Profilin I attached to the Golgi is required for the formation of constitutive transport vesicles at the trans-Golgi network. *Biochim Biophys Acta*. 1497, 253–260.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J., 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*. 83, 433–473.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Wortley, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., et al. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309, 409–415.

- Ersfeld, K., Gull, K., 2001. Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 114, 141–148.
- Fan, Y., Arif, A., Gong, Y., Jia, J., Eswarappa, S.M., Willard, B., Horowitz, A., Graham, L.M., Penn, M.S., Fox, P.L., 2012. Stimulus-dependent phosphorylation of profilin-1 in angiogenesis. *Nat Cell Biol.* 14, 1046–1056.
- Farina, M., Attias, M., Souto-Padron, T., De Souza, W., 1986. Further Studies on the Organization of the Paraxial Rod of Trypanosomatids. *J Protozool.* 33, 552–557.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S.H., Dominguez, R., 2007. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 26, 4597–4606.
- Fujii, T., Iwane, A.H., Yanagida, T., Namba, K., 2010. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature.* 467, 724–728.
- García-Salcedo, J.A., Pérez-Morga, D., Gijón, P., Dilbeck, V., Pays, E., Nolan, D.P., 2004. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 23, 780–789.
- Gatfield, J., Albrecht, I., Zanolari, B., Steinmetz, M.O., Pieters, J., 2005. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol Biol Cell.* 16, 2786–2798.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Kim, J.W., Machesky, L.M., Rhee, S.G., Pollard, T.D., 1991. Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science.* 251, 1231–1233.
- Goode, B.L., Wong, J.J., Butty, A.C., Peter, M., McCormack, A.L., Yates, J.R., Drubin, D.G., Barnes, G., 1999. Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *J Cell Biol.* 144, 83–98.
- Gordon, J.L., Sibley, L.D., 2005. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics.* 6, 179.
- Grenklo, S., Johansson, T., Bertilson, L., Karlsson, R., 2004. Anti-actin antibodies generated against profilin:actin distinguish between non-filamentous and filamentous actin, and label cultured cells in a dotted pattern. *Eur J Cell Biol.* 83, 413–423.
- Gross, S.R., Kinzy, T.G., 2005. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat Struct Mol Biol.* 12, 772–778.
- Guerrero-Sánchez, E., Cevallos, A.M., Martínez-Calvillo, S., López, I., Hernández, R., 2015. Relocation of nucleolar fibrillarin in *Trypanosoma cruzi* during stationary phase. *Parasitol Open.* 1, e2.
- Guillén, G., Valdés-López, V., Noguez, R., Olivares, J., Rodríguez-Zapata, L.C., Pérez, H., Vidali, L., Villanueva, M.A., Sánchez, F., 1999. Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *Plant J Cell Mol Biol.* 19, 497–508.
- Gull, K., 1999. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 53, 629–655.
- Hall, A., 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 33, 891–895.
- Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M.A., Ladds, G., Rubio, I., 2015. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem.* 396, 831–848.
- Isogai, T., van der Kammen, R., Innocenti, M., 2015. SMIFH2 has effects on Formins and p53 that perturb the cell cytoskeleton. *Sci Rep.* 5, 9802.

- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309, 436–442.
- Jansen, S., Collins, A., Chin, S.M., Ydenberg, C.A., Gelles, J., Goode, B.L., 2015. Single-molecule imaging of a three-component ordered actin disassembly mechanism. *Nat Commun*. 6, 7202.
- Jansen, S., Collins, A., Golden, L., Sokolova, O., Goode, B.L., 2014. Structure and mechanism of mouse cyclase-associated protein (CAP1) in regulating actin dynamics. *J Biol Chem*. 289, 30732–30742.
- Jeffery, C.J., 2003. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet*. TIG 19, 415–417.
- Jockusch, B.M., Murk, K., Rothkegel, M., 2007. The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 159, 131–149.
- Kapoor, P., Sahasrabudhe, A.A., Kumar, A., Mitra, K., Siddiqi, M.I., Gupta, C.M., 2008. An unconventional form of actin in protozoan hemoflagellate, *Leishmania*. *J Biol Chem*. 283, 22760–22773.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 10, 845–858.
- Kollmar, M., Lbik, D., Enge, S., 2012. Evolution of the eukaryotic ARP2/3 activators of the WASP family: WASP, WAVE, WASH, and WHAMM, and the proposed new family members WAWH and WAML. *BMC Res Notes*. 5, 88.
- Kovar, D.R., 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*. 18, 11–17.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C., 2002. Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem*. 3, 12.
- Lassing, I., Lindberg, U., 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*. 314, 472–474.
- Lederer, M., Jockusch, B.M., Rothkegel, M., 2005. Profilin regulates the activity of p42^{POP}, a novel Myb-related transcription factor. *J Cell Sci*. 118, 331–341.
- Li, S.S.-C., 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*. 390, 641–653.
- Li, Y., Grenklo, S., Higgins, T., Karlsson, R., 2008. The profilin:actin complex localizes to sites of dynamic actin polymerization at the leading edge of migrating cells and pathogen-induced actin tails. *Eur J Cell Biol*. 87, 893–904.
- Lu, J., Pollard, T.D., 2001. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell*. 12, 1161–1175.
- Mahoney, N.M., Janmey, P.A., Almo, S.C., 1997. Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol*. 4, 953–960.
- Maier, A., Lorenz, P., Voncken, F., Clayton, C., 2001. An essential dimeric membrane protein of trypanosome glycosomes. *Mol Microbiol*. 39, 1443–1451.
- Martínez-Calvillo, S., López, I., Hernández, R., 1997. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*. 199, 71–76.

- Mattila, P.K., Quintero-Monzon, O., Kugler, J., Moseley, J.B., Almo, S.C., Lappalainen, P., Goode, B.L., 2004. A high-affinity interaction with ADP-actin monomers underlies the mechanism and in vivo function of Srv2/cyclase-associated protein. *Mol Biol Cell*. 15, 5158–5171.
- Mayboroda, O., Schlüter, K., Jockusch, B.M., 1997. Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 37, 166–177.
- McKinney, E.C., Kandasamy, M.K., Meagher, R.B., 2001. Small changes in the regulation of one *Arabidopsis* profilin isoform, PRF1, alter seedling development. *Plant Cell*. 13, 1179–1191.
- Medina-Acosta E., Cross G. 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. *Mol Biochem Parasit*. 59, 327-330.
- Michelot, A., Guérin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C.J., Blanchoin, L., 2005. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of *Arabidopsis* FORMIN1. *Plant Cell*. 17, 2296–2313.
- Mockrin, S.C., Korn, E.D., 1980. Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*. 19, 5359–5362.
- Mortara, R.A., 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *J Protozool*. 36, 8–13.
- Nejedla, M., Sadi, S., Sulimenko, V., de Almeida, F.N., Blom, H., Draber, P., Aspenström, P., Karlsson, R., 2016. Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics. *Mol Biol Cell*. 27, 2381–2393.
- Normoyle, K.P.M., Briehner, W.M., 2012. Cyclase-associated protein (CAP) acts directly on F-actin to accelerate cofilin-mediated actin severing across the range of physiological pH. *J Biol Chem*. 287, 35722–35732.
- Ogbadoyi, E.O., Robinson, D.R., Gull, K., 2003. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell*. 14, 1769–1779.
- Ono, S., 2013. The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics - more than a monomer-sequestration factor. *J Cell Sci*. 126, 3249–3258.
- Osorio Méndez, J.F., 2012. Caracterización de profilina en *Trypanosoma cruzi*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2012/diciembre/511451366/Index.html>
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., Rosen, M.K., 2005. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*. 433, 488–494.
- Pečar Fonović, U., Jevnikar, Z., Rojnik, M., Doljak, B., Fonović, M., Jamnik, P., Kos, J., 2013. Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells. *PloS One*. 8, e53918.
- Perelroizen, I., Marchand, J.B., Blanchoin, L., Didry, D., Carlier, M.F., 1994. Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry*. 33, 8472–8478.
- Petterson, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25, 1605–1612.
- Pollard, T.D., 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8.

- Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112, 453–465.
- Porto-Carreiro, I., Attias, M., Miranda, K., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N., 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur J Cell Biol*. 79, 858–869.
- Poukkula, M., Kremneva, E., Serlachius, M., Lappalainen, P., 2011. Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton*. 68, 471–490.
- Ramsby, M., Makowski, G., 2011. Differential detergent fractionation of eukaryotic cells. *Cold Spring Harb Protoc*. doi:10.1101/pdb.prot5592
- Raza, S., Sahasrabudhe, A.A., Gupta, C.M., 2007. Nuclear localization of an actin-related protein (ORF LmjF21.0230) in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 153, 216–219.
- Rizvi, S.A., Neidt, E.M., Cui, J., Feiger, Z., Skau, C.T., Gardel, M.L., Kozmin, S.A., Kovar, D.R., 2009. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly. *Chem Biol*. 16, 1158–1168.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., Carlier, M.-F., 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*. 119, 419–429.
- Rotty, J.D., Wu, C., Bear, J.E., 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14, 7–12.
- Rotty, J.D., Wu, C., Haynes, E.M., Suarez, C., Winkelman, J.D., Johnson, H.E., Haugh, J.M., Kovar, D.R., Bear, J.E., 2015. Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and -independent pathways. *Dev Cell*. 32, 54–67.
- Rouiller, I., Xu, X.-P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N., Hanein, D., 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*. 180, 887–895.
- Saarikangas, J., Zhao, H., Lappalainen, P., 2010. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol. Rev*. 90, 259–289.
- Sahasrabudhe, A.A., Bajpai, V.K., Gupta, C.M., 2004. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. *Mol Biochem Parasitol*. 134, 105–114.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2006. The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: “ultra-competent” cells. *Cold Spring Harb Protoc*. doi:10.1101/pdb.prot3944
- Sathish, K., Padma, B., Munugalavadla, V., Bhargavi, V., Radhika, K.V.N., Wasia, R., Sairam, M., Singh, S.S., 2004. Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cell Signal*. 16, 589–596.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., Lindberg, U., 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*. 365, 810–816.
- Singh, K., Veluru, N.K., Trivedi, V., Gupta, C.M., Sahasrabudhe, A.A., 2014. An actin-like protein is involved in regulation of mitochondrial and flagellar functions as well as in intramacrophage survival of *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol*. 91, 562–578.
- Skare, P., Kreivi, J.-P., Bergström, A., Karlsson, R., 2003. Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res*. 286, 12–21.

- Soares, T.C., de Souza, W., 1977. Fixation of trypanosomatids for electron microscopy with the glutaraldehyde-tannic acid method. *Z Parasitenkd Berl Ger.* 53, 149–154.
- Souto-Pradón, T., de Souza, W., Heuser, J.E., 1984. Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. *J Cell Sci.* 69, 167–178.
- Souza, L.C.K., Pinho, R.E.G.G., Lima, C.V. de P., Fragoso, S.P., Soares, M.J., 2013. Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108, 631–636.
- Souza, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104, 89–100.
- Stüven, T., Hartmann, E., Görlich, D., 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.* 22, 5928–5940.
- Suarez, C., Carroll, R.T., Burke, T.A., Christensen, J.R., Bestul, A.J., Sees, J.A., James, M.L., Sirotkin, V., Kovar, D.R., 2015. Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex. *Dev Cell.* 32, 43–53.
- Suarez, C., Kovar, D.R., 2016. Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17, 799–810.
- Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., 1998. The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* 17, 6516–6526.
- Taylor, M.C., Kelly, J.M., 2006. pTdINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol.* 6, 32.
- Thorn, K.S., Christensen, H.E., Shigeta, R., Huddler, D., Shalaby, L., Lindberg, U., Chua, N.H., Schutt, C.E., 1997. The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure.* 1993 5, 19–32.
- Utrecht, A.C., Bear, J.E., 2006. Coronins: the return of the crown. *Trends Cell Biol.* 16, 421–426.
- Umikawa, M., Tanaka, K., Kamei, T., Shimizu, K., Imamura, H., Sasaki, T., Takai, Y., 1998. Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor 1alpha: implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene.* 16, 2011–2016.
- Vemuri, B., Singh, S.S., 2001. Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cell Signal.* 13, 433–439.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 25, 1189–1191.
- Wilson, W., Seebeck, T., 1997. Identification of a profilin homologue in *Trypanosoma brucei* by complementation screening. *Gene.* 187, 201–209.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., Cross, G.A., 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 99, 89–101.
- Witke, W., 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14, 461–469.
- Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C., Mann, M., 1998. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J.* 17, 967–976.

Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., Eck, M.J., 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*. 116, 711–723.

Yamashita, A., Maeda, K., Maéda, Y., 2003. Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* 22, 1529–1538.

Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S., Condeelis, J., 1990. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a. *Nature*. 347, 494–496.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Los ensayos de inmunodetección por Western blot de la profilina de *T. cruzi* descritos en la presente tesis se realizaron con una mezcla 1:1 de dos sueros policlonales obtenidos en un trabajo previo (Osorio Méndez, 2012). A esta mezcla se le denominó anticuerpo anti-profilina. Los sueros se produjeron inmunizando ratones con una versión recombinante de GST-profilina purificada por afinidad. Los 2 sueros usados en la presente tesis se escogieron de un grupo de 8 con base en ensayos realizados usando extractos totales de epimastigote de *T. cruzi* (Figura 21). En las mismas condiciones de dilución de anticuerpo primario y secundario, los dos sueros escogidos detectaron una única banda en el rango del tamaño teórico de la profilina de *T. cruzi* (16 kDa) que no es identificada por los sueros pre-inmunes obtenidos de los mismos animales. Aunque otros sueros también identifican únicamente la banda de interés (ratones 4 y 10), los dos sueros con los que se trabajó son los que la detectaron con mayor intensidad (ratones 5 y 6).

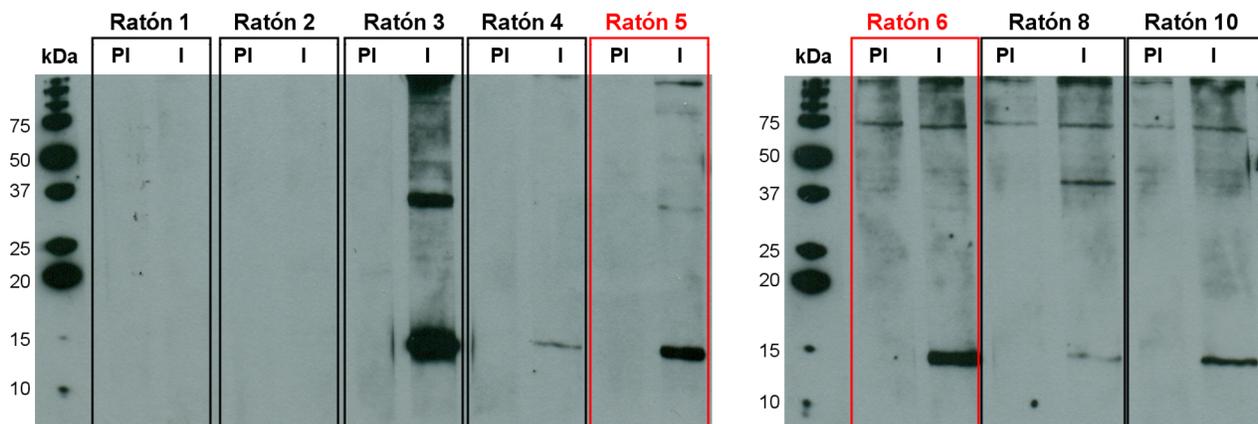


Figura 21. Evaluación de sueros policlonales obtenidos después de inmunizar 8 ratones con GST-profilina. Los anticuerpos primarios y secundarios se usaron a la misma dilución (1:2000 y 1:10000), y la membrana se expuso el mismo tiempo a la placa autoradiográfica (5 minutos). Se usó una membrana de PVDF proveniente de una transferencia a partir de un extracto de epimastigotes de *T. cruzi* que se separó por electroforesis en un gel preparativo de SDS-PAGE al 12 %. De esta membrana se cortaron tiras para ser incubadas con el anticuerpo primario correspondiente. Como anticuerpos primarios se usaron los sueros inmunes (I) con sus respectivos controles preinmunes (PI). Como anticuerpo secundario se usó un anti-IgG de ratón conjugado con HRP. La señal se reveló por quimioluminiscencia. Las cajas indican sueros provenientes de cada ratón. Las cajas rojas indican los sueros seleccionados para la presente tesis. Modificada de Osorio Méndez (2012).

10.2. Anexo 2. Secuencias homólogas a la profilina de *T. cruzi* identificadas en los genomas de los tripanosomátidos.

Tabla 10. Secuencias homólogas a la profilina identificadas en los genomas de los tripanosomátidos. Se indica la especie y cepa a la que corresponde cada secuencia, el número de acceso en TriTrypDB, el peso molecular teórico en kDa, el punto isoeléctrico (pI) y el porcentaje de identidad y similitud con respecto a la secuencia de *T. cruzi* CL Brener.

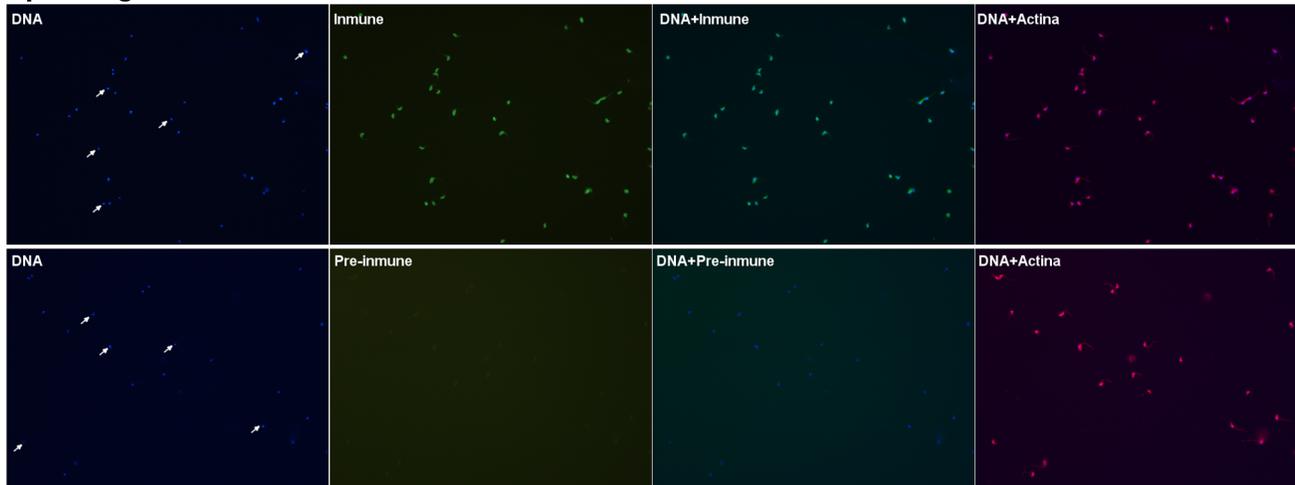
#	Especie y cepa	TriTrypDB ID	kDa ^a	pI ^a	ID/Sim (%) ^b
1	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Esmeraldo	TcCLB.510911.10	16.09	5.04	-
2	<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	Tb927.11.13780	16.12	4.97	84.67/91.33
3	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	TvY486_1114590	16.10	5.69	82.00/91.33
4	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	TvY486_1114610	16.16	5.87	80.67/90.00
5	<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58	TRSC58_01080	16.00	5.16	93.33/96.67
6	<i>Trypanosoma grayi</i> ANR4	Tgr.32.1290	16.05	6.05	80.67/87.33
7	<i>Trypanosoma evansi</i> STIB 805	TevSTIB805.11_01.14240	16.12	4.97	84.67/91.33
8	<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000	TcL3000.11.14170	16.12	4.97	84.67/91.33
9	<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmjF.32.0520	16.14	5.43	75.33/87.33
10	<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103	LmxM.31.0520	16.20	5.45	75.33/88.00
11	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	LinJ.32.0550	16.14	5.43	76.00/88.00
12	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	LbrM.32.0570	15.88	6.38	74.67/86.67
13	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1	LdBPK_320550.1	16.14	5.43	76.00/88.00
14	<i>Leishmania aethiopica</i> L147	LAEL147_000626400	16.17	5.43	75.33/87.33
15	<i>Leishmania arabica</i> LEM1108	LARLEM1108_320010400	16.14	5.43	75.33/87.33
16	<i>Leishmania panamensis</i> MHOM/COL/81/L13	LPAL13_320010100	15.88	6.38	74.67/86.67
17	<i>Leishmania</i> sp. MAR/LEM2494	LMARLEM2494_320010600	16.32	6.06	78.00/87.33
18	<i>Leishmania enriettii</i> LEM3045	LENLEM3045_320011000	16.32	6.80	76.67/85.33
19	<i>Leishmania tarentolae</i> Parrot-TarII	LtaP32.0570	16.10	6.03	75.33/88.00
20	<i>Leishmania gerbilli</i> LEM452	LGELEM452_320010600	16.14	5.43	75.33/87.33
21	<i>Leishmania tropica</i> L590	LTRL590_320010700	16.14	5.43	75.33/87.33
22	<i>Leishmania turanica</i> LEM423	LTULEM423_320010500	16.14	5.43	75.33/87.33
23	<i>Crithidia fasciculata</i> Cf-CI	CFAC1_190011500	16.09	6.26	77.33/86.00
24	<i>Leptomonas pyrrocoris</i> H10	LpyrH10_02_0620	16.02	6.24	74.00/84.67
25	<i>Leptomonas seymouri</i> ATCC/30220	Lsey_0035_0380	15.99	6.80	77.33/85.33

^a Calculado en la herramienta Compute pI/Mw de Expsy (web.expasy.org/compute_pi/)

^b Con respecto a la secuencia de *T. cruzi* CL-Brener Esmeraldo

10.3. Anexo 3. Especificidad del anticuerpo anti-profilina por inmunodetección por microscopía de fluorescencia.

Epimastigotes



Células HFF infectadas con amastigotes

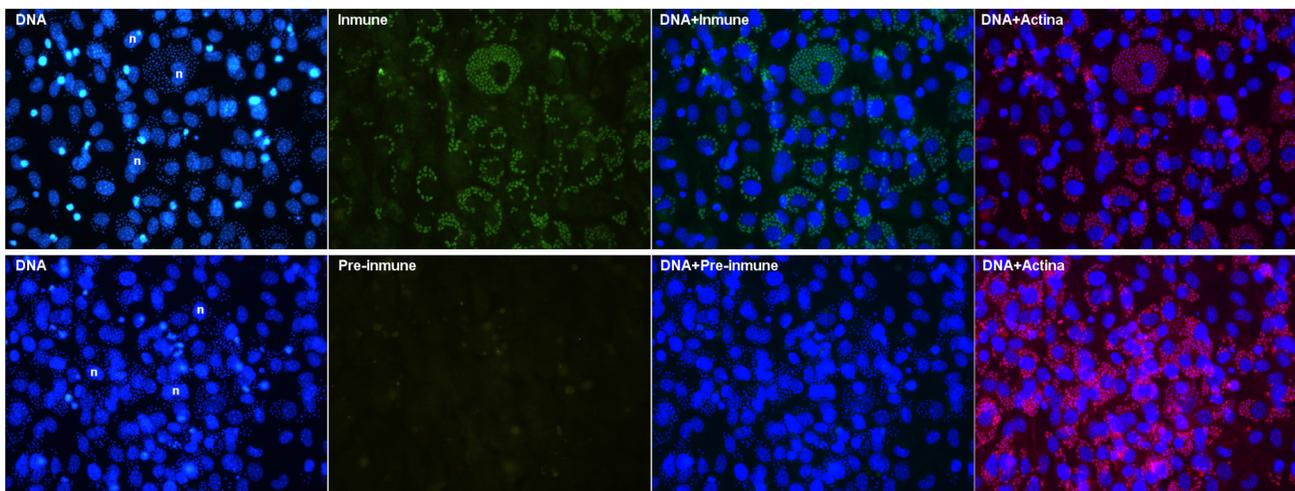


Figura 22. Especificidad del anticuerpo anti-profilina por microscopía de fluorescencia en epimastigotes y en células de humano HFF infectadas con amastigotes intracelulares. Se usó nuestro anticuerpo anti-profilina o el respectivo control pre-inmune como anticuerpo primario a una dilución 1:400. Como control positivo del ensayo se usó un suero policlonal contra la actina de *T. cruzi* producido en conejo a dilución 1:1000 (Cevallos et al., 2011). Los anticuerpos secundarios conjugados con sondas fluorescentes contra las IgG de ratón y conejo se usaron a dilución 1:400. En las imágenes de epimastigotes la posición de los parásitos se revela como puntos en tinción del DNA con DAPI del núcleo y cinetoplasto (flechas). En las imágenes de células HFF infectadas con amastigotes la posición de las células hospederas se observa como las estructuras redondeadas de mayor tamaño en la tinción del DNA con DAPI. Estas estructuras corresponden al núcleo (n). Los puntos pequeños alrededor de cada núcleo son los amastigotes. Se muestran imágenes tomadas con un objetivo de 40X por microscopía de fluorescencia de campo amplio. Las imágenes del anticuerpo anti-profilina y del control pre-inmune se tomaron usando el mismo tiempo de exposición (500 ms).

10.4. Anexo 4. Inmunodetección de la profilina en tripomastigotes y amastigotes por microscopía de fluorescencia. La señal observada para los tripomastigotes fue heterogénea y débil en comparación con la de los amastigotes.

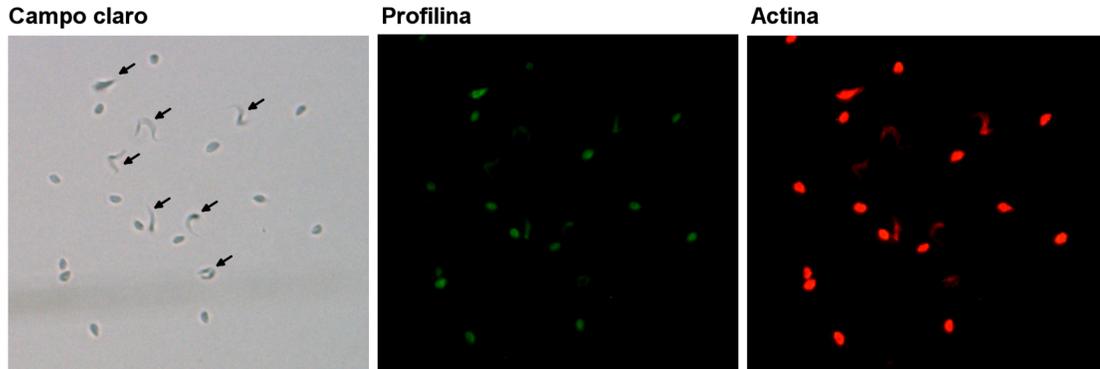


Figura 23. Inmunodetección de la profilina en tripomastigotes y amastigotes por microscopía de fluorescencia de campo amplio. Los parásitos se cosecharon de sobrenadantes de células humanas de la línea HFF infectadas con *T. cruzi*. Como anticuerpos primarios se usó nuestro anticuerpo anti-profilina a dilución 1:400 y un suero policlonal contra la actina de *T. cruzi* producido en conejo a dilución 1:1000 (Cevallos et al., 2011). Los anticuerpos secundarios conjugados con sondas fluorescentes contra las IgG de ratón y conejo se usaron a dilución 1:400. La posición de los tripomastigotes se señala con flechas en la imagen de campo claro. Se muestran imágenes tomadas con un objetivo de 40X.

10.5. Anexo 5. Proteínas de *T. cruzi* que co-purificaron con GST-profilina y GST. En cada tabla se indican los valores de confiabilidad de la identificación de cada proteína en las búsquedas con datos de masa/carga obtenidos por espectrometría de masas en tándem. Para cada proteína se muestra el número de acceso, la anotación en la base de datos y peso molecular en kDa, el número de péptidos detectado y el porcentaje de cubrimiento obtenido en las búsquedas en la base de datos de proteínas del genoma de *T. cruzi* CL-Brener.

Tabla 11. Proteínas de *T. cruzi* detectadas en 2 experimentos de co-purificación con GST-profilina

#	TriTrypDB ID	Anotación	kDa	Experimento #1		Experimento #2	
				# Péptidos	% Cubrimiento	# Péptidos	% Cubrimiento
1	TcCLB.458759.10	Profilin	16	46	67.3	32	67.3
2	TcCLB.510571.30	Actin	42	3	17.4	6	28.5
3	TcCLB.411235.9	Alpha tubulin	49.8	28	60.1	28	45.0
4	TcCLB.506563.40	Beta tubulin	49.7	17	32.1	21	25.1
5	TcCLB.511369.30	Elongation factor 1 alpha	42.7	5	11.8	6	20.9
6	TcCLB.510837.9	Acetylnithine deacetylase	34.7	15	43.0	10	38.5
7	TcCLB.506211.160	ADP ATP carrier protein 1 mitochondrial precursor	34.9	2	8.9	5	25.8

Tabla 12. Proteínas de *T. cruzi* detectadas en 1 experimento de co-purificación con GST-profilina. Se resaltan en amarillo las proteínas identificadas en los controles con GST. Estas proteínas fueron descartadas.

#	TriTrypDB ID	Anotación	kDa	# Péptidos	% Cubrimiento
1	TcCLB.506297.190	Pyruvate phosphate diikinase	100.8	23	22.1
2	TcCLB.507555.80	Retrotransposon hot spot RHS protein	104.5	24	28.5
3	TcCLB.504019.3	Hypothetical	20.5	27	25.7
4	TcCLB.507029.30	Heat shock 70 kDa protein mitochondrial precursor	70.9	14	22.4
5	TcCLB.511585.190	Eukaryotic initiation factor 4-alpha	45.4	11	21.5
6	TcCLB.508285.10	Retrotransposon hot spot RHS	67.6	7	21.3
7	TcCLB.509815.10	Retrotransposon hot spot RHS	104.4	21	22.9
8	TcCLB.507009.10	Gim5A protein glycosomal membrane protein	24.5	2	11.9
9	TcCLB.504137.50	Hypothetical	20.2	7	28.0
10	TcCLB.508221.220	Hypothetical	27.4	4	28.9
11	TcCLB.506507.20	Hypothetical	16.2	4	26.4
12	TcCLB.508741.229	Voltage dependent anion selective channel	29.6	8	29.8
13	TcCLB.507771.30	Hypothetical	20.8	5	40.6
14	TcCLB.509213.120	Peptidase M20 M25 M40	51.2	6	16.0
15	TcCLB.506845.60	Retrotransposon hot spot RHS	87.2	6	9.1
16	TcCLB.510105.100	UDP glucose dehydrogenase	56.1	4	15.0
17	TcCLB.507641.290	Chaperonin HSP60 mitochondrial precursor groEL	59.1	17	35.6

Tabla 13. Proteínas de *T. cruzi* detectadas en los controles de cu-purificación con GST

#	TriTrypDB ID	Anotación	kDa	# Péptidos	% Cubrimiento
1	TcCLB.507641.290	Chaperonin HSP60 mitochondrial precursor groEL	59.1	3	17.2

10.6. Anexo 6. Proteínas con motivos de poli-prolina codificadas en el genoma de *T. cruzi* CL-Brener. La búsqueda se realizó en TriTrypDB usando la herramienta de Prosite. Como motivo problema se utilizó una secuencia de 10 prolina consecutivas (PPPPPPPPPP).

Tabla 14. Proteínas con motivos de poli-prolina codificadas en el genoma de *T. cruzi* CL-Brener. Las proteínas se clasifican de acuerdo a su anotación.

Proteínas de unión a actina			
#	TriTrypDB ID	Anotación	Observaciones
1	TcCLB.504137.80	Adenylyl cyclase-associated protein (CAP)	Identificado por (Ono et al., 2013)
2	TcCLB.511755.80	Formin, putative (Formina A)	Identificado por (De Melo et al. 2008)
3	TcCLB.508641.320	Formin-like protein (Formina B)	Identificado por (De Melo et al. 2008)
4	TcCLB.511393.30	Formin homology 2 (FH2) domain protein (Formina C)	Identificado por (De Melo et al. 2008)
5	TcCLB.510579.90	WAHD domain of WASH complex	Identificado por (Kollmar et al. 2012)
Proteínas de la familia DGF-1			
#	TriTrypDB ID	Anotación	
6	TcCLB.507047.20	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1, pseudogene), putative	
7	TcCLB.507761.10	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1, pseudogene), putative	
8	TcCLB.507875.90	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1, pseudogene), putative	
9	TcCLB.508903.90	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1, pseudogene), putative	
10	TcCLB.510629.120	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1, pseudogene), putative	
11	TcCLB.503973.40	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
12	TcCLB.506183.20	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
13	TcCLB.507167.169	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
14	TcCLB.507551.9	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
15	TcCLB.507643.50	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
16	TcCLB.507835.70	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
17	TcCLB.507839.30	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
18	TcCLB.507999.10	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
19	TcCLB.508399.49	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
20	TcCLB.508641.10	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
21	TcCLB.509925.70	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
22	TcCLB.511771.210	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
23	TcCLB.511771.70	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	
24	TcCLB.507379.9	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative (fragment)	

Proteínas de la familia MASP			
#	TriTrypDB ID	Anotación	
25	TcCLB.508221.860	Mucin-associated surface protein (MASP) (pseudogene)	
26	TcCLB.506967.50	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S015	
27	TcCLB.508541.90	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S078	
Proteínas hipotéticas			
#	TriTrypDB ID	Anotación	Observaciones
28	TcCLB.508077.9	Hypothetical protein (fragment)	Dominio P-loop NTPases (CDD: cl21455)
29	TcCLB.510187.230	Hypothetical protein	Anotada erróneamente como Formina en TriTrypDB, Dominio PDZ (Smart: SM00228)
30	TcCLB.506915.10	Hypothetical protein, conserved	Dominio SPRY (Pfam: PF00622)
31	TcCLB.510899.40	Hypothetical protein, conserved	Dominio DnaJ (Pfam: PF00226)
32	TcCLB.507143.80	Hypothetical protein, conserved	
33	TcCLB.511627.140	Hypothetical protein, conserved	
34	TcCLB.503593.40	Hypothetical protein	
Otras proteínas			
#	TriTrypDB ID	Anotación	
35	TcCLB.508973.50	ATP-dependent RNA helicase DBP2B, putative	
36	TcCLB.506177.20	Lectin, putative	
37	TcCLB.506779.180	Surface protease GP63, putative	

11. PUBLICACIÓN

En las siguientes páginas se encuentra el artículo derivado de la presente investigación. En el se compara la secuencia de la profilina de *T. cruzi* con la de otros organismos y se describen los datos que demuestran la expresión de la proteína en diferentes estadios de desarrollo del parásito. Además, se incluyen los datos de identificación de posibles ligandos de la proteína en el parásito.



Expression of profilin in *Trypanosoma cruzi* and identification of some of its ligands



Juan Felipe Osorio-Méndez ^a, Andrea Vizcaíno-Castillo ^a, Rebeca Manning-Cela ^b, Roberto Hernández ^a, Ana María Cevallos ^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, CP 07360, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2016

Accepted 15 October 2016

Available online 15 October 2016

Keywords:

Profilin

Actin

Ligands

Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

The role and regulation of actin in *Trypanosoma cruzi* and other related parasites is largely unknown. Based on early genome analysis, it was proposed that there was a reduced dependency on the acto-myosin system in the trypanosomatid parasites. However, more recent studies have extended the set of potential actin regulatory proteins, particularly for *T. cruzi*. One of the identified actin-binding proteins in trypanosomatids is profilin. In other systems, it is capable of simultaneously binding both monomeric actin and several actin-regulatory factors. Hence, the study of profilin and its ligands may help to identify novel pathways in which actin is involved. In *T. cruzi*, profilin is encoded by a single copy gene. In this work, we demonstrated that this gene is constitutively expressed in both insect and mammalian stages of the parasite, and that the protein is diffusely distributed. Furthermore, we identified some of its potential ligands by LC-MS using GST-profilin pull-down assays of parasite's protein extracts. Many of them were trypanosomatid specific proteins with unknown functions, although proteins from the carbohydrate metabolism, and two metallopeptidases were also detected. As expected, known ligands of profilin in other organisms were identified, including actin, the microtubule components, and the elongation factor 1-alpha. Our work suggests that profilin and the actin system may be regulated by unknown factors and participate in novel biological processes.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Microfilaments and microtubules are the most conserved elements of the eukaryotic cytoskeleton. These filaments are linear polymers whose components are a globular protein named actin and α/β -tubulin dimers. In cells, actin polymerization into microfilaments is tightly regulated to rapidly start filament formation or degradation at the right place and time. This is performed by a diverse set of proteins that bind monomeric or polymeric actin, named the actin binding proteins (ABPs) [1]. Some ABPs control the initiation of polymerization by stabilizing actin oligomers that serve as seeds for the formation of new filaments. Others regulate the elongation of filaments and the turnover of actin subunits into them. There are ABPs that sever or bind to the ends of microfilaments to restrict its length or promote polymerization, whereas additional proteins can stabilize bundles or networks of

microfilaments.

We are interested in the function and regulation of the actin cytoskeleton in the protist parasite *Trypanosoma cruzi*. This species is the etiological agent of Chagas' disease, and is classified within the trypanosomatids. It has been suggested that these parasites have a characteristic cytoskeleton mainly constituted by microtubules [2]. In support of this view, the genome sequencing projects of the model trypanosomatids *T. cruzi*, *T. brucei*, and *Leishmania major*, led to the recognition of several unique microtubule-organizing factors and kinesins [3]. In contrast, a reduced set of homologous proteins to canonical ABPs were identified. Additionally, it was not possible to detect proteins involved in the cross-talk between the actin and microtubule cytoskeletons, and there was a limited set of myosins. It was then concluded that in trypanosomatids there is a reduced dependency on the acto-myosin system that is compensated by a more complex microtubule cytoskeleton. However, further scrutiny of these genomes revealed the presence of a few additional ABPs. These included coronin and the end-binding protein 1, which are proteins with microfilament binding

* Corresponding author.

E-mail address: amcevallos@biomedicas.unam.mx (A.M. Cevallos).

domains known to be involved in the cross-talk between the actin and tubulin cytoskeletons [4]. It has also been shown that *T. cruzi* has an expanded set of actins, as well as actin regulatory proteins like formins and the Cap-Z complex, and of myosins [5–7]. This growing repertoire of actins and ABPs could be increased by lineage specific proteins that may have either equivalent functions to those characterized in other organisms, or novel functions.

To get more insight into the regulation and function of actin in *T. cruzi*, we began the study of profilin. Profilin is a key regulatory factor of the dynamics of actin polymerization in most cells [8]. Although the amino acid sequences of different profilins have less than 25% identity across different kingdoms, they have a remarkable conservation in their three dimensional structure and in their described ligands [9]. Distinct domains for the interaction with actin and proteins bearing proline-rich stretches are typical structural features of profilins. They allow profilin to interact with a wide range of proteins besides actin. Most of them are related with the actin regulation, but some are involved in other functions such as transcription, RNA splicing, or endocytosis [8]. Regarding actin regulation, profilin binds to monomeric actin and prevents the spontaneous formation of microfilaments. When polymerization is activated, profilin:actin complexes bind to nucleation and elongation factors (e.g. VASP, WASP, formins) by the poly-proline binding domain of profilin [10,11]. This promotes the dissociation of the profilin:actin complex, and the subsequent delivery of the actin molecule to the barbed end of a microfilament. In trypanosomatids, the only study of profilin demonstrated its expression at the mRNA level in *Trypanosoma brucei*, and the ability of its encoding gene to complement a yeast negative mutant for profilin [12]. This work suggested that trypanosomatid's profilin is able to interact with both actin and ABPs. Therefore, we considered this protein as an attractive bait for the identification of novel actin regulatory and functional elements in *T. cruzi*. In this work, we demonstrated the expression of profilin in *T. cruzi* and identified some of its potential ligands.

2. Material and methods

2.1. Bioinformatic analysis

Multiple sequence alignment was performed with Clustal Ω (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), and analyzed in the Jalview program [13]. 3D structural modeling and analysis was performed in Phyre2 [14] and Chimera [15].

2.2. Parasites

Mid-log phase *T. cruzi* CL-Brener epimastigotes were obtained by culture at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) medium [16] supplemented with 10% fetal bovine serum, 60 μ g/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 25 mg/L haemin. Amastigotes and trypomastigotes were obtained as previously described [5].

2.3. Expression of recombinant profilin and production of polyclonal sera

Full-length CDS of *T. cruzi* profilin (TcCLB.510911.10) was cloned into the pGEX4T1 (GE Healthcare) and pMALc2C (New England Biolabs) expression vectors to express profilin as a N-terminal fusion with either GST (GST-profilin) or MBP (MBP-profilin). Recombinant protein expression was conducted in *E. coli* BL-21 (DE3) using standard procedures. GST-profilin was purified by affinity using Glutathion-Sepharose High Performance (GE Healthcare)

following the manufacturer's instructions. For MBP-profilin experiments, total bacterial lysates were used.

Affinity purified GST-profilin (10 μ g per dose) was used to immunize Balb/c mice intraperitoneally. For the primary immunization the protein was emulsified in Freund's complete adjuvant. Two boost doses were administered within 7 weeks intervals, but using incomplete Freund's as adjuvant. Blood samples were collected two weeks before the first immunization to be used as pre-immune controls. Immune sera were obtained fifteen days after the last boost. Positive sera obtained from two immunized mice were pooled at a ratio of 1:1 to be used in this study. The pooled pre-immune sera from the same mice was used as negative control. Animal handling and immunization protocol were approved by local Bioethics Committee for Animal Research.

2.4. Western blot

To produce total protein extracts, the parasites were harvested by centrifugation (1000 \times g, 10 min), washed with PBS, resuspended in 2X Laemmli's buffer, and boiled at 94 °C for 5 min. Parasite lysates were separated in 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Protein from 5×10^6 parasites was loaded per lane. PVDF membranes were blocked for 2 h with 5% non-fatty milk prepared in 0.05% Triton X-100 in PBS (PBS-T). Then, mice immune sera or its pre-immune controls (dilution 1:2000) were incubated for 2 h, followed by three washes (5 min each) with PBS-T. Monoclonal anti-tubulin- α antibody (Sigma, T6199) was used as a loading control (dilution 1:100000). As a secondary antibody, anti-mouse IgG-HRP (Thermo Scientific) (dilution 1:60000) was incubated for 1 h, followed by washes as described. Finally, the chemiluminescent signal was revealed by exposure to film. The antibodies were diluted in 2% non-fatty milk in PBS-T, and the incubations were performed at room temperature (RT) with gentle shaking.

2.5. Immunofluorescence microscopy

Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C, attached on silanized coverslips, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min, and blocked with 2% BSA for 2 h. Then, anti-profilin immune sera or its pre-immune control (dilution 1:400) were added and incubated for 1 h. After three washes with 1% BSA, the secondary anti-mouse antibodies conjugated with Alexa-Fluor[®] dyes (Molecular Probes) were added, incubated for 1 h and then washed as described above. Finally, the DNA was stained with TOTO[®]-3 (Molecular Probes), and the samples were mounted for fluorescence. The images were obtained using a Zeiss LSM 5 Pa confocal microscope and the images analyzed with ImageJ v. 1.49p.

2.6. GST pull-down assays

To produce epimastigote protein extracts, 150 mL of parasite's culture were harvested by centrifugation (1000 \times g, 10 min, RT), washed in PBS, resuspended in lysis buffer (1% Triton X-100 in PBS with cOmplete (Roche) protease inhibitors), and incubated for 15 min on ice. Protein extracts were cleared by centrifugation (13000 \times g, 20 min, 4 °C), and the soluble proteins were quantified with the DC kit (Bio-Rad) using BSA standard curves. For the pull-down assays, protein extracts from bacteria expressing GST-profilin or GST alone were incubated with 100–200 μ L of affinity beads for 1 h, and washed three times with the lysis buffer. Then, the recombinant proteins associated to the beads were incubated with 2–3 mg of parasite's protein extract overnight at 4 °C, and then washed five times with PBS. Finally, the bound proteins were

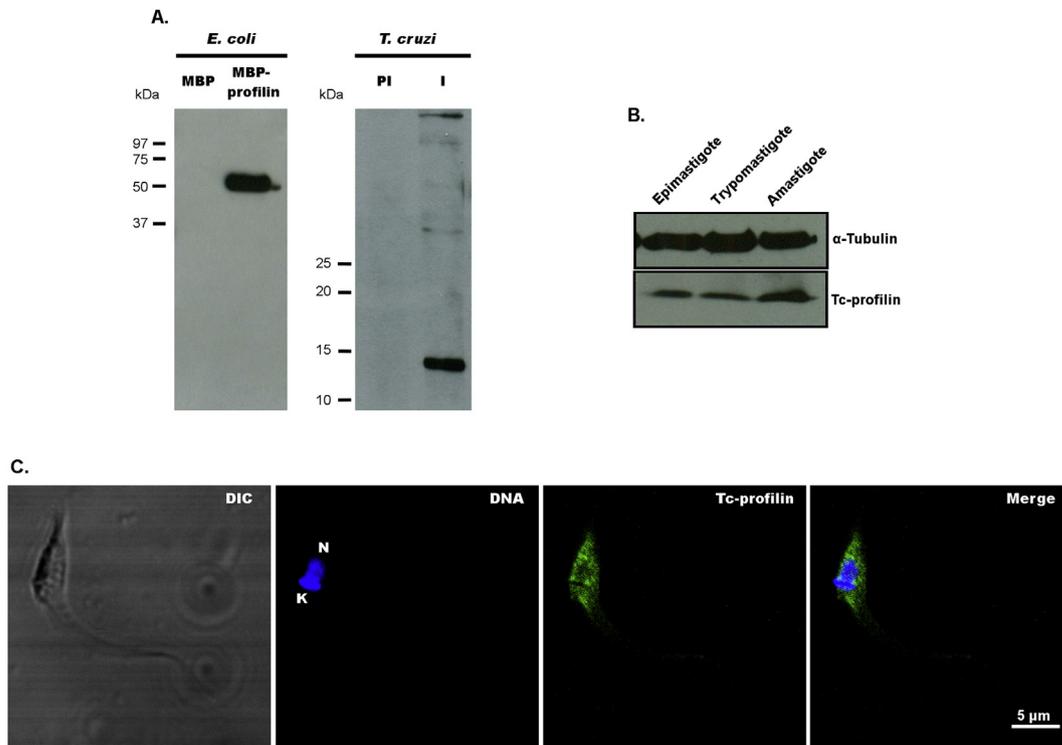


Fig. 2. Expression of Tc-profilin in different life cycle stages **A.** Western blot analysis of total *E. coli* protein extracts expressing recombinant MBP-profilin (59 kDa) and MBP (50 kDa) using polyclonal immune sera. The same analysis was conducted with total epimastigote's protein extracts, but using immune (I) and preimmune (PI) sera **B.** Constitutive expression of Tc-profilin in three developmental stages of the parasite. An anti- α -tubulin antibody was used as loading control **C.** Subcellular localization of Tc-profilin in epimastigotes revealed by confocal microscopy. The location of the nucleus (N) and kinetoplast (K) are indicated. A confocal section of 0.4 μ m is shown.

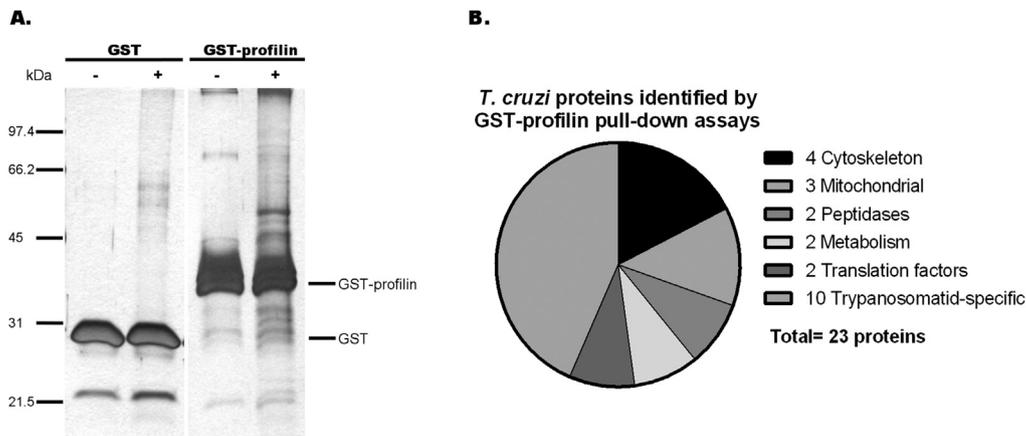


Fig. 3. *T. cruzi* proteins identified in GST-profilin pull-down assays by LC-MS **(A.)** SDS-PAGE analysis of a representative GST-profilin pull-down assay with epimastigote's protein extracts, stained with AgNO_3 . Samples from experiments using GST-profilin (42 kDa) and GST (26 kDa) that were eluted from the affinity beads before (–) and after (+) the incubation with the *T. cruzi* protein extracts are shown **(B.)** Pie chart showing the number of detected GST-profilin ligands according to its deduced function or cell location. The number of detected proteins is indicated for each group.

the specific recognition of epitopes of the target protein. To study the expression of the native protein, we conducted the same analysis but with total parasite's proteins. In extracts obtained from epimastigotes, immune sera identified a band of the expected size (16 kDa) that was not observed with the preimmune control (Fig. 2A, left panel). A band of the same size is also detected in protein extracts from cell-derived trypomastigotes and amastigotes (Fig. S1), confirming the expression of the protein in different developmental stages of the parasite. The expression of Tc-profilin seems to be constitutive during the parasite's life cycle (Fig. 2B). We then analyzed the localization of the protein by confocal

microscopy using our polyclonal sera. The specificity of the observed signal was evaluated with the corresponding preimmune control, which showed only background fluorescence (Fig. S2). As described for other profilins (e.g. Refs. [17,18]), our immune sera detected a diffuse distribution of the protein throughout the cell body of epimastigotes (Fig. 2C). A similar localization was observed in intracellular amastigotes (Fig. S3).

3.3. Profilin binds several proteins in vitro

To identify Tc-profilin ligands, we conducted GST-profilin pull-

Table 1

T. cruzi proteins identified in two of pull-down assays with GST-profilin using LC-MS. Proteins identified in the two GST-profilin pull-down assays are show in bold. Only proteins that were not detected in the GST pull-down controls were considered. In bold and with an asterisk those proteins identified in the two pull-down assays.

#	TriTrypDB ID	Protein description	Deduced function/location
Cytoskeleton			
1	TcCLB.458759.10*	Profilin (recombinant protein)	Actin polymerization
2	TcCLB.510571.30*	Actin	Microfilament
3	TcCLB.411235.9*	Alpha-tubulin	Microtubule
4	TcCLB.506563.40*	Beta-tubulin	
Mitochondrial			
5	TcCLB.506211.160*	ADP ATP carrier protein 1	Transport, inner mitochondrial membrane
6	TcCLB.508741.229	Mitochondrial outer membrane protein porin	Transport, outer mitochondrial membrane
7	TcCLB.507029.30	Heat shock 70 kDa protein	Protein folding
Metabolism			
8	TcCLB.506297.190	Pyruvate phosphate dikinase	Carbohydrate metabolism
9	TcCLB.510105.100	UDP glucose dehydrogenase	
Peptidases			
10–11	TcCLB.510837.9* , TcCLB.509213.120	Peptidase M20/M25/M40 superfamily	Metallopeptidase, TcCLB.510837.9 corresponds to the acetylmethionine deacetylase
Translation factors			
12	TcCLB.511369.30*	Elongation factor 1-alpha	Protein synthesis, actin binding
13	TcCLB.511585.190	Elongation initiation factor 4-alpha	Protein synthesis
Trypanosomatid specific			
14	TcCLB.507009.10	Gim5A	Glycosome surface in <i>T. brucei</i> [28]
15–18	TcCLB.507555.80, TcCLB.508285.10, TcCLB.509815.10, TcCLB.506845.60	Retrotransposon hot spot protein family	Associated with subtelomeric regions in <i>T. brucei</i> [29]
19	TcCLB.507771.30	Hypothetical	HIT zinc finger motif (Pfam: PF04438)
20	TcCLB.504019.3	Hypothetical	Chromosome segregation ATPase domain (CDD: COG1196)
21	TcCLB.504137.50	Hypothetical (fragment)	Unknown
22	TcCLB.508221.220	Hypothetical	Unknown
23	TcCLB.506507.20	Hypothetical	Unknown

down assays using 1% Triton X-100 soluble protein extracts obtained from epimastigotes. For this aim, recombinant GST-profilin expressed in *E. coli* was first immobilized on affinity beads. A control with immobilized GST was performed to discard *T. cruzi* proteins that bound to the tag and not to the profilin portion. A few bacterial proteins besides the recombinant proteins remained bound to the beads before incubation with *T. cruzi* proteins, as showed by SDS-PAGE analysis (Fig. 3A). Several unique bands were observed with GST-profilin compared with the GST control after the incubation with the parasite's protein extracts. These bands are expected to be Tc-profilin ligands in the parasite. To identify them, samples from two independent pull-down experiments were loaded in SDS-PAGE and briefly run to obtain a single band that was excised and subjected to trypsin digestion and LC-MS analysis. In total, 23 *T. cruzi* proteins were identified in the GST-profilin assays and not in the controls with GST (Table 1). Six of them were detected in the two experiments. Four of these are known ligands of profilin in other organisms: actin, α and β tubulins [17,19], and the elongation factor 1-alpha [20]. Another ten were trypanosomatid specific proteins most of them with unknown functions. Proteins from the carbohydrate metabolism, and two metalloproteinases were also detected. In GST controls only one *T. cruzi* protein was identified. The confidence values for each protein hit are shown in Table S1.

4. Discussion

We are interested in characterizing the actin system of *T. cruzi* and its regulation. As an initial approach, we selected profilin due to its ability to interact with actin and other ABPs. We demonstrated that the protein is expressed in various parasite stages. Then, using GST-profilin pull-down assays, we identified several of its potential ligands. One of them was the conventional actin, despite the low

conservation of the amino acids potentially involved in the interaction with this protein. The α and β tubulins have also been reported as ligands of profilin. The evidence for the interaction of profilin with the tubulin cytoskeleton was first provided by the identification of tubulin in pull-down assays of protein extracts from mouse brain using immobilized recombinant profilin as a bait [19]. Later, specific antibodies against both monomeric actin and profilin showed partial co-localization with tubulin in human fibroblasts [21]. Recently, stronger co-distribution of profilin with microtubules was uncovered in mouse melanoma cells treated with a non-ionic detergent before cell fixation [17]. Additionally, the authors demonstrated the physical interaction between these proteins by co-immunoprecipitation assays. These works indicate that profilin could be an additional link for the cross-talk of the actin and tubulin cytoskeletons. It is possible that this is also true for *T. cruzi*, suggesting a stronger communication between actin and tubulin in this organism than previously suggested [3].

In addition to the cytoskeletal ligands, proteins with other reported functions were identified in our pull-down assays. Most of them were trypanosomatid specific proteins that have not been characterized, so our work may shed light on its role. The other hits consisted of proteins with other reported functions. Based on the available literature, no plausible explanation for their interaction with profilin can be proposed. A possibility would be protein moonlighting, which refers to the co-option of proteins for multiple functions. This has been proposed as a phenomenon that may explain the discordance between the apparently reduced number of proteins revealed by genome sequences and the complexity of cells [22]. In fact, one example of protein moonlighting is the participation of the elongation factor 1-alpha (EF1- α) in the actin cytoskeleton regulation. This association was first reported in the slime mold, where the direct binding of EF1- α with actin promoted the formation of microfilament bundles *in vitro* [23,24]. In yeast this

association is conserved, and specific phenotypes in the actin cytoskeleton organization triggered by the overexpression of point mutants of EF1- α were described [25]. In this organism, a complex containing both EF1- α and profilin was also described [20]. Therefore, interactions with no apparent biological importance such as those reported in here are feasible *in vivo*. However, un-specific interactions produced by the protein solubilization procedure, and the high abundance of the identified proteins cannot be discarded.

We have verified that profilin is expressed in different developmental stages of *T. cruzi*. Using *in vitro* experiments with *T. cruzi* protein extracts, we detected several potential ligands of profilin in this parasite. This list surely represents an incomplete picture of the profilin binding proteins in *T. cruzi*. In fact, expected profilin ligands such as proteins with proline-rich regions (e.g. formins), or other actins isoforms were not detected. However, our data suggests that novel pathways of profilin and actin regulation and function should be operating in this parasite. Future studies will address the biological significance of reported interactions, and search for additional actin regulatory elements and functions in this parasite.

Acknowledgements

We thank Dr. Nuria Sanchez-Puig and Dr. Juan Miranda-Rios for fruitful discussions, Dr. Miguel Ángel Cevallos for his help in obtaining plasmids used in this work, and Dr. Miguel Tapia for his help in confocal microscopy imaging. Juliana Herrera provided general technical assistance, and Claudia Márquez-Dueñas performed *T. cruzi* cell infections. Jorge García Rebollar handled the animals for production of immune sera. This work was supported by CONACyT grants awarded to Ana María Cevallos (79815, and 239715) and Rebeca Manning-Cela (240086). Juan Felipe Osorio-Mendez thanks CONACyT (CVU/Scholarship: 369617/245674), and the Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) for funding and facilities to perform PhD studies. This article is a partial fulfillment to obtain his PhD degree.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.044>.

References

- [1] C.G.D. Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, et al., Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 433–473.
- [2] K. Gull, The cytoskeleton of trypanosomatid parasites, *Annu. Rev. Microbiol.* 53 (1999) 629–655.
- [3] M. Berriman, E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, et al., The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, *Science* 309 (2005) 416–422.
- [4] L.D.B. De Melo, C. Sant'Anna, A. Reis, et al., Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue, *Parasitology* 135 (2008) 955–965.
- [5] A.M. Cevallos, Y.X. Segura-Kato, H. Merchant-Larios, et al., *Trypanosoma cruzi*: multiple actin iso variants are observed along different developmental stages, *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 249–259.
- [6] B.J. Foth, M.C. Goedecke, D. Soldati, New insights into myosin evolution and classification, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 3681–3686.
- [7] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, et al., The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science* 309 (2005) 409–415.
- [8] W. Witke, The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes, *Trends. Cell Biol.* 14 (2004) 461–469.
- [9] T. Sun, S. Li, H. Ren, Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 512.
- [10] D.R. Kovar, E.S. Harris, R. Mahaffy, et al., Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin, *Cell* 124 (2006) 423–435.
- [11] F. Ferron, G. Rebowski, S.H. Lee, R. Dominguez, Structural basis for the recruitment of profilin–actin complexes during filament elongation by Ena/VASP, *EMBO J.* 26 (2007) 4597–4606.
- [12] W. Wilson, T. Seebeck, Identification of a profilin homologue in *Trypanosoma brucei* by complementation screening, *Gene* 187 (1997) 201–209.
- [13] A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M.A. Martin, et al., Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench, *Bioinforma* 25 (2009) 1189–1191.
- [14] L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, et al., The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 845–858.
- [15] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, et al., UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [16] G.J. Bone, M. Steinert, Isotopes incorporated in the nucleic acids of *Trypanosoma mega*, *Nature* 178 (1956) 308–309.
- [17] M. Nejedla, S. Sara, V. Sulimenko, et al., Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics, *Mol. Biol. Cell* 27 (2016) 2381–2392.
- [18] D.A. Kaiser, V.K. Vinson, D.B. Murphy, T.D. Pollard, Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 3779–3790.
- [19] W. Witke, A.V. Podtelejnikov, A. Di Nardo, et al., In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly, *EMBO J.* 17 (1998) 967–976.
- [20] M. Umikawa, K. Tanaka, T. Kamei, et al., Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor 1alpha: implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*, *Oncogene* 16 (1998) 2011–2016.
- [21] S. Grenklo, T. Johansson, L. Bertilson, R. Karlsson, Anti-actin antibodies generated against profilin:actin distinguish between non-filamentous and filamentous actin, and label cultured cells in a dotted pattern, *Eur. J. Cell Biol.* 83 (2004) 413–423.
- [22] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks, *Trends Genet.* 19 (2003) 415–417.
- [23] F. Yang, M. Demma, V. Warren, et al., Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a, *Nature* 347 (1990) 494–496.
- [24] M. Demma, V. Warren, R. Hock, et al., Isolation of an abundant 50,000-dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amoebae*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2286–2291.
- [25] S.R. Gross, T.G. Kinzy, Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2005) 772–778.
- [26] C.E. Schutt, J.C. Myslik, M.D. Rozycki, N.C. Goonesekere, U. Lindberg, The structure of crystalline profilin-beta-actin, *Nature* 365 (1993) 810–816.
- [27] N.M. Mahoney, P.A. Janmey, S.C. Almo, Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 4 (1997) 953–960.
- [28] A. Maier, P. Lorenz, F. Voncken, C. Clayton, An essential dimeric membrane protein of trypanosome glycosomes, *Mol. Microbiol.* 39 (2001) 1443–1451.
- [29] F. Bringaud, N. Biteau, S.E. Melville, et al., A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with poly-morphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*, *Eukaryot. Cell* 1 (2002) 137–151.