



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Caracterización de la expresión celular de TcAct2, una  
actina divergente de *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ANDREA CRISTINA VIZCAÍNO CASTILLO

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ana María Cevallos Gaos

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Dr. Ricardo Mondragón Flores

[Bioquímica, CINVESTAV](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Septiembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Vizcaíno Castillo Andrea Cristina**  
**Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 11 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis **"Caracterización de la expresión celular de TcAct2, una actina divergente de Trypanosoma cruzi"**, dirigida por el/la Dr(a). **Cevallos Gaos Ana María**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Camarena Mejía Rosa Laura
VOCAL	Ambrosio Hernández Javier Rolando
VOCAL	Martínez Calvillo Santiago
VOCAL	Saavedra Lira Emma Cecilia
SECRETARIO	González Pedrajo Bertha María Josefa

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de noviembre de 2019.



**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**COORDINADORA**

## RECONOCIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU: 130460).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el donativo IN207112 otorgado a la Dra. Ana María Cevallos Gaos, que permitió financiar el presente proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el financiamiento otorgado para asistir a congresos de corte nacional e internacional.

A mi comité tutorial, conformado por la Dra. Ana María Cevallos Gaos, el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco y el Dr. Ricardo Mondragón Flores, por su guía, su apoyo y sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana María Cevallos Gaos en el Laboratorio de Biología Celular de *Trypanosoma cruzi*, el cual está a cargo del Dr. Roberto Hernández Fernández del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.



## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Ana María Cevallos Gaos, por todas sus valiosas enseñanzas y consejos, tanto a nivel académico como personal, por ser un eje principal en este capítulo más de mi vida y formación académica. Gracias infinitas.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández, gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por compartir su experiencia y contribuir a mi formación.

A los integrantes del jurado: Dra. Laura Camarena, Dr. Javier Ambrosio, Dr. Santiago Martínez, Dra. Emma Saavedra y Dra. Bertha González, por todos sus comentarios, que ayudaron a enriquecer esta tesis.

A la Dra. Imelda López Villaseñor, por sus invaluable comentarios y sugerencias durante los seminarios.

A la M. en C. Juliana Herrera López y la M. en C. Karla Concepción López Pacheco, por su apoyo técnico en general y asesoría en la realización de algunas metodologías.

A la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera, del Departamento de Proteómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su apoyo en la realización de ensayos de electroforesis bidimensional.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por su asesoramiento en técnicas de tinción y su apoyo en la obtención de micrografías en microscopio confocal.

A la Dra. Rebeca Manning Cela del CINVESTAV, por proporcionarme los estadios de mamífero de *T. cruzi*, permitirme realizar algunos experimentos en su laboratorio, así como por su tiempo, disposición y enseñanzas. Gracias también a la Dra. Margarita Rubio Ortiz y la Q.F.B. Claudia Márquez Dueñas, quienes llevaron a cabo las infecciones y me asesoraron durante la realización de algunas técnicas.

Al Dr. Ricardo Mondragón Flores y la Dra. Carmen T. Gómez de León del CINVESTAV, por su ayuda para purificar la fracción IgG del anticuerpo anti-TcAct1.

A Jorge Omar García Rebollar, por la inmunización de animales para la obtención de anticuerpos, y a Patricia de la Torre, por secuenciar los plásmidos construidos en el presente proyecto.

A los miembros del laboratorio y laboratorio vecino, compañeros y amigos, viejos y nuevos: Luvia, Felipe, Ernesto, Alfredo, Arturo, Israel, Juliana, Karla, Olivia, Mónica, Ricardo, Tomás Meraz, por todo el aprendizaje y experiencias compartidas.

*A mi familia, por los ires y venires vividos juntos,  
por su apoyo y amor incondicionales, en especial a  
Rolando, a mi hermana y a mi padre.  
Y a mi madre, hasta dónde estés.*

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. CITOESQUELETO EUCARIONTE.....	2
I.2. CITOESQUELETO DE ACTINA.....	4
I.2.1. Actina-G.....	5
I.2.2. Actina-F y su polimerización <i>in vitro</i> .....	7
I.2.3 Funciones de actina .....	10
I.2.4. Isoformas .....	13
I.2.5. Proteínas de unión a actina.....	15
I.2.6. Modificaciones postraduccionales .....	19
I.3. ACTINA EN OTROS ORGANISMOS .....	21
I.4. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE <i>T. cruzi</i> .....	22
I.5. CITOESQUELETO EN TRIPANOSOMÁTIDOS .....	25
I.5.1. Actina convencional en tripanosomátidos .....	27
I.5.2. Actinas no convencionales en tripanosomátidos .....	30
II. JUSTIFICACIÓN.....	32
III. OBJETIVOS .....	33
III.1. OBJETIVO GENERAL.....	33
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
IV. DIAGRAMA DE FLUJO.....	34
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
V.1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> .....	35
V.2. PARÁSITOS.....	36
V.3. DETECCIÓN DE mRNA DE LOS GENES DE ACTINA DE <i>T. cruzi</i> .....	37
V.4. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN .....	37
V.5. TRANSFECCIÓN DE EPIMASTIGOTES.....	39
V.6. SOLUBILIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE GST-TcActinas Y GST' .....	39
V.7. ANTICUERPOS ANTI-TcAct1, ANTI-TcAct2 Y OTROS ANTICUERPOS USADOS.....	40

V.8. ISOELECTROENFOQUE (IEF) Y ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (2D) .....	42
V.9. FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	42
V.10. ENSAYOS DE INMUNOTRANSFERENCIA .....	43
V.11. INMUNOFLUORESCENCIA .....	44
V.12. ENSAYOS DE CO-PRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	45
VI. RESULTADOS.....	47
VI.1. TcAct2, TcAct3 Y TcAct4 NO ESTÁN PRESENTES EN TODOS LOS TRIPANOSOMÁTIDOS.....	47
VI.2. ANÁLISIS COMPARATIVO <i>IN SILICO</i> DE LAS SECUENCIAS DE ACTINAS DE <i>T. cruzi</i> .....	49
VI.3. EXPRESIÓN DE TcActinas COMO PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON EGFP .....	54
VI.4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TcAct2.....	58
VI.5. TcAct2 SE EXPRESA EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE <i>T. cruzi</i> .....	64
VI.6. TcAct2 ES UNA PROTEÍNA CITOSÓLICA .....	65
VI.7. INTERACCIONES PROTEICAS DE TcAct1 y TcAct2 CON LISADOS DE EPIMASTIGOTES .....	70
VI.8. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE EGFP-TcActinas EN LA METACICLOGÉNESIS.....	73
VII. DISCUSIÓN.....	75
VIII. CONCLUSIONES.....	84
IX. PERSPECTIVAS.....	85
X. REFERENCIAS.....	86
XI. APÉNDICES.....	95
Apéndice 1. Ortólogos de las actinas 1, 2, 3 y 4 de <i>T. cruzi</i> .....	95
Apéndice 2. Oligonucleótidos usados para clonar y expresar las actinas de <i>T. cruzi</i> , y otros plásmidos usados.....	96
Apéndice 3. Comparación de secuencias de aminoácidos.....	100
Apéndice 4. Expresión de TcActinas fusionadas a EGFP.....	102
Apéndice 5. Expresión de las actinas recombinantes fusionadas a GST. ....	104
Apéndice 6. Especificidad del suero inmune anti-TcAct2. ....	105
Apéndice 7. Proteínas que se identificaron en los ensayos de co-precipitación. ....	106
Apéndice 8. Ensayos de metaciclogénesis. ....	108
Apéndice 9. Condiciones usadas en los equipos.....	109
Apéndice 10. Tinción con plata.....	111
Apéndice 11. Publicaciones .....	112

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Propiedades importantes de los principales componentes del citoesqueleto.....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura de la actina monomérica (actina-G) .....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura de la actina filamentosa (actina-F) .....	8
<b>Figura 4.</b> Polimerización <i>in vitro</i> de actina.....	9
<b>Figura 5.</b> Ejemplos de procesos biológicos que dependen de actina.....	12
<b>Figura 6.</b> Diferencias principales en la secuencia de las isoformas de actina de mamíferos .....	14
<b>Figura 7.</b> Proteínas de unión a actina .....	16
<b>Figura 8.</b> Estructuras basadas en microfilamentos de actina y el tipo de nucleador involucrado .	18
<b>Figura 9.</b> Biología de <i>T. cruzi</i> .....	23
<b>Figura 10.</b> Citoesqueleto de tripanosomátidos .....	26
<b>Figura 11.</b> Actinas en tripanosomátidos .....	29
<b>Figura 12.</b> Expresión de la actina convencional en <i>T. cruzi</i> .....	30
<b>Figura 13.</b> Árbol Neighbor-Joining de secuencias de actina pertenecientes a algunos tripanosomátidos.....	48
<b>Figura 14.</b> Análisis de las secuencias de las actinas de <i>T. cruzi</i> .....	51
<b>Figura 15.</b> Modelos teóricos de las estructuras 3D de TcAct1, TcAct2, TcAct3 y TcAct4 .....	52
<b>Figura 16.</b> Amplificación de los genes de actina 1, 2, 3 y 4 a partir de una biblioteca de cDNA de <i>T. cruzi</i> .....	54
<b>Figura 17.</b> Expresión de EGFP-TcActinas.....	55
<b>Figura 18.</b> Expresión de EGFP-TcActinas en parásitos transfectados .....	56
<b>Figura 19.</b> Representación esquemática de la construcción final utilizada para la expresión de TcActinas-EGFP .....	57
<b>Figura 20.</b> El anticuerpo anti-TcAct1 no presenta reactividad cruzada con otras EGFP-TcActinas .....	59
<b>Figura 21.</b> Expresión y purificación de GST-TcAct2 para la obtención de anticuerpos .....	61
<b>Figura 22.</b> El anticuerpo anti-TcAct2 detecta específicamente la actina 2 de <i>T. cruzi</i> en lisados de parásitos .....	62
<b>Figura 23.</b> Los anticuerpos anti-TcAct1 y anti-TcAct2 detectan diferentes puntos en ensayos 2D.....	64
<b>Figura 24.</b> TcAct2 se expresa en los tres estadios principales de <i>T. cruzi</i> .....	65
<b>Figura 25.</b> TcAct1 y TcAct2 presentan diferentes distribuciones en los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> .....	66
<b>Figura 26.</b> TcAct1 y TcAct2 no colocalizan.....	67
<b>Figura 27.</b> El fraccionamiento celular por detergentes de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> indica que TcAct2 es una proteína citosólica.....	69
<b>Figura 28.</b> Proteínas que interactuaron con GST-TcAct1 y GST-TcAct2 .....	71
<b>Figura 29.</b> La expresión de EGFP-actinas parece afectar el proceso de metaciclogénesis.....	74
<b>Figura 30.</b> Esquema de las relaciones filogenéticas entre diferentes tripanosomátidos.....	83
<b>Figura 31.</b> Clonación de los genes de actina 3 y 4, con sus regiones intergénicas, en el vector pGEM-T .....	97
<b>Figura 32.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de los alelos E y No-E de TcAct2..	100
<b>Figura 33.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de TcAct1 y TcAct2. ....	101
<b>Figura 34.</b> Expresión de EGFP-TcActinas en parásitos transfectados.....	102
<b>Figura 35.</b> Expresión de TcAct2-EGFP.....	103
<b>Figura 36.</b> TcActinas recombinantes fusionadas a GST.....	104

<b>Figura 37.</b> Especificidad del suero inmune anti-TcAct2 .....	105
<b>Figura 38.</b> Ensayos de metaciclologénesis .....	108

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Familia de actinas en <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>L. major</i> .....	28
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de identidad/similitud entre las secuencias de aminoácidos deducidas de las cuatro actinas de <i>T. cruzi</i> .....	49
<b>Tabla 3.</b> Características importantes de las actinas de <i>T. cruzi</i> , en comparación con la actina- $\beta$ humana (HsActB) .....	50
<b>Tabla 4.</b> Proteínas de <i>T. cruzi</i> que interactuaron con actinas recombinantes en ensayos de co-precipitación, identificadas por espectrometría de masas.....	73
<b>Tabla 5.</b> Secuencias ortólogas de las actinas TcAct1-4 de <i>T. cruzi</i> .....	95
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos usados para la amplificación de secuencias específicas de actina a partir de una biblioteca de cDNA .....	96
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos usados para clonar secuencias codificadoras de las actinas 3 y 4.....	96
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos usados para generar proteínas de fusión con EGFP en el extremo N-terminal de las actinas (EGFP-TcActinas) .....	98
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos usados para generar proteínas de fusión con EGFP en el extremo C-terminal de las actinas (TcActinas-EGFP).....	98
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos usados para generar proteínas de fusión de las actinas con GST (GST-TcActinas) expresadas en bacterias <i>E. coli</i> .....	99
<b>Tabla 11.</b> Plásmidos utilizados como controles.....	99
<b>Tabla 12.</b> Lista de proteínas que interactuaron con TcAct1, después de aplicar los criterios de selección.....	106
<b>Tabla 13.</b> Lista de proteínas que interactuaron con TcAct2, después de aplicar los criterios de selección.....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS

Act	actina
ActB	actina- $\beta$ citoplásmica de humano
Actina-F	actina filamentosa
Actina-G	actina globular o monomérica
ABP	proteína de unión a actina (del inglés <b>Actin-Binding Protein</b> )
ADF	factor despolimerizante de actina (del inglés <b>Actin Depolymerizing Factor</b> )
ADP	difosfato de adenosina (del inglés <b>Adenosine Diphosphate</b> )
Aip 1	proteína de interacción con actina 1 (del inglés <b>Actin Interacting Protein 1</b> )
ALP	proteína tipo-actina (del inglés <b>Actin-like Protein</b> )
ARP	proteína relacionada a actina (del inglés <b>Actin-related Protein</b> )
ATP	trifosfato de adenosina (del inglés <b>Adenosine Triphosphate</b> )
BSA	albúmina de suero bovina (del inglés <b>Bovine Serum Albumin</b> )
C-terminal	extremo carboxilo terminal de una proteína
CAP	proteína asociada a ciclasa (del inglés <b>Cyclase-Associated Protein</b> )
cDNA	DNA complementario
CP o Cap	proteína de cobertura o <i>capping</i> (del inglés <b>Capping Protein</b> )
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	medio esencial mínimo Dulbecco Eagles modificado (del inglés <b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b> )
DNA	ácido desoxirribonucleico (del inglés <b>Deoxyribonucleic Acid</b> )
DTT	ditiotreitól
DTU	unidad discreta de tipificación (del inglés <b>Discrete Typing Unit</b> )
E	alelo Esmeraldo de la cepa CL Brener
EB1	proteína de unión al extremo 1 (del inglés <b>End-binding Protein 1</b> )
EF1a	factor de elongación 1a (del inglés <b>Elongation Factor 1a</b> )
EGFP	proteína verde fluorescente mejorada (del inglés <b>Enhanced Green Fluorescent Protein</b> )
FAZ	zona de anclaje flagelar (del inglés <b>Flagellum Attachment Zone</b> )
FH	dominio con homología a forminas (del inglés <b>Formin Homology domain</b> )
GAPDH	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GSH	glutación
GST	glutación S-transferasa
HFF-1	fibroblastos de prepucio humano (del inglés <b>Human Foreskin Fibroblasts</b> )
HRP	peroxidasa de rábano (del inglés <b>Horseradish Peroxidase</b> )
IEF	isoelectroenfoque (del inglés <b>Isoelectric Focusing</b> )
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LIT	infusión de hígado y triptosa (del inglés <b>Liver Infusion Tryptose</b> )
ME	miniexón
mRNA	RNA mensajero
MICAL	molécula de interacción con CasL (del inglés <b>Molecule interacting with CasL</b> )
N-terminal	extremo amino terminal de una proteína
No-E	alelo no Esmeraldo de la cepa CL Brener
pI	punto isoeléctrico
Pi	fosfato inorgánico

PBS	tampón de fosfatos salino (del inglés <b>Phosphate Buffered Saline</b> )
PBST	Tritón X-100 0.05% en PBS
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <b>Polymerase Chain Reaction</b> )
PLGS	ProteinLynx Global Server
PPDK	piruvato fosfato dicinasa (del inglés <b>Pyruvate, Phosphate Dikinase</b> )
PTM	modificación postraducciona (del inglés <b>Post-Translational Modification</b> )
PVDF	difluoruro de polivinilideno (del inglés <b>Polyvinylidene Fluoride</b> )
RHS	proteína de retrotransposón (del inglés <b>Retrotransposon Hot Spot</b> )
RNA	ácido ribonucleico (del inglés <b>Ribonucleic Acid</b> )
ROS	especies reactivas de oxígeno (del inglés <b>Reactive Oxygen Species</b> )
S1,S2,S3,S4	subdominios 1, 2, 3 y 4 que componen una molécula de actina
Sk	sarkosyl, N-lauryl-sarcosine
SDS	dodecil sulfato de sodio (del inglés <b>Sodium Dodecyl Sulfate</b> )
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés <b>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</b> )
SFB	suero fetal bovino
SUMO	modificador pequeño tipo-ubiquitina (del inglés <b>Small Ubiquitin-like Modifier</b> )
TAU	orina artificial de triatomino (del inglés <b>Triatomine Artificial Urine</b> )
TcAct	actina de <i>T. cruzi</i>
TCP1	complejo-t del polipéptido-1 (del inglés <b>T-Complex Polypeptide-1</b> )
Tritón	Tritón X-100
UTR	región no traducida (del inglés <b>Untranslated Region</b> )
WT	cepa silvestre (del inglés <b>Wild Type</b> )



## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi*, al igual que otros tripanosomátidos, presenta un citoesqueleto atípico compuesto principalmente por microtúbulos. Aunque se ha demostrado la presencia de actina convencional (TcAct1) en tripanosomátidos, no se han logrado detectar microfilamentos por microscopía electrónica, por lo que el sistema de actina en estos organismos ha recibido poca atención. Estudios bioinformáticos previos de nuestro laboratorio mostraron que *T. cruzi* también codifica para otras proteínas de la familia de las actinas, algunas de las cuales parecen ser exclusivas de este parásito. En el presente trabajo, caracterizamos la expresión celular de una de estas proteínas, denominada actina 2 de *T. cruzi* (TcAct2) la cual no se encuentra codificada en los genomas de *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*. Para corroborar si TcAct2 era en verdad una proteína específica de *T. cruzi*, buscamos la presencia de ortólogos en la base de datos TriTrypDB. Identificamos a actina 2 en otras especies de tripanosomátidos, todas ellas restringidas al grupo de los tripanosomas estercorearios, así como en *Paratrypanosoma confusum* y *Bodo saltans*. Para su caracterización, obtuvimos un suero policlonal específico contra TcAct2 y demostramos que se expresa en los estadios de epimastigote, tripomastigote y amastigote. Mediante ensayos de inmunofluorescencia, identificamos un patrón punteado en todo el cuerpo celular y en el flagelo en todos los estadios estudiados, sin que hubiera colocalización con la actina convencional. Además, ensayos de fraccionamiento celular de extractos de epimastigotes con detergentes mostraron que TcAct2 está presente sólo en la fracción citosólica, mientras que TcAct1, aunque está presente mayoritariamente en la fracción citosólica, también se encuentra presente en las fracciones solubles e insolubles a detergente. Adicionalmente, realizamos ensayos de co-precipitación utilizando actinas recombinantes fusionadas a GST, con los que identificamos algunos posibles ligandos de TcAct1 y TcAct2, aunque se requiere su corroboración por otros métodos. En conjunto, estos resultados sugieren que estas actinas podrían estar involucradas en funciones diferentes.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, like other trypanosomatids, has an atypical cytoskeleton mainly composed by microtubules. Although the presence of conventional actin (TcAct1) has been demonstrated in trypanosomatids, microfilaments have not been detected by electron microscopy. This has led to a lack of interest on the actin system in these organisms. Bioinformatic analysis performed by our lab showed that *T. cruzi* genome codifies not only for TcAct1 but also for other proteins belonging to the actin family, some of which appear to be exclusive to this parasite. In this work, the expression of one of these proteins was characterized, named as *T. cruzi* actin 2 (TcAct2), that was known to be absent both in *Trypanosoma brucei* and in *Leishmania major*. To corroborate if actin 2 was indeed a *T. cruzi* specific protein, we searched for the presence of *T. cruzi* actin 2 orthologues in the TriTrypDB. Actin 2 was identified in other species, all of them restricted to the stercoarian clade, as well as in *Paratrypanosoma confusum* and *Bodo saltans*. For TcAct2 characterization, we obtained a specific polyclonal serum against this actin and demonstrated that actin 2 is expressed during the epimastigote, trypomastigote and amastigote stages of the parasite. Immunolocalization studies identified a spotted pattern of expression along the cellular body and in the flagellum in all parasite stages, without colocalization with the conventional actin. Furthermore, detergent fractionation of epimastigote extracts showed that TcAct2 is present only in the cytosolic fractions whereas TcAct 1, although mainly cytosolic, it is also associated with the detergent-soluble and insoluble fractions. Additionally, we performed pull-down assays using GST-fused recombinant actins and identified possible ligands for TcAct1 and TcAct2. However, its verification by other methods is required. Together, these results suggest different functions for each actin.

# I. INTRODUCCIÓN

Las células están en interacción constante con el ambiente extracelular y con otras células, lo que promueve cambios en la forma y fisiología celular. Estos cambios se llevan a cabo gracias a la participación del citoesqueleto, una extensa red de filamentos constituidos principalmente por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina; sus dinámicas de polimerización están reguladas por varias proteínas que incluyen nucleadores, proteínas de corte, entrecruzadores, polimerasas y despolimerasas. Considerado inicialmente como una estructura exclusiva de células eucariontes, actualmente se sabe que existen homólogos en bacterias y arqueas para los tres componentes principales del citoesqueleto. Sin embargo, para efectos de esta tesis, sólo nos referiremos al citoesqueleto eucarionte.

Aunque todas las células eucariontes presentan citoesqueleto, la composición no es exactamente igual en todos los organismos. Algunos organismos unicelulares, particularmente eucariontes de divergencia temprana, carecen de uno o varios de los componentes del citoesqueleto, como filamentos intermedios y/o algunos factores reguladores. Un ejemplo de estos organismos son los tripanosomátidos, una familia de parásitos obligados flagelados que infectan una gran variedad de especies, incluyendo plantas, invertebrados y mamíferos. Algunos de sus miembros son muy estudiados debido a su importancia médica, entre los que destacan: *Trypanosoma brucei*, el agente causal de la enfermedad del sueño; diversas especies de *Leishmania* que producen varios tipos de leishmaniasis; y *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. El citoesqueleto de estos organismos ha sido considerado como un citoesqueleto atípico compuesto principalmente por microtúbulos. Carecen de homólogos para filamentos intermedios y, aunque se ha demostrado la presencia de actina en estos parásitos, aún no ha sido posible detectar microfilamentos por microscopía electrónica.

Nuestro grupo de investigación está interesado en el estudio del sistema de actina de *T. cruzi* y sus funciones. Previamente, identificamos el gen que codifica para la actina homóloga a la de *T. brucei* y *L. major* (Cevallos et al. 2003), y desarrollamos un anticuerpo policlonal para su análisis subcelular (Cevallos et al. 2011). Mediante estudios bioinformáticos determinamos que *T. cruzi* presenta varios genes de la familia de las actinas: cuatro genes anotados como actinas (siendo actina 1 la proteína homóloga a la de los otros dos tripanosomátidos modelo, *T. brucei* y *L. major*), tres genes anotados como proteínas relacionadas a actina y cinco genes anotados como proteínas tipo-actina. No todos los genes anotados como actinas estaban presentes en los otros dos

genomas de los organismos modelo: las actinas 2 y 3 sólo se identificaron en *T. cruzi*, lo que sugería que eran específicas de esta especie, considerando los genomas anotados en aquél entonces (Cevallos et al. 2011). Resulta de interés, por tanto, la caracterización funcional del sistema de actina en este parásito. Un paso inicial es el estudio de la expresión y localización intracelular de las diferentes actinas en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

En el presente trabajo nos centramos en la proteína anotada como actina 2, estudiando su expresión y distribución subcelular mediante la generación de anticuerpos específicos. Utilizamos a la actina 1 como patrón de comparación. En algunos experimentos se incluyeron las actinas 3 y 4 como controles. Realizamos también un análisis *in silico* comparativo de las cuatro secuencias de aminoácidos codificadas por los genes anotados como actina de *T. cruzi*, así como una actualización en la búsqueda de ortólogos en otras especies de tripanosomátidos, ya que el número de genomas anotados se ha incrementado desde el análisis bioinformático inicial. Se muestran también algunos ensayos en los que se usaron a las actinas fusionadas a EGFP.

## **I.1. CITOESQUELETO EUCARIONTE**

El citoesqueleto es una red tridimensional formada por polímeros proteicos que confiere a la célula forma y estructura; se extiende a lo largo de la célula y se encuentra adherido a la membrana plasmática y a los organelos internos. Así, contribuye a organizar espacialmente el contenido de la célula, la conecta con el ambiente externo, y genera fuerzas coordinadas que permiten a la célula moverse y cambiar de forma. Todo esto se logra gracias a la integración de actividades de una multitud de proteínas citoplásmicas que se encuentran en constante flujo (Fletcher y Mullins 2010). Por tanto, el término citoesqueleto puede ser impreciso y engañoso ya que no se trata de un esqueleto rígido y fijo sino de una red proteica dinámica y adaptativa (Gautel y DjinoVIC-Carugo 2016).

Existen tres tipos principales de polímeros del citoesqueleto eucarionte: los microtúbulos, los microfilamentos de actina, y un grupo de polímeros conocidos colectivamente como filamentos intermedios. Cada tipo de filamento es capaz de crecer rápidamente o desensamblarse, dependiendo de los requerimientos de la célula. Las diferencias más importantes entre estos componentes son su rigidez mecánica, la dinámica de su ensamblaje, su polaridad y el tipo de motores moleculares con los cuales se asocian (Fletcher y Mullins 2010). En la figura 1 se muestra la estructura general de estos polímeros y se mencionan algunas de sus propiedades.

Propiedad	Microtúbulos	Filamentos intermedios	Microfilamentos de actina
Composición	Heterodímeros de $\alpha/\beta$ tubulina	Diversas proteínas, específicos de tejido	Actina
Nucleótido unido	GTP (actividad de GTPasa)	ninguno	ATP (actividad de ATPasa)
Diámetro (nm)	25-30	~ 11	~ 6-7
Polaridad	Sí (orientación cabeza/cola) Extremo + (hacia MP) Extremo - (hacia núcleo)	No (orientación antiparalela)	Sí (orientación cabeza/cola) Extremo + Extremo -
Dinámica de ensamblaje	Inestabilidad dinámica (transición de crecimiento a encogimiento o viceversa)	Filamento de longitud unitario (FLU), formado por ocho tetrámeros (dos dímeros superenrollados forman un tetrámero antiparalelo)	Fase estable o de <i>treadmilling</i>
Rigidez	+++	+	++
Motores moleculares asociados	Cinesinas (hacia MP) Dineínas (hacia el núcleo)	ninguno	Miosinas
Funciones principales	-Forma celular -Transporte de partículas en distancias largas -Movilidad (cilios y flagelos) -Separación de cromosomas	-Forma celular -Soporte mecánico de la MP; anclan el núcleo y otros organelos -Interactúan con los diferentes componentes del citoesqueleto y coordinan la comunicación entre ellos	-Forma celular -Transporte de partículas local (distancias cortas) -Movilidad (filopodia, lamelipodia) -Citocinesis -Endocitosis

**Figura 1. Propiedades importantes de los principales componentes del citoesqueleto.** Se describen brevemente algunas de las propiedades de los tres componentes principales del citoesqueleto: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina; se muestra una representación esquemática de estos polímeros. MP, membrana plasmática. (Pollard y Cooper 2009; Fletcher y Mullins 2010; Mostowy y Cossart 2012; Gefen y Weihs 2016; Hohmann y Dehghani 2019). Imágenes modificadas de Mostowy y Cossart 2012.

En el laboratorio estamos interesados en el estudio del sistema de actina en el parásito *T. cruzi*, así que a continuación se hablará más a detalle de esta estructura.

## I.2. CITOESQUELETO DE ACTINA

La actina fue aislada por primera vez a partir de células musculares, por lo que se pensaba que estaba involucrada únicamente en la contracción muscular. Ahora se sabe que es una proteína muy abundante presente en todas las células eucariontes. De hecho, no se trata de una entidad única, ya que muchos organismos expresan más de una actina, producto de diferentes genes. Así, las actinas constituyen una familia de proteínas conservadas a lo largo de la evolución que tienen la capacidad de unir e hidrolizar ATP. Existen en forma de monómeros llamados actina-G (por actina globular), o como polímeros llamados microfilamentos o actina-F (por actina filamentosa). Las moléculas de actina, junto con un gran número de proteínas reguladoras o de unión a actina (que le permiten adquirir altos niveles de organización), constituyen el citoesqueleto de actina, siendo los microfilamentos su elemento principal (Ampe and Van Troys 2017).

Tradicionalmente, se define a una actina como una proteína globular que consiste en 375 aminoácidos aproximadamente (~42 kDa), altamente conservados; posee la capacidad de formar polímeros; y presenta un plegamiento particular en forma de U (Schleicher y Jockusch 2008). Las actinas que cumplen con estas características suelen considerarse como actinas convencionales y se agrupan en un mismo clado al realizar análisis filogenéticos. Éstas incluyen a las actinas de mamíferos y de organismos modelo de estudio, como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las actinas convencionales más estudiadas son las actinas de mamíferos, y son en las que se basa la mayoría de la información disponible sobre esta proteína. Hasta el momento, no hay reportes de algún organismo eucarionte que carezca de homólogos para las actinas convencionales.

Existen otras proteínas muy similares a las actinas que fueron identificadas inicialmente en *Saccharomyces* y que son conocidas como proteínas relacionadas a actina o ARPs (por sus siglas en inglés). Se cree que el gen de actina primordial sufrió múltiples duplicaciones muy temprano en la evolución de los eucariontes y, a través de evolución divergente, dio lugar a los genes de las ARPs (Pollard 2016). Una ARP difiere de las actinas convencionales en su tamaño y en la secuencia general de sus aminoácidos, por lo general no pueden formar polímeros y su distribución subcelular y su actividad fisiológica es diferente a la de la actina convencional (Schleicher y Jockusch 2008). Las ARPs están agrupadas en familias numeradas (ARP1 a ARP11) de acuerdo con su identidad relativa con las secuencias de las actinas convencionales. Esta identidad varía entre 17% y 52%, siendo la ARP1 la más similar. Las ARPs presentan varias inserciones y/o deleciones con respecto a la actina convencional y, por lo general, forman parte de complejos

multiproteicos, muchos de los cuales contienen al menos una molécula de actina (Muller et al. 2005; Pollard 2016).

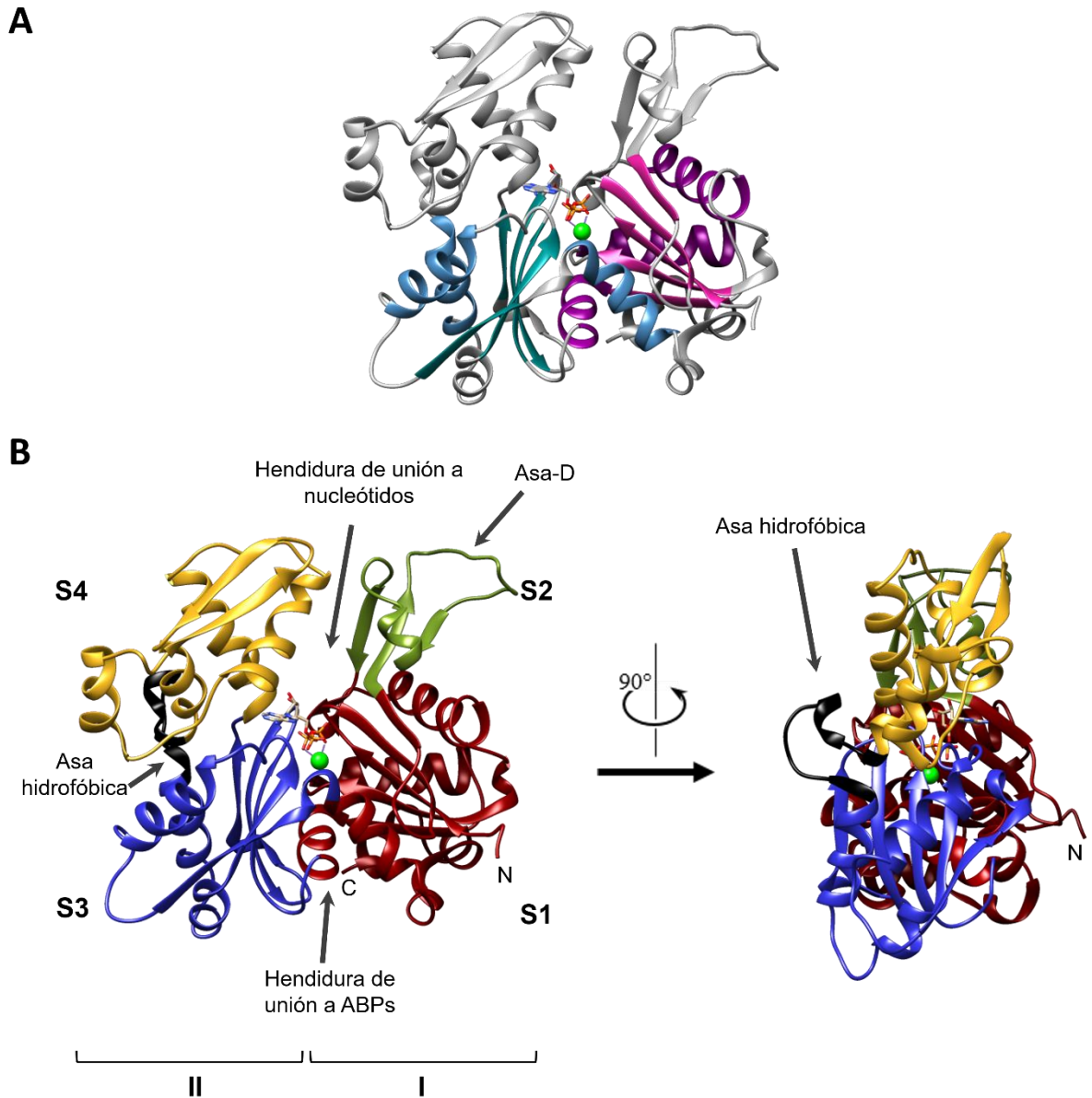
Se han identificado también, mediante estudios bioinformáticos, secuencias que codifican para proteínas de la familia de las actinas cuyas características dificultan su clasificación como actinas convencionales o ARPs. Dichas proteínas suelen denominarse proteínas tipo-actina o ALPs (por sus siglas en inglés). Algunos autores han sugerido usar el término ALP para designar aquellas proteínas que resulten ser únicas para un determinado grupo taxonómico o especies (Gordon y Sibley 2005), mientras que otros sugieren denominarlas actinas huérfanas (Muller et al. 2005).

Es evidente que, con el aumento en la secuenciación de genomas de diversos organismos, crece el número de proteínas identificadas como pertenecientes a la familia de actinas. Sin embargo, debido a las divergencias que pueden presentar sus secuencias con respecto a las actinas convencionales (dependiendo del organismo al que pertenezcan) muchas veces es difícil asignar el término adecuado, quedando etiquetadas aleatoriamente como actinas, ALPs o ARPs. Para renombrar estas actinas será conveniente desarrollar criterios biológicos que las definan, como su capacidad de polimerizar o no, su participación en procesos celulares particulares o su restricción a grupos biológicos específicos. En el presente trabajo se conserva la denominación con la que se encuentran anotadas las proteínas de actina de *T. cruzi* en la base de datos TriTrypDB.

Es necesario enfatizar que nuestro conocimiento actual sobre las actinas se basa en los estudios realizados en actinas convencionales eucariotes, principalmente en actinas de mamíferos. Este conocimiento incluye su estructura tridimensional, sus dinámicas de polimerización y sus ligandos, así como las modificaciones que puede sufrir la molécula y la cantidad de actinas por organismo, temas que serán tratados en las siguientes secciones.

### **I.2.1. Actina-G.**

Todos los miembros de la familia de las actinas comparten una misma arquitectura conocida como el “plegamiento de actina”, un motivo estructural que se caracteriza funcionalmente por tener un dominio de ATPasa con la capacidad de unir ATP en la presencia de  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  (Muller et al. 2005). Este plegamiento común o núcleo conservado consiste en dos dominios  $\alpha/\beta$  que están conectados entre sí por una especie de bisagra, con el sitio de unión a ATP situado entre los dominios, y con una topología idéntica  $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  (Figura 2A) (Kabsch y Holmes 1995; Hurley 1996).



**Figura 2. Estructura de la actina monomérica (actina-G).** A) Representación en cinta en la que se destaca el núcleo conservado, constituido por dos dominios (en tonos de rosa y azul) con topología  $\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha$ . Entre ambos dominios se observa una molécula de ATP y el catión ( $Mg^{2+}$ ) en verde. B) Representación en cinta de actina-G. Los dominios principales I y II se indican con corchetes. Cada subdominio (S1-S4) está representado en un color diferente; se observa una molécula de ATP y el catión ( $Mg^{2+}$ ) en verde en el fondo de la hendidura de unión a nucleótidos. En la vista lateral se puede apreciar mejor la ubicación del asa hidrofóbica (en negro). Todas las imágenes fueron generadas en Chimera (PDB:2BTF) (Pettersen et al. 2004).

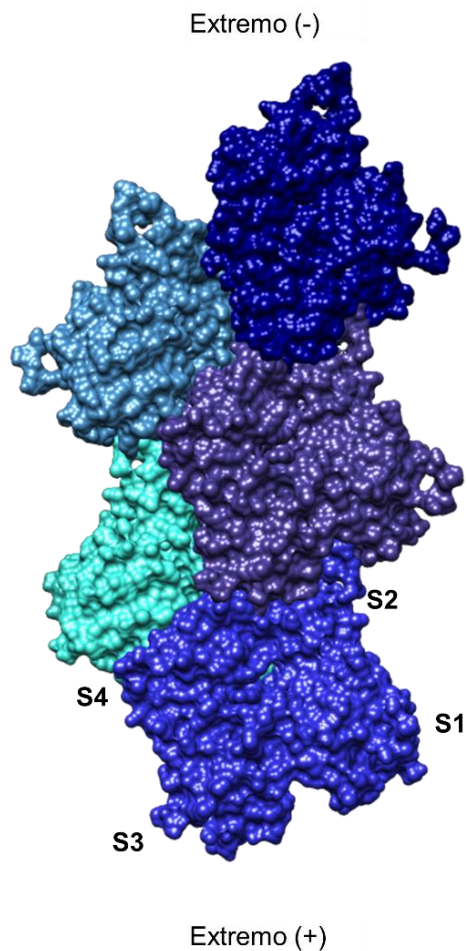
Las actinas se unen fuertemente a varias moléculas y compuestos que han servido como herramientas para su estudio. Algunos se unen a la actina en su forma monomérica, como la



DNasa I, mientras que otros se unen a la forma filamentosa, como la faloidina. La primera resolución atómica de la estructura 3D de actina fue un cristal de un monómero unido a DNasa I, que se reportó en 1990 (Kabsch et al. 1990). Desde entonces se han obtenido múltiples estructuras de actina, en su mayoría como complejos con proteínas de unión a actina. El monómero de actina se divide en dos dominios principales, denominados I y II (Figura 2B). También han sido referidos como dominios externo e interno, respectivamente (con base en su posición relativa con el eje del filamento) o como dominios pequeño y grande (por los diferentes tamaños aparentes que se ven en las microscopías electrónicas). Cada dominio está compuesto de dos subdominios, dando un total de cuatro subdominios nombrados S1 y S2 en el dominio I, y S3 y S4 en el dominio II (Figura 2B). Los dominios principales están separados por una hendidura que hace que el plegamiento adquiera una forma aproximada de U, donde se une fuertemente un nucleótido derivado de adenosina, junto con un catión divalente. En condiciones fisiológicas, este catión es  $Mg^{2+}$  y ayuda a estabilizar la unión del nucleótido (Muller et al. 2005; Hild et al. 2010; Dominguez y Holmes 2011). Entre los subdominios 1 y 3 se forma una hendidura hidrofóbica con residuos conservados, que constituye el principal sitio de unión para una gran cantidad de proteínas de unión a actina (ABPs), por lo que también se le conoce como hendidura de unión a ABPs (Dominguez y Holmes 2011). En el subdominio 2 se forma un asa (residuos 39-51) que tiene alta afinidad por DNasa I, conocida como asa de unión a DNasa I o asa-D (Figura 2B), aunque se desconoce el significado fisiológico de esta interacción (Dominguez y Holmes 2011). Entre los subdominios 3 y 4 se encuentra una estructura conocida como asa hidrofóbica (Figura 2B), y se ha demostrado que se promueve la desestabilización de los filamentos si disminuye el nivel de hidrofobicidad de dicha asa (Kuang y Rubenstein 1997).

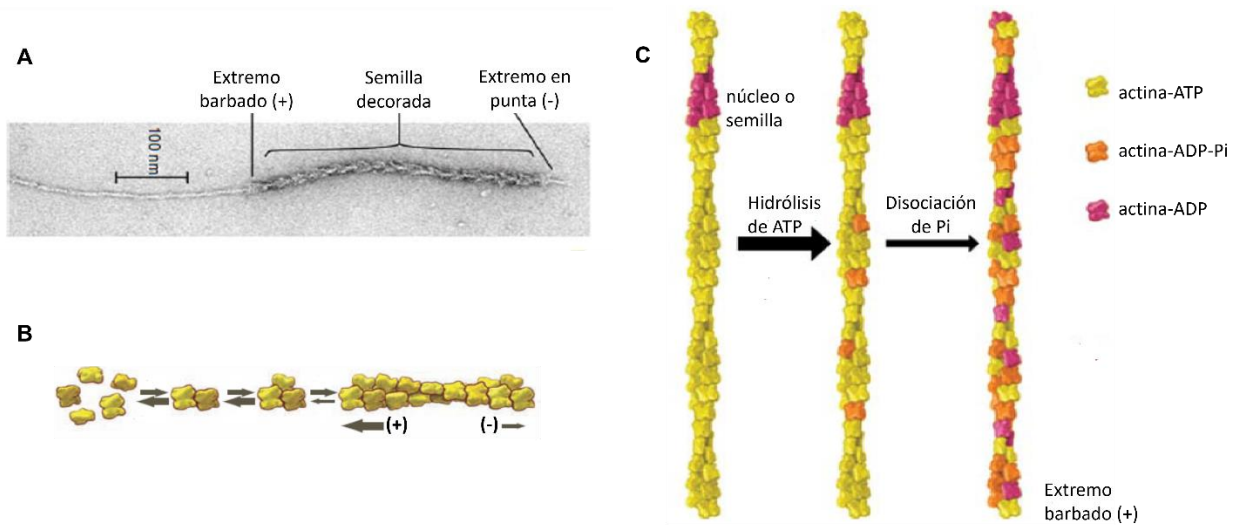
### **I.2.2. Actina-F y su polimerización *in vitro*.**

Bajo condiciones fisiológicas, los monómeros de actina polimerizan en filamentos largos y estables con un arreglo helicoidal de sus subunidades (Pollard y Cooper 2009). Esta estructura helicoidal puede verse de dos maneras: 1) como dos cadenas que giran gradualmente una alrededor de la otra para formar una hélice larga con giro hacia la derecha (Hanson y Lowy 1963); ó 2) como una hélice de una sola hebra con giro hacia la izquierda formada por 13 moléculas que se repiten cada 6 vueltas, aproximadamente (Fujii et al. 2010). En el segundo modelo, el giro por cada molécula ( $-166.6^\circ$ ) es cercano a  $180^\circ$ , por lo que la estructura aparenta ser dos cadenas que se entrelazan, girando hacia la derecha (Figura 3).



**Figura 3. Estructura de la actina filamentosa (actina-F).** Representación en superficie de la actina-F (PDB:3MFP). Se muestra un microfilamento formado por cinco subunidades, cada una en un tono diferente de azul. La subunidad inferior está en una posición aproximada a la mostrada en la figura 2B (izquierda), y se indican los subdominios (S1-S4). La imagen fue generada en Chimera (Pettersen et al. 2004).

Un aspecto importante de los microfilamentos es que tienen polaridad. Esta polaridad es conferida por la incorporación de los monómeros al filamento en una misma orientación (cabeza-cola), de tal forma que todas las subunidades en el filamento apuntan en la misma dirección. Cuando un filamento es decorado con cabezas de miosina y se observa bajo el microscopio electrónico, se aprecia un patrón en forma de cabezas de flecha. La hendidura de unión a ABPs queda ubicada en el “extremo barbado” (conocido también como extremo +), mientras que en el “extremo en punta” (o extremo -) se ubica la hendidura de unión a nucleótidos (Figura 4A).



**Figura 4. Polimerización *in vitro* de actina.** A) Micrografía electrónica (tinción negativa) de un filamento de actina. Se observa un fragmento (semilla) decorado con cabezas de miosina. La elongación realizada sin miosina permite distinguir que el extremo barbado crece más rápido que el extremo en punta. B) Mecanismo de nucleación y elongación espontánea de actina. Los monómeros interactúan entre sí para formar un dímero, y luego un trímero (núcleo estable), para dar paso a la elongación del filamento. (+)= extremo barbado; (-)= extremo en punta. C) Representación de la hidrólisis del ATP por la actividad ATPasa de actina. A partir de un núcleo (inicialmente formado por actina-ATP, pero hidrolizado con el tiempo a actina-ADP), se incorporan moléculas de actina-ATP al filamento. El ATP es hidrolizado a ADP-Pi, seguido de una lenta disociación del fosfato, lo que genera subunidades de actina-ADP. Micrografía y esquemas tomados y modificados de Pollard 2016.

La polimerización espontánea *in vitro* de los monómeros de actina se da en tres etapas: la nucleación, la elongación y el estado estacionario. La nucleación consiste en la formación de un dímero, y la subsecuente adición de un tercer monómero para formar un trímero, llamado también núcleo, que sirve como semilla para la elongación del filamento. Aunque las reacciones de asociación son rápidas, los oligómeros pequeños son muy inestables, así que este paso inicial se da muy lentamente. Durante la elongación, se favorece la adición de subunidades en ambos extremos del filamento. El extremo barbado une monómeros de actina con mayor velocidad que el extremo en punta, por lo que crece mucho más rápido (Figura 4B). El filamento crece hasta que alcanza el estado estacionario, un equilibrio dinámico en el que continúa el intercambio lento y constante de subunidades de actina con la poza de monómeros libres. Aunque el intercambio se da en ambos extremos del filamento, no se observa un crecimiento neto del mismo, lo que se conoce como *treadmilling* (Kustermans et al. 2008; Pollard y Cooper 2009). La concentración de monómeros de actina que se encuentra en equilibrio con un filamento estable se conoce como

concentración crítica. Por arriba de esta concentración, la actina-F es capaz de formarse espontáneamente; por debajo de dicha concentración, se favorece la despolimerización del filamento; cuando la concentración de monómeros es igual a la concentración crítica se establece el fenómeno de *treadmilling*.

Como se ha mencionado, la actina tiene la capacidad de hidrolizar ATP. La actividad de ATPasa de la actina-G es débil, pero se incrementa cuando se forma el filamento (Dominguez y Holmes 2011). Sin embargo, la actividad enzimática de actina no es crucial para su polimerización, aunque el autoensamblaje de actina está asociado con el ciclo de la ATPasa (Hild et al. 2010). Tras la incorporación de actina-ATP al filamento, principalmente por el extremo barbado, el ATP es hidrolizado rápidamente a ADP y fosfato inorgánico (Pi), que es liberado lentamente. Cuando finalmente se libera el Pi, la actina-ADP resultante se disocia del filamento (principalmente por el extremo en punta). De esta forma, a lo largo del filamento podemos encontrar moléculas de actina-ATP, actina-ADP-Pi y actina-ADP, dependiendo del estado de hidrólisis de las subunidades (Figura 4C). Se ha propuesto que la hidrólisis de ATP funciona como un temporizador interno que indica la edad del filamento (Pollard y Borisy 2003). Los filamentos recientes consisten en actina-ATP y actina-ADP-Pi estables, mientras que los filamentos más viejos contienen principalmente actina-ADP (Murakami et al. 2010).

Sin embargo, los procesos de ensamblaje y desensamblaje *in vitro* no son equivalentes a lo que se observa en las células. La concentración citoplásmica de actina-G es de 25-100  $\mu\text{M}$ , que corresponde a casi la mitad del total de la actina celular (Pollard 2016). Esta concentración excede la concentración crítica determinada *in vitro* (0.1  $\mu\text{M}$ ), lo que implicaría que casi el total de la actina-G polimerizara espontáneamente (Pollard 2016). Por tanto, para que las actinas puedan desempeñar sus funciones dentro de las células se requiere de proteínas auxiliares que ayuden a controlar y organizar las dinámicas de polimerización de actina, así como a ensamblar estructuras complejas a partir de los microfilamentos formados.

### **I.2.3 Funciones de actina**

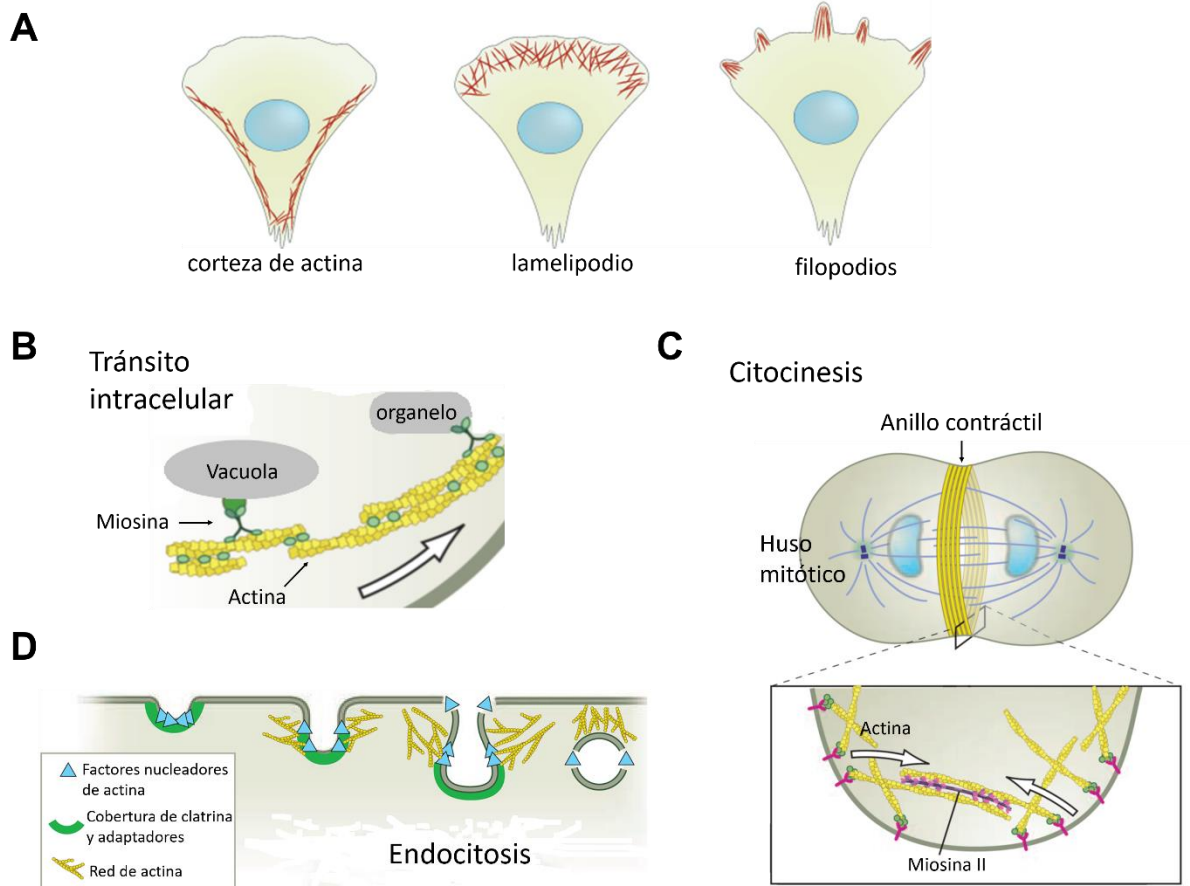
Las actinas son conocidas principalmente por conferir a las células musculares la capacidad de contraerse y dar fuerza a diferentes organismos (contracción muscular). Los microfilamentos de actina en el músculo estriado de los animales pueden ser considerados como una forma altamente especializada del citoesqueleto de actina. Sin embargo, las actinas

desempeñan también papeles críticos en una gran cantidad de procesos celulares gracias a la capacidad que tienen de formar polímeros polares. Además de en la contracción muscular, hay procesos biológicos en los que resulta clara la participación de estructuras filamentosas de actina, como el dar estructura y forma a la célula, en los procesos de movilidad celular y en el tránsito intracelular.

Los microfilamentos de actina confieren estructura mecánica y movilidad para las células ameboides y animales y junto con los microtúbulos y filamentos intermedios refuerzan el citoesqueleto (Pollard y Cooper 2009). En células animales, por debajo de la membrana plasmática, se encuentra una malla de actina-F contráctil conocida como corteza de actina (Figura 5A), formada por una mezcla de haces y filamentos entrecruzados, que es crucial para proveer rigidez cortical y es clave en determinar la forma celular (Bezanilla et al. 2015). Los efectos locales de la remodelación de actina pueden manifestarse como modificaciones en la forma global de la célula (Lacayo et al. 2007). Además, el ensamblaje de los microfilamentos de actina a partir de las subunidades monoméricas puede ser suficiente para cambiar la forma celular y producir protuberancias utilizadas para la locomoción celular (Pollard y Cooper 2009), como los filopodios y los lamelipodios que se observan en el extremo líder de células en migración (Figura 5A). Estas dinámicas están reguladas por una gran variedad de proteínas que se unen a actina, como Arp2/3, forminas y proteínas de *capping* (de las que se hablará en secciones posteriores). Los microfilamentos de actina también se usan en el tránsito intracelular (Figura 5B), al formar vías o caminos sobre los que viajan motores moleculares (conocidos como miosinas), que transportan en distancias cortas diferentes cargas como complejos macromoleculares de proteínas y RNA, vesículas y organelos (Pollard y Cooper 2009).

Otros eventos celulares que requieren de la polimerización de actina son la citocinesis y la endocitosis. El estado final de la división celular, la citocinesis, sirve para dividir físicamente una célula en dos células hijas. En las células animales dicha división se produce gracias a un arreglo específico de filamentos de actina y miosina (específicamente, la miosina II), conocido como anillo contráctil (Chen et al. 2017). Las interacciones de miosina II con los filamentos de actina (asociados a la membrana plasmática entre los polos del huso mitótico) producen fuerzas que generan un flujo cortical de filamentos de actina y grupos de miosina hacia el futuro sitio de corte. Estos filamentos se alinean alrededor del ecuador de la célula y ensamblan el anillo contráctil, el cual aprieta y genera una fuerza de contracción que deforma la membrana plasmática y

mecánicamente dirige o guía el ingreso del surco para producir la división celular (Figura 5C) (Pollard y O'Shaughnessy 2019).



**Figura 5. Ejemplos de procesos biológicos que dependen de actina.** A) Estructuras filamentosas de actina (en rojo) involucradas en estructura y movilidad de la célula. B) Transporte de vesículas y organelos por medio de miosinas que se desplazan sobre microfilamentos de actina. C) Citocinesis en una célula animal dado por la contracción de un anillo hecho de actina y miosina II. D) Endocitosis mediada por clatrina. Esquema en A modificado de <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics>. Esquemas en B, C y D modificados de Pollard y Cooper 2009.

Otro proceso celular que involucra la remodelación de la membrana plasmática es la endocitosis. El citoesqueleto de actina es una parte integral de la corteza celular, y hay evidencia de que actina-F participa directamente en los eventos de internalización de las diferentes vías endocíticas; la importancia de esta función puede variar entre diferentes organismos y tipos celulares (Engqvist-Goldstein y Drubin 2003). Se ha visto que la actina está involucrada en la formación de las protuberancias en la membrana durante la macropinocitosis y fagocitosis (May y

Machesky 2001; Lee y Knecht 2002). En la endocitosis mediada por clatrina, la actina participa en la invaginación de la membrana plasmática, la contracción y alargamiento del cuello de la vesícula y en la separación e internalización de las vesículas endocíticas (Figura 5D) (Kaksonen et al. 2006; Collins et al. 2011).

También se ha demostrado la presencia de actina en núcleo, en donde participa en varios procesos al ser un constituyente importante de varios complejos nucleares. Por ejemplo, la actina nuclear participa en el ensamblaje adecuado de los complejos de remodelación de la cromatina y ayuda a modular las dinámicas de la cromatina y su estructura (Klages-Mundt et al. 2018). Se une directamente a las RNA polimerasas I, II y III y está involucrada en la regulación transcripcional, incluyendo activación de genes y silenciamiento, así como procesamiento de RNA y *splicing* (Miyamoto y Gurdon 2013; Percipalle y Vartiainen 2019). Evidencia reciente implica a la actina nuclear en procesos de reparación del DNA (Hurst et al. 2019)

Esta multifuncionalidad de las actinas se basa en varios factores: 1) la existencia de varias especies de actinas, referidas comúnmente como isoformas; 2) su capacidad para interactuar con una gran cantidad de proteínas reguladoras o de unión a actina (ABPs, por sus siglas en inglés), y 3) su susceptibilidad para sufrir diferentes modificaciones postraduccionales. Todos estos factores son determinantes para regular el ensamblado y desensamblado de actina dentro de las células, por lo que serán abordados en las siguientes secciones.

#### **I.2.4. Isoformas**

Al hablar de las actinas convencionales, suele pensarse en ellas como una sola entidad cuando en realidad muchos organismos expresan diversos parálogos de actina. En organismos multicelulares, como mamíferos y aves, se les llaman isoformas de actina, tienden a ser específicas de tejidos (Velle y Fritz-Laylin 2019) y, desde luego, son las más estudiadas.

Las aves y mamíferos expresan seis isoformas de actina, cada una codificada por un gen diferente: cuatro isoformas musculares ( $\alpha$ -esquelética,  $\alpha$ -cardiaca,  $\alpha$ -músculo liso,  $\gamma$ -músculo liso) y dos isoformas no musculares referidas como actina- $\beta$  y actina- $\gamma$  citoplásmicas (Figura 6). Las cuatro actinas musculares están restringidas a tejidos con alta actividad tónica, como el músculo esquelético, músculo cardiaco estriado o el músculo liso de los vasos sanguíneos, pared del intestino y sistema urogenital. En contraste, las actinas citoplásmicas son ubicuas y desempeñan papeles fundamentales en la movilidad celular, transporte intracelular, mantenimiento de la forma celular o mitosis (Müller et al. 2013). La designación de  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  viene de su movilidad

electroforética en geles de 2D. La diferencia en sus puntos isoeléctricos está dada por el número y tipo de residuos ácidos en el extremo N-terminal (Perrin y Ervasti 2010; Ampe y Van Troys 2017). Estas isoformas presentan muy pocas variaciones en la secuencia de aminoácidos entre sí, con no menos del 93% de identidad entre ellas. La heterogeneidad en su secuencia se encuentra principalmente en el extremo N, aunque varias diferencias en la secuencia primaria se encuentran dispersadas a lo largo de la molécula (Herman 1993). Las dos actinas citoplásmicas sólo difieren en cuatro aminoácidos localizados entre los primeros 10 aminoácidos del extremo N-terminal (Dugina et al. 2009).



**Figura 6. Diferencias principales en la secuencia de las isoformas de actina de mamíferos.** Alineamiento del extremo N-terminal de las seis actinas de mamíferos. Se indica el porcentaje de identidad entre ellas, con respecto a la actina- $\beta$  citoplásmica. En rojo se resalta la región de mayor variabilidad entre todas las isoformas. En azul se resaltan residuos que varían entre actinas citoplásmicas y musculares. El recuadro verde señala los únicos cuatro residuos en los que difieren las actinas citoplásmicas. Basada en Perrin y Ervasti 2010.

A pesar del alto porcentaje de identidad entre ellas, cada isoforma participa en funciones únicas y especializadas, con redundancia funcional limitada. Ensayos en ratones *knockout* muestran que las deleciones de las actinas  $\alpha$ -cardiaca y  $\alpha$ -esquelética resultan letales durante el desarrollo embrionario o a los pocos días de nacimiento, respectivamente, mientras que la deleción de la actina  $\alpha$ -músculo liso provoca defectos en la contracción vascular y regulación de la presión sanguínea, sin ser letal (Perrin y Ervasti 2010). En algunos casos se puede dar una regulación compensatoria por parte de otras actinas. Por ejemplo, la sobreexpresión de la actina  $\gamma$ -músculo

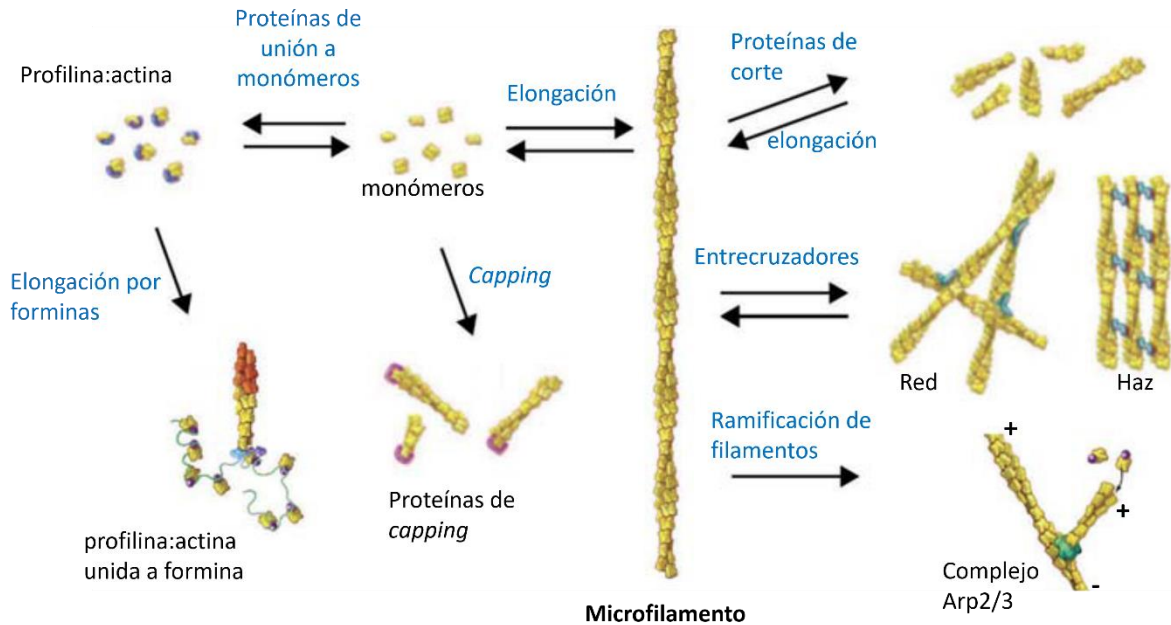


liso rescata parcialmente la delección de la actina  $\alpha$ -cardiaca en ratones (Kumar et al. 1997). En el caso de las actinas citoplásmicas, se ha demostrado que la actina- $\beta$  es esencial, ya que ratones deficientes en esta proteína mueren en etapas tempranas de desarrollo embrionario (Shawlot et al. 1998; Shmerling et al. 2005). Por el contrario, ratones *knockout* para la actina- $\gamma$  pueden sobrevivir hasta la adultez, aunque con un incremento en la mortalidad y pérdida progresiva en la audición (Belyantseva et al. 2009). Las actinas citoplásmicas son las que se encuentran formando parte de los complejos nucleares mencionados anteriormente (ver sección de Funciones de actina). La actina- $\beta$  es la isoforma que se observa de manera predominante en el núcleo (De Lanerolle 2012). Sin embargo, en estudios realizados en células de melanoma humano se detectó la presencia de ambas isoformas en núcleo (Migocka-Patrzałek et al. 2015).

### **I.2.5. Proteínas de unión a actina**

Los diferentes aspectos de las dinámicas de actina están fuertemente controlados por un gran número de proteínas celulares que permiten la rápida organización del citoesqueleto de actina en respuesta a estímulos intracelulares y extracelulares (Kustermans et al. 2008). Estas proteínas son conocidas como proteínas de unión a actina o ABPs. En las células eucariontes se han descrito más de 100 proteínas accesorias para mantener los niveles de la poza de monómeros de actina, iniciar la polimerización y promover su elongación, restringir la longitud de los filamentos, y entrecruzar los filamentos para formar redes o haces (Pollard y Cooper 2009). Sin embargo, el número y tipo de estas proteínas reguladoras depende de la especie o clado taxonómico al que pertenezca. En el caso del parásito *T. cruzi* sólo se ha identificado un número reducido de homólogos de ABPs canónicas, pero que resulta ser suficiente para regular sus dinámicas de actina.

Considerando la gran cantidad de ABPs canónicas que existen, por simplicidad sólo se describirán brevemente las características principales de las proteínas de las que se han identificado homólogos en *T. cruzi*. Aunque han sido agrupadas de acuerdo con ciertas funciones, algunas ABPs pueden participar en más de una función (Figura 7).



**Figura 7. Proteínas de unión a actina.** Representación de algunas de las funciones llevadas a cabo por diferentes familias de proteínas de unión a actina. +, extremo barbado o (+); -, extremo en punta o (-). Modificado de Pollard 2016.

### I.2.5.1. Proteínas de unión a actina monomérica

Las proteínas de unión a monómeros de actina regulan la disponibilidad de los monómeros para polimerizar, su localización subcelular y el estado del nucleótido de los monómeros (actina-G-ATP o actina-G-ADP) (Paavilainen et al. 2004). La mayoría se une en la hendidura de unión a ABPs (el “extremo barbado” del monómero). Una de estas proteínas es la profilina, que resulta ser esencial para la viabilidad de la mayoría de los eucariontes. Se encarga de regular la homeostasis de actina al inhibir la formación espontánea de dímeros y trímeros y la elongación en los extremos en punta, y a su vez favorece la adición de monómeros en los extremos barbados. Además, favorece la transición de actina-G-ADP a actina-G-ATP (Hohmann y Dehghani 2019).

La twinfilina forma parte de la familia de ADF/cofilina (de la que se hablará más adelante), pero sólo se une a monómeros de actina formando complejos estables con actina-G-ADP; inhibe el intercambio de nucleótidos y previene su ensamblaje en filamentos de actina (Paavilainen et al. 2004). Otras proteínas que interactúan con monómeros son la proteína de interacción con actina 1 (Aip1), que se une a filamentos cofilina-actina y mejora la actividad de corte, favoreciendo la despolimerización (Bamburg y Bernstein 2010), y la proteína asociada a

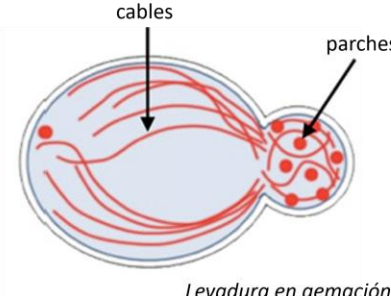
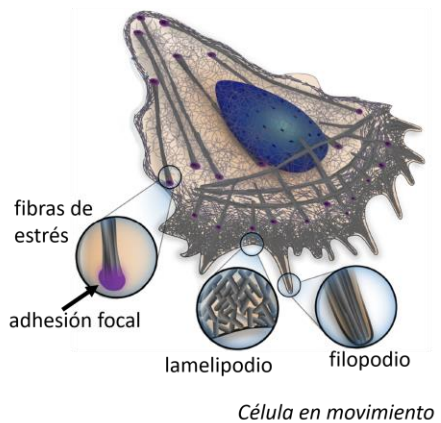
ciclasa (CAP), la cual, en cooperación con la twinfilina, promueve la disociación de subunidades de ambos extremos del filamento (Johnston et al. 2015), reciclando los monómeros de actina para posteriores eventos de polimerización (Paavilainen et al. 2004).

#### I.2.5.2. Proteínas nucleadoras y elongadoras

En el citoplasma, una gran cantidad de la actina sin polimerizar se encuentra unida a profilina, suprimiendo eventos de nucleación espontáneos (Pollard 2016). Además, debido a la inestabilidad de pequeños oligómeros de actina, la nucleación a partir de monómeros de actina no es favorable. Esto hace que las células requieran de reguladores que controlen el inicio y elongación de la polimerización en tiempo y lugar. Dos de los principales nucleadores del ensamblaje de actina son las forminas y el complejo Arp2/3. Las forminas median el ensamblaje de filamentos lineales, como los que se requieren en los filopodios, fibras de estrés y cables de actina (Figura 8). Mediante dominios de homología con forminas (FH), que son característicos de las forminas, interactúan con la actina de manera directa (por medio del dominio FH2) o de manera indirecta a través del dominio FH1 (el cual interactúa con la profilina presente en complejos de profilina-actina). Así, promueven no sólo la nucleación, sino también la elongación progresiva de los extremos barbados, al permanecer asociadas a este extremo y simultáneamente habilitar la adición de subunidades (Hild et al. 2010; Dominguez y Holmes 2011).

El complejo Arp2/3 participa en la formación de filamentos ramificados involucrados en endocitosis y en la movilidad celular por lamelipodios (Figura 8). Consiste en siete proteínas: dos ARPs (ARP2 y ARP3) estabilizadas en un estado inactivo por otras cinco subunidades (ARPC1-ARPC5). El complejo Arp2/3 requiere ser activado por otras proteínas conocidas como factores promotores de la nucleación. Este complejo se une a lo largo de filamentos ya existentes para nuclear nuevos filamentos, formando ramificaciones; el extremo en punta del nuevo filamento queda anclado por medio del complejo Arp2/3 al filamento preexistente, mientras su extremo barbado crece hasta que una proteína de *capping* termina la elongación (Dominguez y Holmes 2011).

Nucleador	Estructura	Descripción
Forminas	Cables	-haces de filamentos paralelos polarizados -se extienden a lo largo del eje celular -dirigen el transporte intracelular (vesículas y organelos) y logran el crecimiento celular polarizado
	Filopodios	-haces de filamentos alineados que forman estructuras en forma de dedos al frente de las células
	Fibras de estrés	-haces de filamentos antiparalelos o de polaridad mixta que contienen miosina -conectan el citoesqueleto a la matriz extracelular por medio de adhesiones focales -participan en contractilidad celular, y proveen fuerza para un gran número de funciones como adhesión celular, migración y morfogénesis
Complejo ARP2/3	Parches	-redes densas de filamentos ramificados -ubicados en sitios de endocitosis y en zonas de crecimiento polarizado en levaduras
	Lamelipodios	-redes ramificadas y entrecruzadas, que forman una hoja cuasi bidimensional presente en la periferia de células en migración

**Figura 8. Estructuras basadas en microfilamentos de actina y el tipo de nucleador involucrado.** Se describen brevemente algunas de las estructuras basadas en actina-F, indicando el tipo de nucleador involucrado en su generación, y se muestran representaciones esquemáticas de estas estructuras filamentosas (Amberg 1998; Bretscher 2013; Blanchoin et al. 2014; Mishra et al. 2014; Letort et al. 2015).

### I.2.5.3. Proteínas de corte

Una de las familias principales de proteínas de corte de filamentos de actina es la familia del factor despolimerizante de actina (ADF)/cofilina. Las cofilinas son moléculas pequeñas que se unen al extremo barbado tanto de los monómeros (en los que inhibe el intercambio del nucleótido) como de los filamentos de actina. Tienen mayor afinidad por actina-ADP, pero se unen débilmente a actina-ADP-Pi y favorecen la liberación del Pi. Su principal función es cortar los filamentos, creando así extremos libres para su despolimerización (Pollard 2016). Los filamentos de actina ricamente decorados con ADF/cofilina se estabilizan, mientras que los que presentan pocas ADF/cofilina unidas se fragmentan más rápido (Hohmann y Dehghani 2019).

#### I.2.5.4. Proteínas de unión a microfilamentos

Se ha descrito un gran número de proteínas de unión a microfilamentos, pero solamente se ha identificado un número reducido de ellas en el genoma de los tripanosomátidos incluyendo la proteína de *capping*, coronina, EB1 y miosinas. La proteína de cobertura o *capping* (CP) también es conocida como CapZ en las células musculares y se identifica así en el genoma de *T. cruzi*. Esta proteína está formada por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), y se une específicamente a los extremos barbados de los filamentos de actina con alta afinidad para evitar la asociación y disociación de monómeros en este extremo. De esta forma, actúa como un importante regulador de las dinámicas de los filamentos de actina en las células al prevenir la producción de filamentos demasiado largos y mantener la poza de actina-G citosólica (Takeda et al. 2010).

Otras proteínas permiten la asociación de microfilamentos con otras estructuras del citoesqueleto, como los microtúbulos. Estas proteínas incluyen a las coroninas (Sahasrabudde et al. 2009) y a la proteína EB1 (Alberico et al. 2016). Debido a esto se ha sugerido que participan en la comunicación del citoesqueleto de actina con otros componentes celulares.

Las miosinas, motores moleculares dependientes de ATP que forman parte de una gran y diversificada familia, también se unen a filamentos de actina. Están relacionadas con varios procesos moleculares en los que se requiere de la generación de fuerzas contráctiles, como en la contracción muscular en metazoarios, la citocinesis, y la migración celular. Por otro lado, participan en el transporte de cargas moleculares y organelos en distancias cortas al moverlos sobre filamentos de actina (Pollard y Cooper 2009; De Souza et al. 2018).

Un resumen breve de la participación de ABPs en la regulación de las dinámicas de crecimiento de filamentos sería: la proteína de *capping* se une a extremos barbados, terminando la elongación; la ADF/cofilina se une débilmente a regiones actina-ADP-Pi del filamento y promueve la disociación del Pi; las regiones de filamento con actina-ADP son más afines a la unión de ADF/cofilina, lo que lleva al corte y despolimerización del filamento; la profilina se une a estos monómeros disociados promoviendo el intercambio de ADP por ATP; la actina-ATP unida a profilina rellena la poza de subunidades disponibles para ser ensambladas (Pollard 2003).

#### **I.2.6. Modificaciones postraduccionales**

Otra característica importante, y tal vez menos apreciada, que contribuye en la estructura, localización y función de las actinas son las modificaciones postraduccionales (PTMs) que puede

sufrir la molécula. Las PTMs son procesos, con frecuencia reversibles, en los que se adiciona un grupo químico o una proteína a los residuos de aminoácidos de otra proteína para alterar sus propiedades funcionales. Estas modificaciones son ampliamente usadas en la regulación de actina, e incluyen acetilación, arginilación, fosforilación, oxidación, ubiquitinación, entre otras (Varland et al. 2019). Dependiendo del residuo modificado, las PTMs pueden presentar diferentes efectos sobre la función de actina, aumentando la complejidad funcional y reguladora de actina. El número de PTMs que pueden sufrir las actinas es numerosa (Terman y Kashina 2013), así que sólo se mencionarán algunos ejemplos y sus consecuencias fisiológicas.

Una de las PTMs más conocida de actina es la acetilación del extremo N-terminal. Durante la maduración de las actinas citoplásmicas, la metionina N-terminal es removida por aminopeptidasas (y en el caso de las actinas musculares, se remueve también el segundo aminoácido), seguida de la acetilación del nuevo residuo N-terminal por acetiltransferasas N-terminales específicas (Dugina et al. 2019). Esta modificación se requiere normalmente para la maduración y mantenimiento de las propiedades estructurales y funcionales en varias especies, aunque la acetilación parece no ser necesaria en los eucariontes inferiores. La acetilación parece desempeñar papeles importantes en la modulación del papel de actina en el movimiento celular, transporte intracelular y regulación de la transcripción (Terman y Kashina 2013).

Otra modificación del extremo N-terminal es la arginilación de la actina- $\beta$ . Ésta se da tras la acetilación del extremo N, ya que quedan expuestos aminoácidos (Asp o Glu) que pueden ser arginilados por la arginiltransferasa Ate1. Sin embargo, la acetilación y arginilación del extremo N-terminal son mutuamente excluyentes (Varland et al. 2019). Solamente la actina- $\beta$ , pero no la actina- $\gamma$ , es arginilada en su extremo N, y esta modificación es esencial para controlar la polimerización y la formación de lamelipodios en las células móviles (Karakozova et al. 2006).

La actina puede ser poliubiquitinada, marcándola así para su degradación (Polge et al. 2011), o monoubiquitinada, en cuyo caso le confiere estabilidad al filamento y localización subcelular diferencial. La arthrina es una forma monoubiquitinada de actina muscular en *Drosophila*, que se encuentra distribuida cada siete unidades dentro de un filamento, y se sugiere que regula la actividad contráctil del músculo (Burgess et al. 2004). Por otro lado, la modificación de actina por SUMO, la retiene en el núcleo (Hofmann et al. 2009).

La actina es susceptible de sufrir PTMs mediadas por estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS), o de ser oxidada directamente por enzimas. Estas modificaciones incluyen oxidación, nitrosilación, nitración, carbonilación y glutationilación. Esta

susceptibilidad varía dependiendo del estado de actina, es decir, del tipo de nucleótido unido, así como de su estado monomérico o filamentoso (Terman y Kashina 2013). Muchas de estas modificaciones son irreversibles e inhiben la proliferación y movilidad celular y reducen la viabilidad (Varland et al. 2019). Recientemente se demostró que las modificaciones inducidas por ROS son reguladores importantes en ciertas vías celulares. Por ejemplo, la oxidación mediada por la monooxigenasa MICAL promueve la despolimerización de actina-F e incrementa la susceptibilidad para cofilina, sin importar el estado del nucleótido unido (Grintsevich et al. 2017).

La fosforilación es un regulador postraducciona importante, por lo que no sorprende que actina posea varios sitios de fosforilación que pueden tener efectos positivos o negativos en la polimerización. La fosforilación de Tyr53 en *Dictyostelium* interfiere con la polimerización, posiblemente por alteración del contacto entre subunidades (Liu et al. 2006). Por el contrario, la fosforilación de Thr201-203 en el mohó *Physarum* lleva a la elongación de los filamentos (Waelkens et al. 1995). En neuronas de ratas, la fosforilación dinámica de Tyr53 aumenta la velocidad de recambio de actina-F al desestabilizar los filamentos largos y estabilizar los filamentos cortos, promoviendo una reorganización más rápida del citoesqueleto en las espinas dendríticas en maduración (Bertling et al. 2016).

### **I.3. ACTINA EN OTROS ORGANISMOS**

Mientras los mamíferos poseen seis genes de actina, otros eucariontes presentan un número variable de genes de actina. Algunos organismos, como *S. cerevisiae* sólo tienen un gen de actina que lleva a cabo todas las funciones (Gallwitz y Seidel 1980), y esta actina es 90% idéntica en su secuencia de aminoácidos a las actinas de mamíferos. En contraste, el número de genes de actina en plantas es mayor. Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* tiene 10 genes, *Glycine max* (soya) tiene 17, en *Zea mays* (maíz) hay 21, y en *Petunia*, un caso excepcional, se han identificado más de 100 (Šljajčeroová et al. 2012; Gunning et al. 2015).

En protistas también se observan diferencias en el número de genes de actina y en algunos de estos organismos han surgido subfamilias de actina altamente divergentes. Un organismo interesante es el parásito intestinal *Giardia*, que posee una única actina considerada la más divergente estudiada al momento (con 58% de identidad, en promedio, con otras especies). Sin embargo, este parásito carece de las ABPs canónicas, incluyendo el complejo Arp2/3, forminas y miosinas (Paredes et al. 2011). Otros protistas que sólo presentan un gen de actina convencional

son *Toxoplasma* y *Tetrahymena* (Cupples y Pearlman 1986; Dobrowolski et al. 1997). Dentro de los protistas que presentan más de una actina está *Plasmodium falciparum*. Este parásito expresa dos actinas codificadas por dos genes diferentes: PfActI se expresa durante todo el ciclo de vida del parásito, mientras que PfActII, con 79% de similitud con PfActI (Wesseling et al. 1988) se expresa solamente en las formas reproductivas (Wesseling et al. 1989). Estas actinas polimerizan en filamentos muy pequeños, pero pueden formar filamentos más largos y estables si se adiciona faloidina (Skillman et al. 2011). En *Paramecium tetraurelia*, se han reportado 19 parálogos de actina, los cuales muestran funciones divergentes que se relacionan con localizaciones específicas en la célula (Sehring et al. 2007). En los tripanosomátidos se observa también un incremento en el número de genes de actina (Berriman et al. 2005; Cevallos et al. 2011). Es claro que la complejidad de un organismo no se relaciona con la cantidad de genes de actina que pueda tener.

Aunque las actinas se encuentran bien caracterizadas en varios organismos incluyendo varios protozoarios (como algunos de los mencionados arriba), aún es poco lo que se conoce acerca de la familia de actinas presente en parásitos tripanosomátidos, como es el caso de *Trypanosoma cruzi*.

#### **I.4. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *T. cruzi***

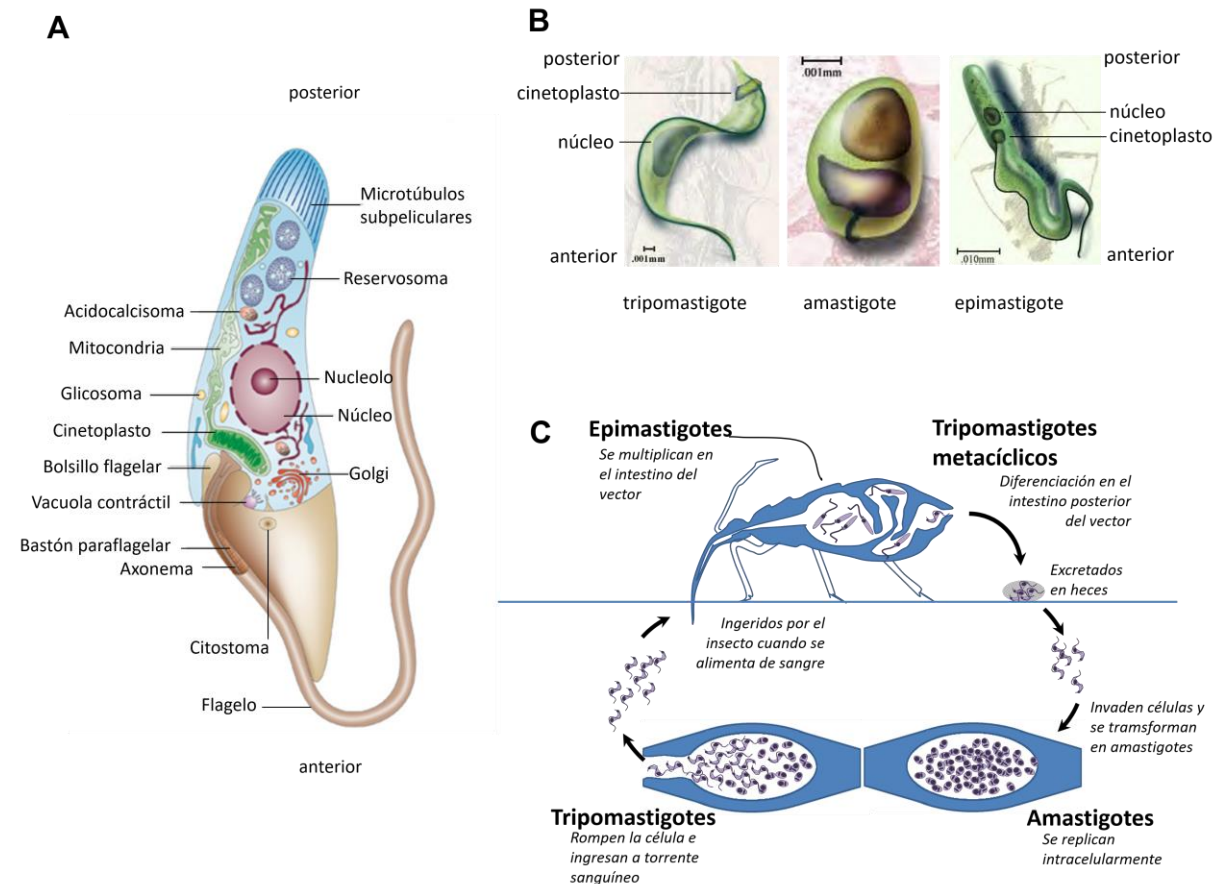
Los tripanosomátidos (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae) son organismos parásitos que se caracterizan por tener un solo flagelo y por la presencia de una estructura conocida como cinetoplasto, que contiene el material genético mitocondrial (kDNA). Dentro de los tripanosomátidos se encuentran los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, que incluyen varias especies que causan enfermedades graves en humanos, como leishmaniasis (producida por *Leishmania* spp) y tripanosomiasis (producidas por *T. brucei* y *T. cruzi*). Estas enfermedades son transmitidas al hombre por medio de insectos vectores. Dependiendo de la ruta de transmisión vectorial, los tripanosomas se pueden dividir en dos grupos principales: los tripanosomas estercorearios (transmitidos en las heces del vector) y los tripanosomas salivarios (transmitidos mediante la picadura del vector).

*T. cruzi* forma parte del grupo de tripanosomas estercorearios y es el agente causal de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Es una especie heterogénea con una gran diversidad genética y fenotípica, que ha sido clasificada en varias unidades discretas de tipificación (DTUs, por sus siglas en inglés), denominadas TcI a TcVI. Las DTUs TcV y TcVI son linajes



híbridos originados de la recombinación de cepas parentales divergentes de los DTUs TcII y TcIII. Además, se ha descrito un linaje adicional que se encuentra principalmente en murciélagos (TcBat) (Zingales et al. 2012).

Como todas las células eucariontes (y al igual que todos los tripanosomátidos), *T. cruzi* presenta los organelos característicos de las mismas, como núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y una mitocondria que se extiende a lo largo del cuerpo celular. Además, presentan características estructurales únicas como son el cinetoplasto (contenido dentro de la mitocondria), los glicosomas, el bastón paraflagelar, el bolsillo flagelar (invaginación de la membrana plasmática por donde emerge el flagelo) y una capa de microtúbulos subpeliculares (De Souza et al. 2017) (Figura 9A).



**Figura 9. Biología de *T. cruzi*.** A) Esquema que muestra las principales estructuras y organelos de un epimastigote. Modificado de Docampo et al. 2005. B) Estadios principales del parásito, señalando la posición del núcleo y del cinetoplasto. Modificado de Muñoz-Saravia et al. 2012. C) Ciclo de vida. Para la descripción del ciclo, referirse al texto. Basado en los esquemas publicados en Macedo et al. 2002 y <https://www.uta.edu/chagas/html/biolCont.html>.

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo caracterizado por diferentes morfologías, con estadios replicativos (epimastigotes y amastigotes) y no replicativos, pero infectivos (tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos). A esta capacidad de cambiar de forma durante su ciclo de vida se le conoce como diferenciación o transformación (De Souza et al. 2017). Las formas morfológicas principales (epimastigote, amastigote y tripomastigote) se distinguen entre sí de acuerdo con las características del flagelo y la posición relativa del cinetoplasto con respecto al núcleo (De Souza 2002) (Figura 9B). El parásito se mueve en la dirección del extremo libre del flagelo (lo que define a este extremo como la región anterior) y parte de la membrana flagelar está fuertemente unida a la superficie del cuerpo (Kowalska et al. 2011). En los epimastigotes, el flagelo emerge de la región lateral anterior y el cinetoplasto se encuentra ubicado en la parte anterior al núcleo. Los amastigotes tienen un núcleo grande y un cinetoplasto prominente, también ubicado anterior al núcleo, sin flagelo libre (es decir, un flagelo corto que no se extiende más allá del bolsillo flagelar). En los tripomastigotes, el flagelo emerge del extremo apical posterior y el cinetoplasto está ubicado en la parte posterior del núcleo.

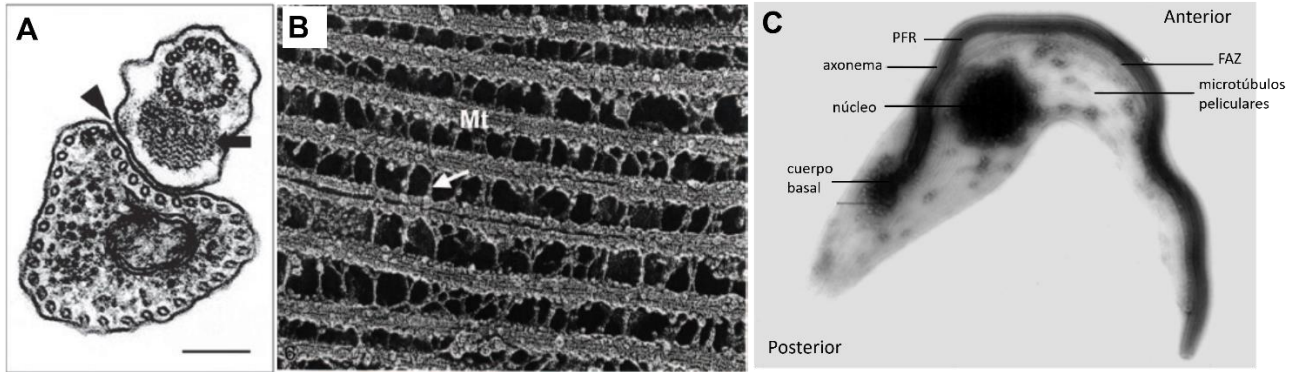
*T. cruzi* alterna su ciclo de vida entre hospederos invertebrados y vertebrados (Figura 9C). Los invertebrados responsables de la transmisión del parásito son insectos de la subfamilia Triatominae. Los triatominos son insectos hematófagos que suelen defecar cuando se alimentan de la sangre de un mamífero. La picadura produce comezón, fomentando que el hospedero se rasque e introduzca a los tripomastigotes metacíclicos (que fueron excretados junto con las heces) a través de la herida producida por la picadura o a través de membranas mucosas. Tras la introducción en el hospedero humano, los parásitos invaden muchos tipos de células nucleadas, incluyendo macrófagos del tejido subcutáneo en el sitio de inoculación. En el citoplasma, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, la forma intracelular del parásito, y se replican para después diferenciarse a tripomastigotes sanguíneos, que son liberados tras la ruptura celular. Estos tripomastigotes pueden entonces infectar otras células o ingresar al torrente sanguíneo. Si un insecto triatomino se alimenta de un mamífero infectado, ingiere los tripomastigotes presentes en la sangre, que al llegar al intestino medio del vector se transforman en epimastigotes (el estadio replicativo dentro del insecto). Los epimastigotes migran hacia el intestino posterior de la chinche y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (proceso conocido como metaciclogénesis), cerrando el ciclo (Kowalska et al. 2011; Bern 2015).

La reorganización dramática de las estructuras celulares que se presenta al pasar de un estadio a otro, así como la adaptación a diferentes hospederos, requieren de rearrreglos muy importantes en el citoesqueleto del parásito.

## **I.5. CITOESQUELETO EN TRIPANOSOMÁTIDOS**

Muchas de las estructuras y organelos en los tripanosomas están presentes como estructuras individuales con ubicaciones subcelulares definidas y son altamente interdependientes de los procesos de duplicación, segregación y herencia. En muchos de estos procesos el citoesqueleto desempeña un papel crucial, al definir el posicionamiento de sus organelos, y determinar la arquitectura de la célula (Portman y Gull 2012). El citoesqueleto de tripanosomátidos está constituido principalmente por una capa de microtúbulos adosados a la cara interna de la membrana plasmática. Se conocen como microtúbulos subpeliculares o corsé subpelicular y recorren todo el cuerpo del parásito, lo que le confiere rigidez a la célula. Estos microtúbulos se encuentran regularmente espaciados y están conectados entre sí (De Souza 1984; Vidal y De Souza 2017) (Figura 10). Otros componentes del citoesqueleto de tripanosomátidos son el flagelo (compuesto por el axonema y el bastón paraflagelar), el cuerpo basal, y la zona de anclaje flagelar (FAZ). Parte del flagelo se adhiere al cuerpo celular a través de un sistema de filamentos citoplásmicos conocido como zona de anclaje flagelar. El axonema flagelar tiene un arreglo de microtúbulos típico de 9+2 (nueve pares periféricos con dos microtúbulos centrales), que surgen del cuerpo basal. Adosado al axonema se encuentra el bastón paraflagelar, una estructura en forma de red que se identifica desde la salida del flagelo del bolsillo flagelar hasta la punta del mismo. Está presente en todos los estadios, excepto en los amastigotes, en los cuales el flagelo no emerge del bolsillo flagelar (Kohl y Gull 1998; Gull 1999; Portman y Gull 2010; De Souza et al. 2017).

Aunque desde hace décadas se demostró la presencia de actina en tripanosomátidos (De Souza et al. 1983; Mortara 1989), aún no se han logrado detectar estructuras filamentosas similares a las observadas en mamífero por microscopía electrónica o tinción con faloidina. Esto hizo suponer que, en comparación con otros organismos eucariontes, los tripanosomátidos tenían un citoesqueleto basado en tubulina con una dependencia reducida en el sistema de actina (Berriman et al. 2005), haciendo que la actina recibiera poca atención.



**Figura 10. Citoesqueleto de tripanosomátidos.** A) Microscopía de transmisión electrónica de un corte transversal de la parte anterior de una forma procíclica de *T. brucei*. Flecha, bastón paraflagelar; cabeza de flecha, FAZ. B) Arreglo paralelo de microtúbulos (Mt) donde se observa el espaciado regular entre ellos y las fibrillas que los conectan (flecha). C) Microscopía electrónica (tinción negativa) del citoesqueleto de *T. brucei* extraído con detergentes, donde se muestran las estructuras principales. PFR, bastón paraflagelar; FAZ, zona de anclaje flagelar. Micrografías tomadas de Woods et al. 1989; Portman y Gull 2012; Vidal y De Souza 2017.

Con la secuenciación de los genomas de los tres tripanosomátidos de importancia médica, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, se identificaron genes homólogos putativos para proteínas de unión a actina. Los tres organismos tienen genes que codifican para proteínas involucradas en la unión a actina monomérica (profilina, twinfilina, ADF/cofilina, Aip1 y CAP); en la nucleación de actina filamentosa (dos forminas y el complejo Arp2/3); dos miosinas, una de ellas específica de tripanosomátidos (Berriman et al. 2005); y proteínas de unión a microfilamentos (coronina, EB1) (De Melo et al. 2008), constituyendo así un conjunto de proteínas suficiente para regular las dinámicas de actina. A diferencia de *T. brucei* y *L. major*, *T. cruzi* (incluyendo todas las cepas anotadas hasta el momento) presenta un mayor número de ABPs, ya que además codifica para: 1) una tercer formina que no está presente en *T. brucei* ni en *L. major*; 2) ocho miosinas más de las que se encuentran en *T. brucei* y *L. major*; y 3) las dos subunidades de la proteína de *capping* CapZ, ausentes en los otros dos organismos modelo (Berriman et al. 2005; De Melo et al. 2008; De Souza et al. 2018). En otro estudio bioinformático realizado en el genoma de *T. cruzi* se identificó un total de 12 genes que codificaban para proteínas de la familia de las actinas: cuatro actinas (TcAct1-TcAct4), tres ARPs (TcARP2, TcARP3, TcARP6) y cinco ALPs (TcALP1-TcALP5), de acuerdo con la anotación de la base de datos TriTrypDB (Tabla 1). La actina convencional, las tres ARPs y las cinco ALPs presentaron ortólogos en los genomas de *T. brucei* y *L. major* (que eran los genomas disponibles en la base de datos TriTrypDB en aquel entonces). De manera interesante, las actinas 2 y 3 parecían ser exclusivas de *T. cruzi*, ya que no se encontraron ni en *L.*

*major* ni en *T. brucei*, mientras que la TcAct4 estuvo presente también en *L. major* pero no en *T. brucei* (Cevallos et al. 2011). TcAct1, homóloga de las actinas convencionales, y las ARPs se encuentran conservadas en otros eucariontes, mientras que las actinas restantes (2, 3 y 4) y las ALPs parecen ser específicas de tripanosomátidos.

### **I.5.1. Actina convencional en tripanosomátidos**

En todos los tripanosomátidos estudiados hasta el momento, se ha identificado la presencia de la actina homóloga a la actina convencional (Act1). En general, tiene una identidad de ~70% con la actina- $\beta$  citoplásmica de humano (ActB) (García-Salcedo et al. 2004; Sahasrabudde et al. 2004). Sin embargo, a diferencia de otras actinas eucariontes, la actina de estos organismos no puede unir DNasa I ni es teñida por faloidina marcada fluorescentemente (Mortara 1989; Kapoor et al. 2008), aunque modelos teóricos indican que conserva el plegamiento típico de una actina (De Melo et al. 2008). En cuanto a sus características bioquímicas, se ha demostrado que la actina recombinante de *Leishmania donovani* (rLdAct1) tiene la capacidad de polimerizar *in vitro*, ensamblándose predominantemente en forma de haces en lugar de los microfilamentos clásicos (cuando se observan por microscopía electrónica). Esto sugiere que las interacciones monómero-monómero en los filamentos de rLdAct1 pueden ser diferentes a las de las actinas convencionales (Kapoor et al. 2008). También se ha demostrado que las actinas de tripanosomátidos pueden sufrir modificaciones postraduccionales, ya que en estudios de proteómica se han identificado residuos fosforilados en las actinas 1 de *L. donovani* (LdAct1; Tsigankov et al. 2013) y de *T. brucei* (TbAct1; Nett et al. 2009), así como residuos acetilados en la actina de *T. cruzi* (TcAct1; Moretti et al. 2018).

Tabla 1. Familia de actinas en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. Tabla modificada de Cevallos et al. 2011.

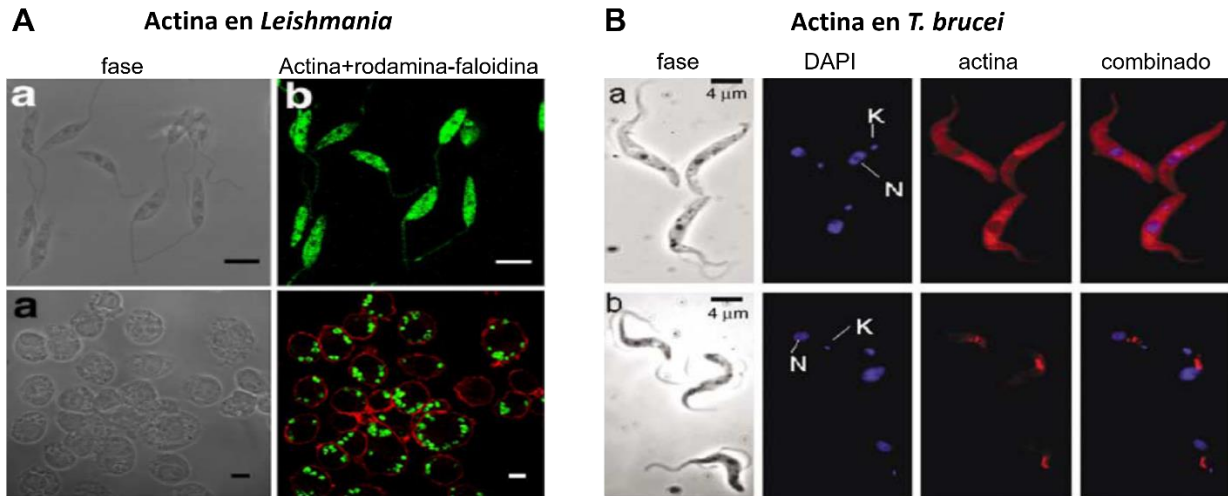
ID de TriTrypDB de <i>T. cruzi</i> (alelo) <sup>a</sup>	Anotación	Identidad (I) Similitud (+)	Ortólogos en <i>T. brucei</i>	Ortólogos en <i>L. major</i>	PM <sup>b</sup>	pI <sup>b</sup>	No. aa
TcCLB.510571.30 (No-E)	Actina 1 (TcAct1) <sup>c</sup>	I = 100% + = 100%	Tb927.9.8850 <sup>d</sup> Tb927.9.8880	LmjF.04.1230	42.0	5.5	376
TcCLB.510127.79 (E, incomp)							341
TcCLB.510571.39 (No-E, frag)							114
TcCLB.510573.10 (No-E, frag)							288
TcCLB.507969.50 (No-E)	Actina 2 (TcAct2)	I = 51% + = 71%	-	-	43.6	4.9	392
TcCLB.507129.10 (E)							392
TcCLB.510945.30 (No-E)	Actina 3 (TcAct3)	I = 39% + = 59%	-	-	42.8	5.3	390
TcCLB.511463.4 (No-E, frag)	Actina 4 (TcAct4)	I = 32% + = 48%	-	LmjF.35.0790	45.9	6.7	154
TcCLB.503841.40 (E)							426
TcCLB.506445.10 (No-E, frag)	Proteína tipo actina-1 (ALP1)	I = 30% + = 47%	Tb927.9.5440	LmjF.15.1330	46.7	6.0	314
TcCLB.508277.330 (E)							422
TcCLB.508257.50 (No-E)	Proteína tipo actina 2 (ALP2)	I = 22% + = 42%	Tb927.4.980	LmjF.34.3760	41.1	5.4	372
TcCLB.506405.30 (E)							372
TcCLB.511857.50 (No-E)	Proteína tipo actina 3 (ALP3)	I = 33% + = 52%	Tb927.11.3880	LmjF.13.0950	47.5	5.5	428
TcCLB.506733.50 (E)							428
TcCLB.509747.70 (No-E)	Proteína tipo actina 4 (ALP4)	I = 34% + = 53%	Tb927.11.10110	LmjF.36.3310	42.1	5.6	381
TcCLB.510719.110 (E)							381
TcCLB.508153.600 (No-E)	Proteína tipo actina 5 (ALP5)	I = 26% + = 41%	Tb927.3.3020	LmjF.29.2740	35.3	6.0	327
TcCLB.506695.10 (E)							327
TcCLB.508899.110 (No-E)	Proteína relacionada a actina 2 (ARP2)	I = 36% + = 57%	Tb927.10.15800	LmjF.19.1200	45.2	6.2	403
TcCLB.511361.40 (E)							403
TcCLB.503913.20 (No-E)	Proteína relacionada a actina 3 (ARP3)	I = 34% + = 53%	Tb927.9.5350	LmjF.15.1360	47.5	5.5	416
TcCLB.508277.260 (E)							416
TcCLB.510121.30 (No-E)	Proteína relacionada a actina 6 (ARP6)	I = 22% + = 40%	Tb927.10.2000	LmjF.21.0230	54.9	6.9	500
TcCLB.508951.29 (E)							500

a No-E, alelo No-Esmeraldo; E, alelo Esmeraldo; frag, fragmento de gen; incomp, secuencia incompleta. El genoma analizado fue el de la cepa CL Brener, una cepa híbrida del DTU TcVI (Zingales et al. 2012); su genoma diploide está formado por los haplotipos Esmeraldo (E) y no-Esmeraldo (No-E). Por tanto, por cada proteína hay al menos dos genes anotados en el genoma. Se actualizó la nomenclatura de los ID de los genes.

b PM (peso molecular en kDa) y pI (punto isoeléctrico) son valores teóricos obtenidos de la secuencia de aminoácidos deducida de los genes anotados.

c existen tres copias del gen que codifican para proteínas idénticas de TcAct1; dos copias están en un alelo (una de ellas anotada como dos fragmentos, frag) y una copia en el otro alelo (Cevallos et al. 2003).

d *T. brucei* tiene dos copias del gen de actina 1, que codifican para dos proteínas idénticas anotadas como actina A y actina B.

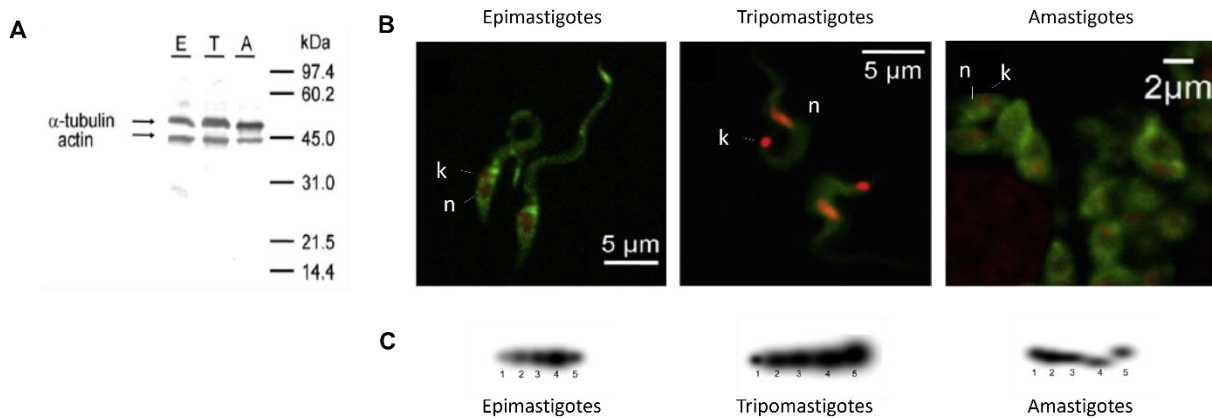


**Figura 11. Actinas en tripanosomátidos.** A) Distribución subcelular de actina en promastigotes (paneles superiores) y amastigotes intracelulares infectando macrófagos J774A.1 (paneles inferiores) de *L. donovani*. En verde, la actina del parásito, teñida con anticuerpos anti-LdAct1; en rojo, rodamina-faloidina, que sólo tiñe la actina del hospedero. B) Distribución subcelular de actina en formas procíclicas (paneles superiores) y sanguíneas (paneles inferiores) de *T. brucei*. En rojo, la actina del parásito; en azul, los ácidos nucleicos (N, núcleo; K, cinetoplasto). Micrografías tomadas de García-Salcedo et al. 2004; Sahasrabudhe et al. 2004.

Por técnicas de inmunodetección usando un anticuerpo homólogo contra la versión recombinante de TcAct1 se demostró que la actina se encuentra presente en forma difusa en todo el citoplasma de diferentes tripanosomátidos (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *Angomonas deanei*, *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Strigomonas culicis* y *Phytomonas serpens*) (Souza et al. 2013). Además, otros autores han reportado concentraciones específicas en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. En promastigotes y amastigotes de *Leishmania*, la actina se encuentra principalmente en forma de gránulos y parches en el bolsillo flagelar, flagelo, asociada a diferentes membranas del parásito (nuclear, vacuolar y citoplásmica) así como en el cinetoplasto y el núcleo, donde parece colocalizar con el DNA (Sahasrabudhe et al. 2004) (Figura 11A). En las formas procíclicas de *T. brucei*, la Act1 se encuentra distribuida homogéneamente a lo largo del cuerpo celular, pero en las formas sanguíneas se encuentra concentrada en el bolsillo flagelar, lugar por donde se lleva a cabo la endocitosis en estos organismos (García-Salcedo et al. 2004) (Figura 11B).

En *T. cruzi*, la actina se expresa en los estadios principales del parásito (Figura 12A), pero su distribución subcelular varía durante su desarrollo (Cevallos et al. 2011). Usando un anticuerpo policlonal obtenido en nuestro laboratorio se observó que en epimastigotes, la actina convencional (TcAct1) se localiza principalmente en la base del flagelo y como parches a lo largo del mismo; en tripomastigotes, se observa dispersa por el citoplasma; y en amastigotes, la

distribución es heterogénea con concentraciones mayores cerca de la superficie del parásito (Figura 12B). Adicionalmente, mediante ensayos de inmunodetección en geles de dos dimensiones (2D), se identificaron al menos cinco isovariantes de actina en cada estadio del parásito (Figura 12C).



**Figura 12. Expresión de la actina convencional en *T. cruzi*.** A) La actina convencional de *T. cruzi* se expresa en cantidades similares en los diferentes estadios de *T. cruzi*, en ensayos de inmunodetección con un suero policlonal anti-TcAct1. B) La distribución subcelular de esta actina (verde) es diferente dependiendo del estadio del parásito. Los ácidos nucleicos se muestran en rojo (n, núcleo; k, cinetoplasto). C) Se muestran las cinco isovariantes de actina detectadas con nuestro anticuerpo en ensayos 2D. Modificado de Cevallos et al. 2011.

En cuanto a la función de actina en tripanosomátidos, se ha determinado que TbAct1 participa en endocitosis y tráfico vesicular (como las actinas convencionales), y que resulta ser esencial para la sobrevivencia de las formas sanguíneas de *T. brucei*, pero no para las formas procíclicas (García-Salcedo et al. 2004). Aunque no se ha observado su participación en otras funciones que típicamente involucran actina, como movilidad celular o citocinesis, se ha descrito una propiedad poco usual para LdAct1. En ensayos *in vitro* se demostró que LdAct1 se une al kDNA y lo relaja, lo que sugiere que participa en el remodelamiento del cinetoplasto durante la división celular (Kapoor et al. 2010).

### I.5.2. Actinas no convencionales en tripanosomátidos

Como se observa en la Tabla 1, se han identificado hasta ocho genes que codifican para proteínas de la familia de las actinas (Act2-Act4 y ALP1-ALP5), que no se agruparon con la actina



convencional cuando se realizaron estudios filogenéticos (Cevallos et al. 2011). La información sobre estas proteínas aún es escasa. Se sabe que ALP1, ALP3 y ALP4, junto con la actina convencional, forman parte del proteoma flagelar en *T. brucei* y *L. mexicana* (Broadhead et al. 2006; Beneke et al. 2019), pero solamente ALP3 ha sido más estudiada. Mediante ensayos de sobreexpresión de TbALP3 unida a una etiqueta, se demostró que su distribución es citoplásmica y flagelar en *T. brucei* (Ersfeld y Gull 2001), mientras que el uso de anticuerpos contra LdALP3 mostró que se encontraba en la mitocondria y el flagelo de *L. donovani* (Singh et al. 2014). Esta distribución distintiva entre TbALP3 y LdALP3 posiblemente se debe a que existen diferencias en secuencia y tamaño entre las dos proteínas.

Hasta el momento, no se han realizado estudios en ninguna otra de las actinas no convencionales de tripanosomátidos. Sin embargo, es muy probable que también exista una diversificación funcional para otras ALPs, no sólo entre diferentes especies sino dentro del mismo organismo. Particularmente de interés, es el estudio de las actinas 2 y 3, las cuales se encuentran ausentes en *T. brucei* y *L. major*.

## II. JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo de trabajo se interesa en estudiar el sistema de actina de *T. cruzi*. El estudio de la expresión y localización intracelular de las actinas en los diferentes estadios de *T. cruzi* es el paso inicial en la caracterización funcional del sistema de actina en estos organismos. Existe evidencia que sugiere que el sistema de actina en *T. cruzi* es más complejo que el de *T. brucei* o *Leishmania* spp. Por ejemplo, *T. cruzi* posee un mayor número de proteínas de unión a actina, incluyendo miosinas, forminas y las dos subunidades de la proteína de *capping* CapZ (CapZ $\alpha$  y CapZ $\beta$ ). En un estudio bioinformático realizado en el laboratorio (Cevallos et al. 2011), encontramos que también tiene un mayor número de genes anotados como actinas o pertenecientes a la familia de actina, de los que destacan: TcAct2 y TcAct3, que no fueron identificados en *T. brucei* ni en *L. major*, y TcAct4, que está presente en *L. major* pero no en *T. brucei*. En el laboratorio generamos un suero policlonal contra la proteína recombinante de TcAct1 con el que analizamos su distribución subcelular en cada estadio. En ensayos en geles 2D se demostró que este anticuerpo reconoce al menos 5 isovariantes de actina en cada estadio del parásito, no pudiendo deslindar si estas variantes son dependientes de reactividad cruzada con otras actinas y/o modificaciones postraduccionales de la actina convencional (Cevallos et al. 2011). En continuación con ese trabajo, resulta de interés estudiar aquellas actinas de *T. cruzi* que no están presentes en los organismos modelo, ya que podrían tratarse de variantes de actina específicas de esta especie y, por tanto, podrían estar desempeñando funciones novedosas en este parásito. Conocer cuáles son las proteínas que interactúan con estas actinas puede dar indicios de su función. Además, la búsqueda de ortólogos de las actinas de *T. cruzi* con otras especies de tripanosomátidos es necesaria, ya que el número de genomas anotados se ha incrementado desde el análisis bioinformático inicial. Decidimos iniciar con la caracterización celular de TcAct2, la cual resulta interesante por su aparente cualidad de ser específica de este parásito. Además, presenta el porcentaje de identidad/similitud más cercano a la actina convencional de *T. cruzi*, por lo que es el mejor candidato para descartar o confirmar si se trata de una de las especies de actina identificadas previamente por geles 2D.

### III. OBJETIVOS

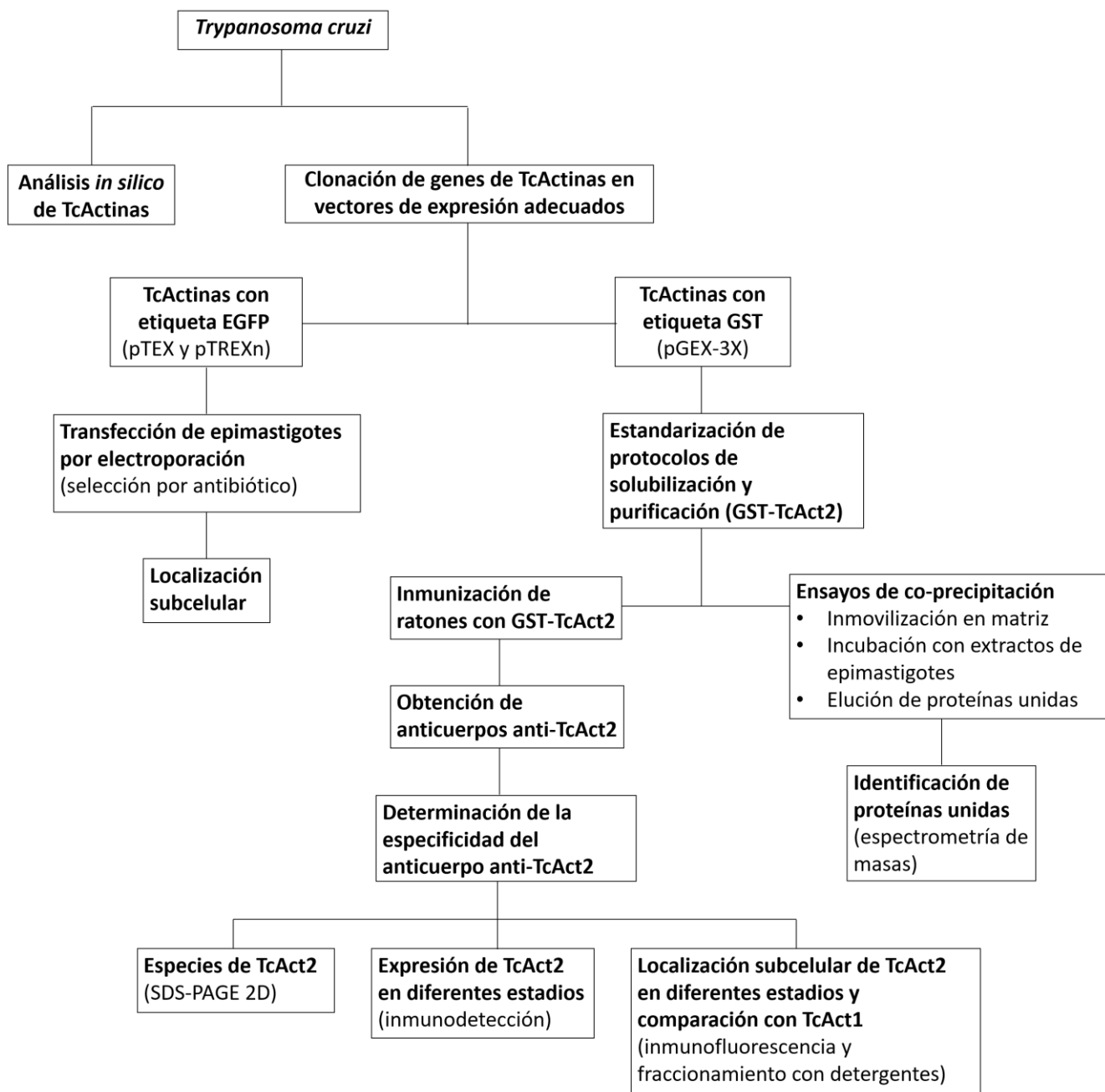
#### III.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la expresión celular de la actina 2 (TcAct2), una actina divergente de *T. cruzi*.

#### III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si TcAct2 es específica de especie, por análisis bioinformático.
- Analizar *in silico* los modelos estructurales de TcAct2 y compararlas con las otras proteínas anotadas como actinas (actinas 1, 3 y 4) de *T. cruzi*.
- Demostrar la expresión de TcAct2 a nivel de RNA mensajero en epimastigotes de *T. cruzi*.
- Demostrar la expresión a nivel de proteína de TcAct2 en los diferentes estadios de *T. cruzi*.
- Evaluar la distribución subcelular de esta actina en los diferentes estadios de *T. cruzi*.
- Identificar proteínas de unión a TcAct2.

## IV. DIAGRAMA DE FLUJO



## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### V.1. ANÁLISIS *IN SILICO*

Para identificar ortólogos de las cuatro actinas en otros tripanosomátidos, se usaron los números de identificación de las actinas de *T. cruzi* (ver Tabla 5 en el Apéndice 1) para realizar una búsqueda bioinformática usando la función de ortología en la base de datos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org>). Los resultados se confirmaron realizando un nuevo blast usando los posibles ortólogos encontrados en los demás genomas de tripanosomátidos contra el genoma de *T. cruzi*. (mejor BlastP recíproco). Se descartaron aquellas secuencias que parecían estar incompletas. Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiple con Clustal Omega (Sievers et al. 2011; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para verificar la relación de ortología entre estas secuencias, se construyó un árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining usando el programa MEGA7 (Kumar et al. 2016), con un bootstrap de 1,000 replicados y computando las distancias evolutivas por el método de distancia-p. El análisis incluyó un total de 49 secuencias de aminoácidos (Tabla 5 en el Apéndice 1). Se seleccionó la opción “pairwise deletion” para el tratamiento de los datos, por lo que todas las posiciones ambiguas fueron removidas de cada par de secuencias. Hubo un total de 599 posiciones en el conjunto de datos final.

El porcentaje de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos deducidas de las actinas de *T. cruzi* se calculó utilizando la herramienta Ident and Sim ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)). Se generaron modelos 3D de las proteínas TcAct1-TcAct4 usando el servidor de I-TASSER (Yang et al. 2015). La visualización y edición de las estructuras se realizó con el programa Chimera (Pettersen et al. 2004). El carácter hidrofóbico del asa hidrofóbica en ActB, TcAct1, TcAct2, TcAct3 y TcAct4 se determinó usando el índice GRAVY (*grand average of hydropathicity*; <http://www.gravy-calculator.de/>). Este índice corresponde a la suma de los valores hidropáticos de cada aminoácido, dividido entre el número de residuos en la secuencia; valores menores que cero indican carácter hidrofílico, y mayores que cero indican carácter hidrofóbico (Kyte y Doolittle 1982).

Para explorar la posibilidad de unión de ATP de las actinas de *T. cruzi*, se comparó la conservación de los aminoácidos del dominio de unión a nucleótidos (D13, S16, G17, L18, K20, Q139, D156, D159, G160, V161, K215, E216, G304, T305, M307, Y308, K338), descritos previamente para actina de mamíferos (Kabsch et al. 1990). De igual forma, se comparó la

conservación de los aminoácidos que conforman la hendidura hidrofóbica (Y143, A144, G146, T148, G168, I341, I345, L346, L349, T351, M355; Dominguez 2004). Los aminoácidos conservados se identificaron y colorearon en las secuencias y estructuras terciarias teóricas de las actinas de *T. cruzi*.

## V.2. PARÁSITOS

Se utilizaron epimastigotes de la cepa CL Brener de *T. cruzi* (TINF/BR/1963/CL Brener) que se mantuvieron a 28°C en medio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, hemina 25 mg/L y antibióticos (penicilina 60 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL). Para todos los ensayos se utilizaron epimastigotes en crecimiento exponencial. La fase exponencial de crecimiento se definió cuando una densidad celular de 10-20 × 10<sup>6</sup> epimastigotes/mL después de 3-4 días de crecimiento, partiendo de un inóculo de 1-2 × 10<sup>6</sup> epimastigotes/mL (confirmando que se logra un tiempo de duplicación máximo de aproximadamente 24 horas).

Los estadios de amastigotes y tripomastigotes se obtuvieron por la infección de células HFF-1 (fibroblastos de prepucio humano), en el laboratorio de la Dra. Rebeca Manning, del CINVESTAV como se describió previamente (Cevallos et al. 2011). Estas infecciones se llevaron a cabo por la Q.F.B. Claudia Márquez y la Dra. Margarita Rubio. Brevemente, los fibroblastos al 50% de confluencia se infectaron con 2 × 10<sup>6</sup> epimastigotes/mL resuspendidos en medio DMEM con alto contenido de glucosa suplementado con SFB al 2%, en una relación parásito:hospedero 10:1. Las monocapas de fibroblastos se lavaron cada dos días con medio DMEM con alto contenido de glucosa para remover los parásitos no adherentes, adicionando después medio fresco suplementado con SFB 2%. Se aislaron los tripomastigotes y amastigotes derivados de estas infecciones del sobrenadante de las células HFF-1. Los amastigotes se separaron de los tripomastigotes usando el anticuerpo 2C2B6, un anticuerpo específico para el antígeno de superficie Ssp-4 de los amastigotes. De esta forma se obtienen preparaciones de amastigotes y tripomastigotes con al menos 95% de pureza.

Los tripomastigotes metacíclicos usados para los ensayos de inmunofluorescencia se obtuvieron de cultivos de epimastigotes envejecidos, es decir, cultivos de 15 días o más de crecimiento, en los que ya no se observa duplicación celular. Para los ensayos de inducción de metacicloogénesis en parásitos transfectantes y silvestres se siguió el siguiente protocolo, basado en Figueiredo y col. (2000) y Nogueira y col. (2015). Brevemente, 100 × 10<sup>6</sup> parásitos en fase

logarítmica tardía (cultivo de epimastigotes de siete días) se cosecharon a  $1000 \times g$ , 10 min, y se lavaron una vez con PBS. Los parásitos se resuspendieron en 1 mL de medio TAU (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, tampón de fosfatos 8 mM pH 6.0) adicionado con glutatión (GSH) 30  $\mu$ M durante 2 h a 28°C. Se ha visto que la presencia de antioxidantes, como el GSH, favorece la metacicloogénesis (Nogueira et al. 2015). Los parásitos se diluyeron a una concentración final de  $5 \times 10^6$  parásitos/mL en medio TAU3AAG (medio TAU suplementado con L-prolina 10 mM, L-glutámico 50 mM, L-aspartico 2 mM, glucosa 10 mM, bicarbonato de sodio 0.035%, SFB 2% y penicilina 60  $\mu$ g/mL, estreptomina 100  $\mu$ g/mL) con GSH 30  $\mu$ M y se incubaron a 28°C durante cinco días. Después de este tiempo, se cosecharon los parásitos por centrifugación y se tiñeron con HEMA3 para su análisis por microscopía de luz. Sólo se contaron aquellos parásitos que completaron el proceso de metacicloogénesis.

### **V.3. DETECCIÓN DE mRNA DE LOS GENES DE ACTINA DE *T. cruzi***

Para determinar si los genes de actina en estudio se expresaban a nivel de mRNA se realizaron PCRs anidados, usando una biblioteca de cDNA como molde. Esta biblioteca fue construida en el vector  $\lambda$ -ZAPII a partir de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, y fue donada amablemente por el Dr. John Donelson de la Universidad de Iowa.

En la primera reacción (PCR1) se utilizó un oligonucleótido que se ancla en sentido en la secuencia del miniexón, en combinación con diversos oligonucleótidos reversos específicos para cada gen (Apéndice 2, Tabla 6). La PCR1 sirvió como molde para la realización de un PCR anidado usando pares de oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento dentro de las regiones codificadoras de cada actina (Apéndice 2, Tabla 6).

### **V.4. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN**

Para expresar las actinas de *T. cruzi* como proteínas de fusión con EGFP en el extremo amino de las actinas (EGFP-TcActinas), las regiones codificadoras de TcAct1 (TcCLB.510571.30), TcAct2 (TcCLB.507129.10), TcAct3 (TcCLB.510945.30) y TcAct4 (TcCLB.503841.40) se subclonaron en el vector pTEX (Kelly et al. 1992), un vector de expresión para tripanosomátidos. Para la clonación de los marcos de lectura abiertos de las actinas 3 y 4, se extrajo DNA genómico a partir de epimastigotes en cultivo de *T. cruzi*, el cual se usó como molde en una primera reacción de PCR para amplificar los genes y regiones intergénicas de las actinas en

estudio, usando polimerasas de alta fidelidad (ver Apéndice 2, Tabla 7 y Figura 31). Las regiones correspondientes de TcAct1 y TcAct2 ya habían sido clonadas con anterioridad en trabajos previos del laboratorio. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se secuenciaron. A partir de estos plásmidos, se amplificaron las regiones codificadoras para las actinas, incorporando secuencias de corte para las enzimas *EcoR* I (en el extremo 5') y *Xho* I (en el extremo 3') en los oligonucleótidos correspondientes (Apéndice 2, Tabla 8). En el oligonucleótido directo se incorporó una secuencia codificadora para 10 residuos de alanina, para que funcionara como región espaciadora entre las secuencias de EGFP y las actinas, como propusieron Wetzel y col. (2003). La región codificadora de EGFP se amplificó a partir del vector pRH006 (BCCM/LMBP, Technologiepark-Zwijnaarde, Belgium) y se adicionaron secuencias de corte para las enzimas *BamH* I (en el extremo 5') y *EcoR* I (en el extremo 3') (Apéndice 2, Tabla 8). Todos los productos amplificados se clonaron en pGEM-T Easy y posteriormente se subclonaron simultáneamente para quedar en fase en el plásmido pTEX entre los sitios *BamH* I y *Xho* I. También se hicieron construcciones colocando EGFP en el extremo C-terminal de las actinas TcAct1 y TcAct2. En este caso, las regiones codificadoras correspondientes se clonaron inicialmente en el vector pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) entre los sitios *EcoR* I y *BamH* I (ver oligonucleótidos utilizados en el Apéndice 2, Tabla 9). Las fusiones se liberaron usando las enzimas de restricción *EcoR* I y *Not* I y luego se subclonaron en los mismos sitios del vector pTREXn, un vector de expresión para tripanosomátidos que posee un fuerte promotor transcripcional y un sitio de adición del cap 5' (Vazquez y Levin 1999). Todas las construcciones generadas se verificaron por secuenciación.

Para su expresión como proteínas de fusión con GST en *Escherichia coli* (GST-TcActinas), los marcos de lectura abiertos de las actinas (TcAct1-TcAct4) se clonaron en el vector de expresión pGEX-3X (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). Las regiones codificadoras se amplificaron a partir de las regiones genómicas clonadas en pGEM-T Easy previamente descritas. Se usaron oligonucleótidos que incorporaran secuencias para enzimas de restricción (para *BamH* I en el extremo 5' y para *EcoR* I en el extremo 3'; los oligonucleótidos usados se pueden consultar en el Apéndice 2, Tabla 10); los productos de PCR se clonaron también en el vector pGEM-T Easy (el gen de actina 2 ya había sido previamente clonado en este vector por Jorge David Cadena, un estudiante de servicio social de la carrera de Biología). Posteriormente, se subclonaron en fase en el vector pGEX-3X en los sitios de restricción *BamH* I



y *EcoR* I. La proteína recombinante GST-TcAct1 ya había sido obtenida previamente (Cevallos et al. 2011).

## V.5. TRANSFECCIÓN DE EPIMASTIGOTES

Las construcciones realizadas en el vector pTEX se purificaron utilizando el kit Plasmid DNA Purification (Qiagen, Venlo, Netherlands) y se transfectaron en epimastigotes de la siguiente manera: los parásitos se cosecharon a  $1000 \times g$ , por 10 min a 4°C y se lavaron con medio LIT sin suplementar; se mezclaron  $20 \times 10^6$  epimastigotes con 50 µg del plásmido correspondiente en un volumen final de 350 µL de medio LIT, se incubaron durante 5 min en hielo y se electroporaron a 360 V, 1500 µF, 13 Ω usando el equipo BTX600 Electro Cell Manipulator (BTX, Holliston, MA, USA). Los parásitos electroporados fueron transferidos a frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 10 mL de medio LIT complementado. Después de 48 h se les adicionó el antibiótico de selección G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración final de 300 µg/mL, vigilando su crecimiento durante el transcurso de dos meses.

Las construcciones obtenidas en el vector pTREXn se purificaron utilizando CsCl y se transfectaron con el siguiente protocolo: 100 µg de DNA fueron mezclados con  $3 \times 10^8$  epimastigotes en 350 µl de medio LIT, se incubaron en hielo por 10 min, y se electroporaron con 1 pulso a 300 V, 12 ms en un electroporador BTX ECM 830. Los parásitos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se transfirieron a tubos Falcon estériles de 15 mL con 5 mL de medio LIT complementado. El antibiótico de selección (G418) se adicionó 48 horas después a una concentración final de 500 µg/mL y los cultivos se incubaron durante 15 días. Después de este tiempo, se removió la droga durante dos días y se llevó a cabo una segunda ronda de selección adicionando ahora 300 µg/mL de G418 por cuatro semanas adicionales.

## V.6. SOLUBILIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE GST-TcActinas Y GST

Para la obtención de las proteínas recombinantes de las actinas TcAct1-TcAct4 fusionadas a GST se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos pGEX-3X/TcActina (1, 2, 3 ó 4) y se indujo su expresión con IPTG 1 mM incubando a 37°C durante 1 h (para GST-TcAct2) o 2 h (para GST-TcAct3 y GST-TcAct4). Después de un proceso de estandarización y optimización del protocolo, se encontraron las condiciones adecuadas para la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes. Brevemente, las bacterias se cosecharon

por centrifugación a  $5,000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Los pellets resultantes se resuspendieron en tampón Tris/EDTA (20 mM/1 mM) que contenía  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  de lisozima y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó DTT y sarkosyl (a una concentración final de 7 mM y 0.5%, respectivamente) a esta suspensión bacteriana y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se agregó tampón de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) y Tritón X-100 (Tritón) a una concentración final de  $1\times$  y 1%, respectivamente. Para completar la lisis y disgregar el DNA, las muestras se sonicaron tres veces durante 10 segundos a 30% de amplitud, los lisados se centrifugaron a  $5,000 \times g$  por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recuperó el sobrenadante (proteínas solubles). El sobrenadante se diluyó 5 veces con Tritón 1%/CHAPS 10 mM/NaCl 0.2 M en PBS pH 7.4. Las proteínas recombinantes solubles se filtraron a través de una membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  y se purificaron por cromatografía de afinidad usando columnas GSTrapFF (GE Healthcare Life Sciences) a una velocidad aproximada de  $0.5 \text{ mL}/\text{min}$ . Se lavó la columna con 15 mL de Tritón 1% en PBS y posteriormente con 15 mL de PBS. Las proteínas recombinantes unidas a la matriz se eluyeron con glutatión 1 mM preparado en tampón Tris 100 mM pH8, y se concentraron utilizando dispositivos de ultrafiltración Amicon-Ultra-4 (tamaño de poro 30,000 Da) (Millipore, MSD, Darmstadt, Germany). Finalmente, las proteínas recombinantes enriquecidas se dializaron contra PBS y se cuantificaron por gel.

## **V.7. ANTICUERPOS ANTI-TcAct1, ANTI-TcAct2 Y OTROS**

### **ANTICUERPOS USADOS**

En un estudio previo, se obtuvo un anticuerpo policlonal anti-TcAct1 hecho en conejo (Cevallos et al. 2011). Para este trabajo, se purificó la fracción IgG de este suero usando una columna de Proteína A/Sefarosa 4B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, No. catálogo 101041). El proceso se realizó en el laboratorio del Dr. Mondragón, con ayuda de la Dra. Carmen Gómez. Brevemente, se empacó la matriz en una columna de hechura casera, y se cargó el suero policlonal. Se lavó la columna con PBS, y se eluyeron las proteínas IgG unidas con glicina 0.1 M, pH 2.5. A esta fracción IgG purificada se le agregó Tris-base para neturalizar el pH y posteriormente se dializó con PBS. Se cuantificó y se analizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, teñidos con plata. Para todos los experimentos que lo requirieron en esta tesis, se utilizó este anticuerpo purificado.

Para la producción de los anticuerpos policlonales anti-TcAct2, se inmunizaron ratones BALB/c con 30 µg de GST-TcAct2 purificada, dividida en cuatro dosis. Para la primera dosis, se emulsificaron 10 µg de la proteína recombinante con adyuvante completo de Freund y se administraron intraperitonealmente a los ratones (200 µL por ratón). Después de siete semanas, se administró una segunda dosis de 10 µg, pero emulsificada con adyuvante incompleto de Freund. Dos dosis adicionales de 5 µg cada una se administraron a intervalos de siete y tres semanas. Dos semanas después de la última dosis se obtuvieron los sueros inmunes. Los sueros preinmunes se colectaron 15 días antes de la primera inmunización. El manejo de animales y el protocolo de inmunización fue aprobado por el Comité de Bioética para la Investigación Animal (número de aprobación ID 129).

Debido a que los animales se inmunizaron usando la fusión completa de GST-TcAct2, el suero se preadsorbió con GST mediante ensayos de competencia de péptido para eliminar los anticuerpos anti-GST presentes. Brevemente, se indujo la expresión de proteína GST (como se describió previamente) y se unió a una matriz de glutatión sefarosa (Glutathione Sepharose High Performance; GE Healthcare Life Sciences, No. catálogo 17527901) durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave. Se adicionaron 100 µL de resina-GST con 1 mL del suero anti-TcAct2 diluido 1:4000 en PBS con Tritón 0.05% (PBST). La mezcla resina-GST-anticuerpo se incubó toda la noche a 4°C con rotación suave. Después de la incubación, se sedimentó la matriz a 1000 ×g, por 10 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante (anticuerpo adsorbido). Finalmente, el anticuerpo (libre de anticuerpos anti-GST) se diluyó con PBST con leche 2% a la dilución de uso del ensayo.

Otros anticuerpos primarios usados: anti-GST (1:5,000; Thermo Fisher Scientific, No. catálogo PA1-982-A); anti-EGFP, monoclonal (1:100 para ensayos de inmunofluorescencia y 1:5,000 para ensayos de inmunotransferencia; Clontech, No. catálogo 632569), anti-alfa tubulina, monoclonal (1:50,000; Sigma-Aldrich, No. catálogo T6199), anti-aldolasa de *Plasmodium* (1:4,000; Abcam, Cambridge, UK, No. catálogo ab207494), anti-histona H3 (1:8,000; Abcam, No. catálogo ab 1791). Anticuerpos secundarios utilizados: anti-IgG de ratón hecho en cabra marcado con HRP (1:5,000; Thermo Fisher Scientific, No. catálogo 31430); anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con HRP (1:15,000; Thermo Fisher Scientific, No. catálogo 31460); anti-IgG de ratón Alexa-488 (1:1,000 en inmunotransferencias, 1:400 en inmunofluorescencias; Thermo Fisher Scientific, No. catálogo A21202) y anti-IgG de conejo Alexa-594 (1:2,000 en

inmunotransferencias, 1:400 en inmunofluorescencias; Thermo Fisher Scientific, No. catálogo A21207).

## **V.8. ISOELECTROENFOQUE (IEF) Y ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (2D)**

Para preparar muestras adecuadas para el análisis en 2D, se cosecharon epimastigotes por centrifugación a  $1000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en solución de lisis (Tris-base 60 mM, DTT 100 mM, SDS 2%). La muestra se sonicó tres veces a 30% de amplitud por 15 s en un sonicador MSE Soniprep (MSE [UK] LTD, London, UK) y se cuantificó. Se precipitó el equivalente a 110  $\mu\text{g}$  de proteína con deoxicolato de sodio 0.02% y ácido tricloroacético 10%, y se centrifugó a  $18,000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet de proteína se lavó dos veces con acetona fría y finalmente se solubilizó con 125  $\mu\text{L}$  de tampón de rehidratación (DeStreak Rehydration solution [GE Healthcare Life Sciences, No. catálogo 17-6003-19]), con 1% de anfólitos (tampón IPG pH 4-7, GE Healthcare Life Sciences, No. 17-6000-86), y DTT 0.28 %.

Para el isoelectroenfoque, se cargaron los 125  $\mu\text{L}$  de muestra preparada en tiras secas IPG (Immobiline Drystrip 7 cm, pH lineal 4 a 7; GE Healthcare Life Sciences, No. catálogo 17-6001-10). Las tiras se rehidrataron en forma pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente. Las tiras se cargaron y corrieron en una unidad Ettan IPGphor 3 Unit (GE Healthcare Life Sciences) con un protocolo de rampa de 5 pasos para un total de 7500 V/h y una corriente máxima de 50  $\mu\text{A}$  por tira. Posteriormente, las tiras se equilibraron dos veces en tampón de equilibrio (urea 6 M, Tris-HCL 50 mM, pH 8.8, glicerol 20%, SDS 2%) adicionado con DTT 2% y yodoacetamida 2.5%. Las tiras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 10%, y finalmente se transfirieron a membranas PVDF (EMD Millipore Immobilon-P, Thermo Fisher Scientific). Este procedimiento se llevó a cabo con la asesoría de la Dra. Silvia Ivonne Mora, de la Unidad de Proteómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

## **V.9. FRACCIONAMIENTO CELULAR**

Se llevó a cabo un fraccionamiento celular diferencial usando detergentes basado en los protocolos descritos por Alonso y col. (2014) y Ramsby y Makowski (2011). Brevemente, los epimastigotes se cosecharon a  $1,000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavaron dos veces con PBS frío.

Los parásitos se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción con digitonina por cada  $200 \times 10^6$  epimastigotes (tampón PIPES, EDTA 0.05 mM, con inhibidores de proteasas cOmplete [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany]). Este tampón se suplementó con diferentes concentraciones del detergente (0 mM, 0.04 mM, 0.16 mM, 0.4 mM). Los parásitos se incubaron a 28°C durante 20 min y luego se centrifugaron a  $14,000 \times g$  por 2 min a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes (fracción citosólica) y los pellets insolubles en digitonina se resuspendieron cuidadosamente en 1 mL de tampón de extracción de Tritón, enfriado en hielo (Triton 0.5%, EDTA 9 mM, tampón PIPES, con inhibidores de proteasas cOmplete). Las suspensiones celulares se incubaron por 30 min a 4°C en agitación suave y luego se centrifugaron a  $5,000 \times g$  por 10 min a 4°C. Se colectaron los sobrenadantes (fracción de membranas/organelos), y los pellets insolubles en Tritón (fracción citoesquelética y nuclear) se resuspendieron en 1 mL de tampón de solubilización del citoesqueleto (SDS 5% en PBS). Las diferentes fracciones se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia, cargando cantidades iguales de cada fracción.

## **V.10. ENSAYOS DE INMUNOTRANSFERENCIA**

Para la obtención de lisados totales de parásitos se cosecharon los epimastigotes a  $1000 \times g$ , 10 min, 4°C y, después de lavarlos con PBS, se resuspendieron directamente en tampón Laemmli. El equivalente a  $5 \times 10^6$  parásitos por carril ( $\sim 40 \mu g$  de proteína), se separó en geles de poliacrilamida 10% y se transfirió a membranas PVDF previamente activadas con metanol, durante 1.5 h a 150 mA. Las membranas se bloquearon con leche descremada Svelty 5% durante 2 h a temperatura ambiente, y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario apropiado diluido en PBST con leche 2%. Después, las membranas se lavaron tres veces con PBST durante 5 min cada lavado y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado (anti-IgG-HRP de ratón [1:5,000] o anti-IgG-HRP de conejo [1:15,000], ambos de Thermo Fisher Scientific) diluido en PBST con leche 2%. Las membranas se lavaron nuevamente tres veces con PBST durante 5 min cada lavado y finalmente se incubaron con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) y se revelaron por exposición a película de rayos X (Carestream® Kodak® BioMax XAR film; Sigma-Aldrich, No. catálogo F5763-50EA), con tiempos de exposición de 1-5 min.

Para la detección simultánea de las proteínas TcAct1 y TcAct2, se incubó la membrana transferida (previamente bloqueada con BSA 5% en PBST) con una mezcla de los anticuerpos

anti-TcAct1 (hecho en conejo) y anti-TcAct2 (hecho en ratón) durante toda la noche a 4°C. Después de lavar (como se mencionó arriba), se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con una mezcla de los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón Alexa-488 (1:1,000) y anti-IgG de conejo Alexa-594 (1:2,000) (Thermo Fisher Scientific). Después de lavar nuevamente, se dejó secar la membrana al menos durante 1 h a temperatura ambiente, la señal de fluorescencia se detectó en un aparato Typhoon FLA9500 (GE Healthcare Life Science) y se analizó en ImageJ (ver Apéndice 9 para condiciones usadas en el equipo).

Todas las inmunotransferencias se revelaron por quimioluminiscencia, con excepción de las realizadas para los ensayos de electroforesis en 2D y la detección de TcAct1 y TcAct2 en los ensayos de fraccionamiento con detergentes, que fueron visualizadas en el equipo Typhoon. Los anticuerpos primarios usados como controles se mencionan en la sección V.7.

## **V.11. INMUNOFLUORESCENCIA**

Después de cosechar los parásitos (1,000 ×g, 10 min, 4°C), se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 min a 4°C y se dejaron adherir a portaobjetos silanizados (Sigma-Aldrich). Los parásitos fijados se permeabilizaron con Tritón 0.5% en PBS durante 5 min. Se lavaron las laminillas con PBS y se bloquearon con BSA 2% durante 2 h a temperatura ambiente. Se incubaron con una mezcla de anticuerpos anti-TcAct2 (1:300-1:600) y anti-TcAct1 (1:400-1:800) diluidos en BSA 1% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después de realizar tres lavados con BSA 1% durante 5 min cada uno, las laminillas se incubaron con una mezcla de anti-IgG de ratón Alexa-488 y anti-IgG de conejo Alexa-594 (1:400 cada uno) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar como se describió, las laminillas se contratiñeron con DAPI 5 µg/mL y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia DAKO (Dako, Glostrup, Denmark, No. catálogo S3023). Las laminillas se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 (las imágenes se capturaron con una cámara Olympus) y en un microscopio confocal Nikon A1R+ STORM, con la asesoría del Dr. Miguel Tapia, en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las imágenes se analizaron usando ImageJ. Referirse al Apéndice 9 para ver las condiciones usadas en los microscopios.

## V.12. ENSAYOS DE CO-PRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para la realización de los ensayos de co-precipitación se utilizaron las proteínas recombinantes GST-TcAct1 y GST-TcAct2, y la proteína GST como control. La inducción y solubilización de estas proteínas se llevó a cabo como se describió en la sección V.6. (Solubilización y purificación de GST-TcActinas y GST). Las proteínas recombinantes solubilizadas se incubaron con resina glutatión sefarosa 4B equilibrada con PBS (GE Healthcare Life Sciences) durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente, las resinas se lavaron cinco veces con PBS, y finalmente se resuspendieron en un volumen de PBS con inhibidores de proteasas cOmplete. Para la obtención de los extractos proteicos del parásito, se cosecharon epimastigotes en fase exponencial de crecimiento (a  $1000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ) en cantidad suficiente para obtener 2 mg de extracto soluble proteico por cada proteína recombinante a interactuar. Previamente, habíamos determinado que por cada  $200 \times 10^6$  parásitos obteníamos  $\sim 1$  mg de proteína soluble total. Los parásitos se lavaron con un volumen de PBS frío y se resuspendieron en PBS con inhibidores de proteasas cOmplete. Se añadió Tritón a una concentración final de 1%, para lisar los parásitos, y se incubó durante 15 min en hielo. Se separó el sobrenadante por centrifugación ( $13,000 \times g$ , por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ) y se cuantificó el extracto proteico usando el kit comercial DC Protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Cada proteína recombinante unida a la resina se incubó con  $\sim 2$  mg de proteína soluble del parásito durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación suave. Se sedimentaron las resinas-proteína recombinante por centrifugación ( $500 \times g$ , por 5 min) y se lavaron cinco veces con PBS con inhibidores de proteasas cOmplete. Para recuperar las proteínas unidas, se agregó buffer Laemmli a las resinas, se calentó a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, se centrifugó para sedimentar las resinas y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas unidas se visualizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y tinción con plata (ver Apéndice 10 para descripción de esta tinción).

Para la identificación de las proteínas, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida y se dejaron correr sólo el tiempo necesario para que ingresaran en su totalidad en el gel. El gel se tiñó con azul de Coomassie y se recortó una única banda por muestra, en la que se esperaba que se encontraran todas las proteínas de cada muestra. Estas bandas se mandaron a analizar por espectrometría de masas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química de la UNAM. Ahí recibieron el procesamiento adecuado (ver Apéndice 9)

para ser digeridas con tripsina y analizar los péptidos obtenidos en un equipo de espectrometría de masas en tándem con ionización por electroespray (modelo Synapt G2S; Waters, Milford, MA, USA) acoplado a cromatografía líquida. La identificación de proteínas se llevó a cabo con el programa ProteinLynx Global Server v.2.2 (PLGS; Waters) usando como base de datos las secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de *T. cruzi* (de los haplotipos de CL Brener), que se descargó en formato FASTA de la plataforma TriTrypDB.

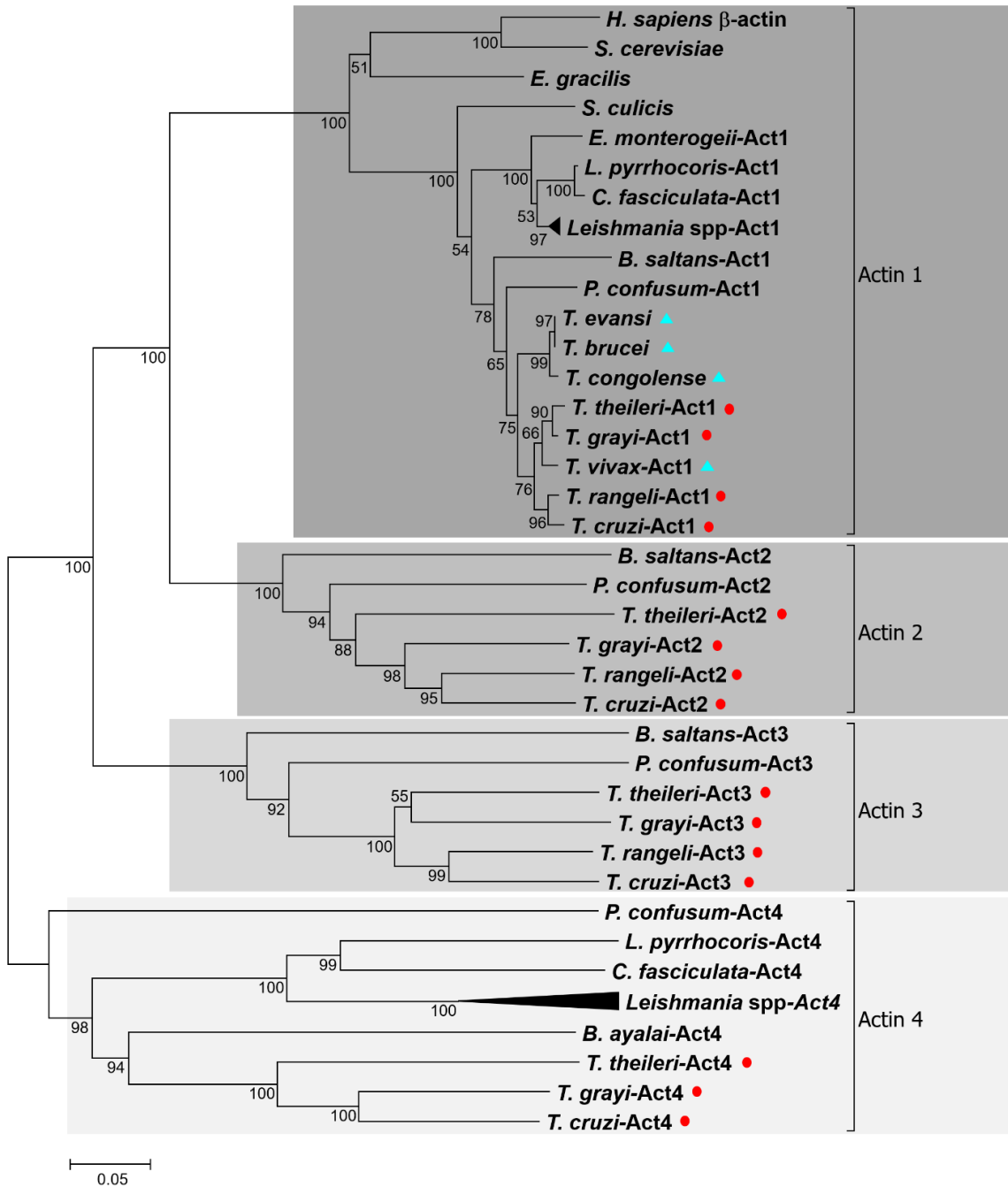


## VI. RESULTADOS

### VI.1. TcAct2, TcAct3 Y TcAct4 NO ESTÁN PRESENTES EN TODOS LOS TRIPANOSOMÁTIDOS.

Cuando se realizó el análisis bioinformático inicial (Cevallos et al. 2011), solamente estaban disponibles los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. En ese estudio se encontraron genes que codificaban para actinas que sólo estaban presentes en el genoma de *T. cruzi* (TcAct2 y TcAct3), sugiriendo que se trataban de actinas específicas de esta especie; también se encontró un gen anotado como actina (TcAct4) que se encontraba en *L. major*, pero que estaba ausente del genoma de *T. brucei*. Actualmente, la base de datos TriTrypDB (versión 46, al 6 de noviembre de 2019) incluye los genomas de 29 especies pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, y el genoma de *Bodo saltans*, el cinetoplástido de vida libre más cercanamente relacionado a los tripanosomátidos. Por tanto, era necesario evaluar si dichas actinas se encontraban también en los demás genomas de tripanosomátidos anotados. Para ello, hicimos una nueva búsqueda de genes ortólogos a las actinas de *T. cruzi* en TriTrypDB. En todas las especies se identificó el ortólogo de TcAct1. Se identificaron genes que codifican para TcAct2 y TcAct3 en los genomas de *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma grayi*, *Trypanosoma rangeli* (considerados del grupo de los tripanosomas estercorearios) y *Paratrypanosoma confusum*, así como en *B. saltans*, pero no se encontraron en ninguna otra especie. En contraste, identificamos ortólogos para TcAct4 en todos los genomas presentes en TriTrypDB con la excepción de *T. brucei*, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma evansi* (que forman parte del grupo de los tripanosomas salivarios). Identificamos un probable ortólogo de TcAct4 en *B. saltans*, pero la secuencia parece estar incompleta (le faltaría la región N-terminal) por lo que su designación como ortólogo de la actina 4 es difícil. No encontramos ortólogos de TcAct2, TcAct3 y TcAct4 en organismos que no pertenecen a la familia Trypanosomatidae, si se realiza un BlastP en GenBank.

Con la finalidad de analizar las relaciones filogenéticas entre estas secuencias de actinas, generamos un árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining. Incluimos secuencias de actinas convencionales de otros organismos como grupos externos (*Euglena gracilis*, *Homo sapiens* ActB y *Saccharomyces cerevisiae*). La lista de secuencias utilizadas se detalla en el Apéndice 1. Aunque se identificaron ortólogos de TcAct1 y TcAct4 en las 15 especies de *Leishmania* presentes en TriTrypDB, para el análisis filogenético sólo se incluyeron siete especies. El árbol resultante agrupó a cada una de las actinas en clados independientes (Figura 13). Los ortólogos de TcAct1



**Figura 13.** Árbol Neighbor-Joining de secuencias de actina pertenecientes a algunos tripanosomátidos. Se incluyeron las secuencias de actinas convencionales de *Euglena gracilis*, *Homo sapiens* ActB y *Saccharomyces cerevisiae* como grupos externos. Los números junto a las ramas corresponden al valor de bootstrap (1000 replicados). A la derecha se indican con corchetes los cuatro grupos obtenidos de este análisis, sombreados en diferentes tonos de gris. Sólo se incluyeron ocho especies de *Leishmania* de las 15 que están presentes en TriTrypDB, y los resultados se comprimieron para facilitar la visualización del árbol. Los tripanosomas estercorarios están identificados con un círculo rojo. Los tripanosomas salivarios están identificados con un triángulo azul.

se agruparon en el mismo clado que el de las actinas convencionales de los grupos externos (Figura 13). El clado de las actinas 2 está más cercano al de las actinas convencionales que los clados de las actinas 3 ó 4, lo que indicaría que las actinas 1 y 2 están más relacionadas evolutivamente. Las secuencias de las actinas del género *Leishmania* son muy parecidas y quedan agrupadas, por lo que es posible comprimirlas en el árbol obtenido para facilitar la visualización.

Este análisis muestra que las actinas 2 y 3 se conservaron únicamente en los tripanosomas estercorearios, así como en *P. confusum* y *B. saltans*, es decir, solamente en seis de los 30 genomas analizados. Por el contrario, las actinas 4 se conservaron en la mayoría de los tripanosomátidos, pero se perdieron en los tripanosomas salivarios. Por tanto, aunque TcAct2 no es una proteína exclusiva de *T. cruzi*, sigue siendo interesante de estudiar al encontrarse restringida al grupo de tripanosomas estercorearios.

## VI.2. ANÁLISIS COMPARATIVO *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS DE ACTINAS DE *T. cruzi*

El presente proyecto se enfocó en el estudio de TcAct2. Sin embargo, consideramos importante incluir un análisis *in silico* para comparar las características estructurales de las cuatro proteínas anotadas como actinas. Con la excepción de TcAct2, en la base de datos del genoma de *T. cruzi* sólo se tiene completa la secuencia de uno de los alelos de cada actina. Por tanto, para el análisis *in silico* solamente se consideraron las secuencias completas (ver Tabla 2). Los genes que codifican para TcAct2 son TcCLB.507129.10 (E) y TcCLB.507969.50 (No-E), con 98.6% de identidad entre ellos (sólo presentan cuatro sustituciones de aminoácidos) (Figura 32 en el Apéndice 3). Para análisis subsecuentes sólo se utilizó la secuencia de TcAct2 (E).

**Tabla 2. Porcentajes de identidad/similitud entre las secuencias de aminoácidos deducidas de las cuatro actinas de *T. cruzi*.**

			TcAct1	TcAct2	TcAct3	TcAct4
TcAct1	TcCLB.510571.30	No-E	100%			
TcAct2	TcCLB.507129.10	E	49/64	100%		
TcAct3	TcCLB.510945.30	E	36/50	34/50	100%	
TcAct4	TcCLB.503841.40	E	31/48	27/44	26/40	100%

Los porcentajes de identidad/similitud entre las cuatro actinas son menores a los que se habían reportado previamente (ver Tabla 1 en la sección Introducción), tal vez por utilizar una herramienta bioinformática diferente para la obtención de los datos. Sin embargo, el patrón de similitud sigue siendo el mismo, es decir, TcAct2 es la más similar a TcAct1, mientras que TcAct4 es la más diferente. Una de las características en secuencia primaria que contribuye a los bajos porcentajes de identidad, es que las actinas 2, 3 y 4 son más largas que TcAct1 (Tabla 3). Al realizar un alineamiento múltiple de estas secuencias, se puede apreciar la ubicación de los aminoácidos extras (resaltados en color verde en la Figura 14) en los extremos amino y/o carboxilo-terminales, o como inserciones en el S2 (en TcAct3) o S4 (TcAct2 y TcAct4). Sin embargo, aunque la secuencia primaria deducida de aminoácidos es poco conservada (la identidad entre TcAct1 y estas actinas es solamente de 31-49%, Tabla 2), hay regiones que presentan un alto grado de conservación con respecto a la actina- $\beta$  humana. Por ejemplo, la mayoría de los residuos involucrados en la unión a ATP/ADP, así como de los residuos que conforman la hendidura hidrofóbica de unión a ABPs, están conservados (Tabla 3 y Figura 14).

**Tabla 3. Características importantes de las actinas de *T. cruzi*, en comparación con la actina- $\beta$  humana (HsActB).** Para los aminoácidos conservados, se consideraron aquellos residuos que fueran idénticos o con propiedades fuertemente similares (identificados con \* y : respectivamente, en los alineamientos realizados con Clustal Omega. Ver Figura 14).

	HsActB	TcAct1	TcAct2	TcAct3	TcAct4
No. aa totales	375	376	392	390	426
No. aa conservados en dominio unión a ATP	17/17	16/17	14/17	11/17	11/17
No. aa conservados en hendidura hidrofóbica	11/11	11/11	10/11	8/11	10/11
Índice de hidrofobicidad del asa hidrofóbica	0.56	0.46	-0.35	0.11	-0.16

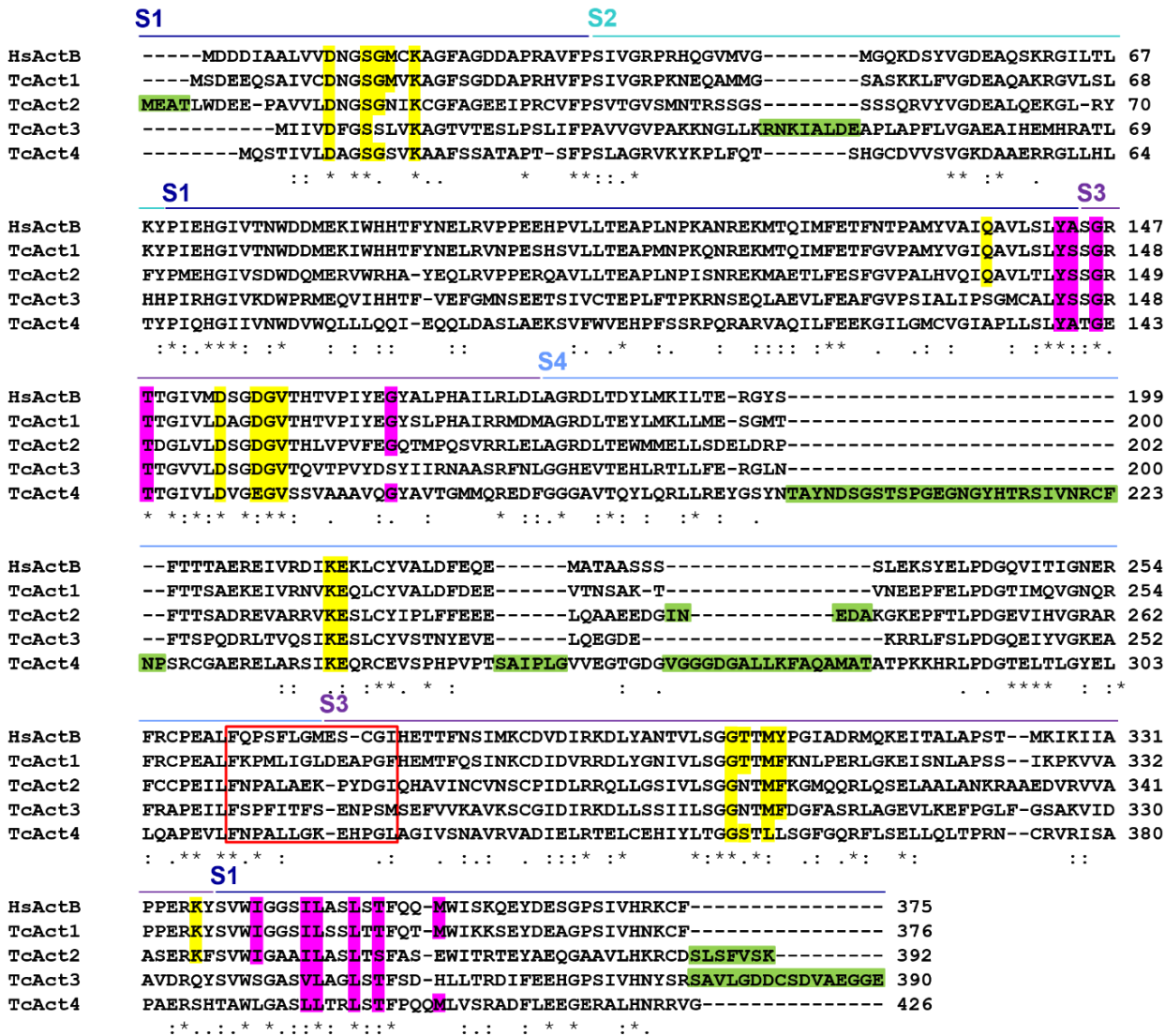
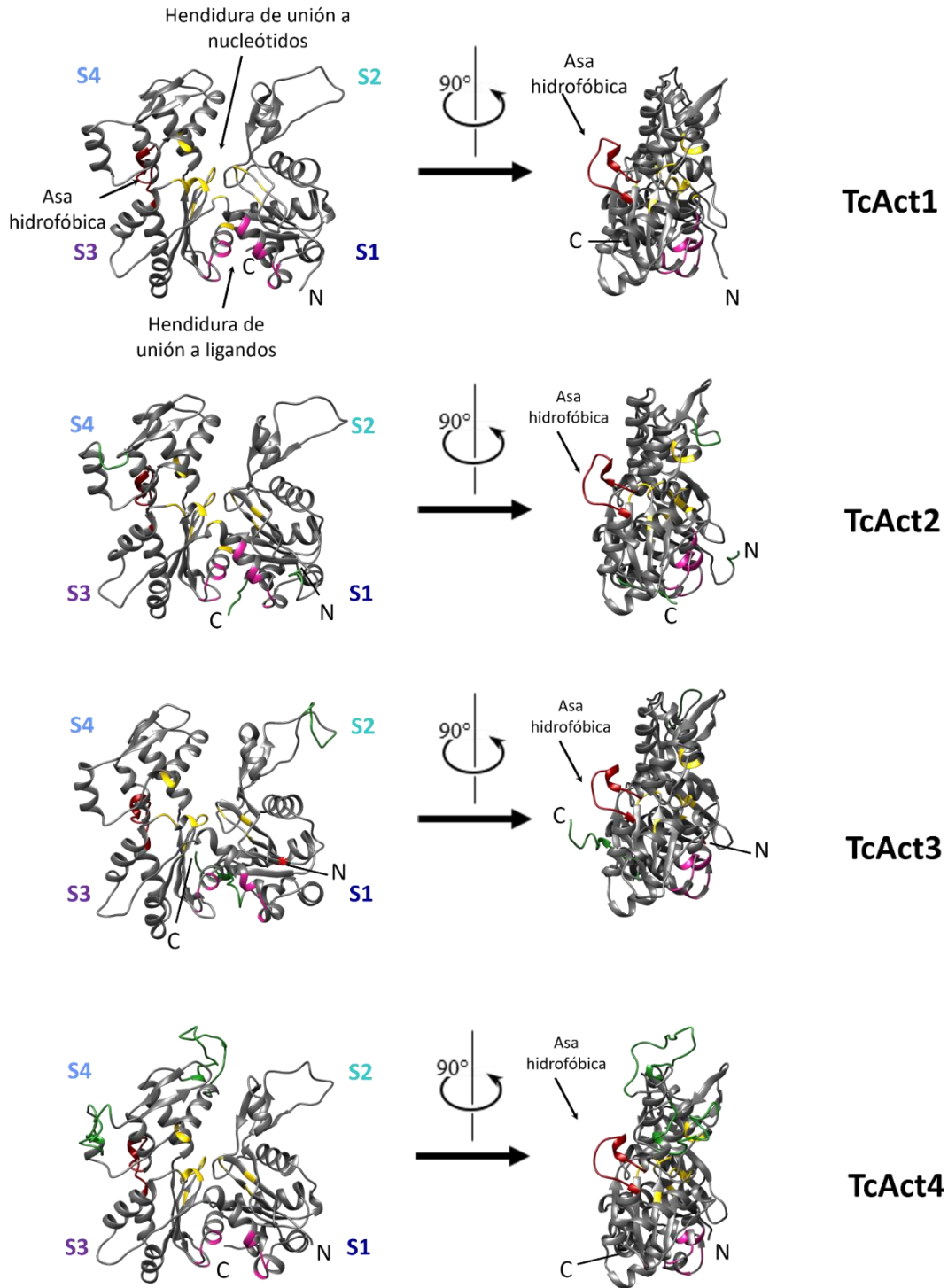


Figura 14. Análisis de las secuencias de las actinas de *T. cruzi*. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las actinas 1-4 de *T. cruzi* con ActB. Las líneas en distintos tonos de azul ubicadas sobre las secuencias delimitan los subdominios (S1 a S4) de las proteínas. Los residuos que conforman el dominio de unión a ATP están resaltados en amarillo. Los residuos que conforman la hendidura hidrofóbica se resaltaron en magenta. Las inserciones se muestran en verde. Los residuos que componen el asa hidrofóbica están delimitados por un recuadro rojo. El significado de los símbolos del consenso es el dado por Clustal Omega (\* residuo conservado; ; residuo con propiedades muy similares; · residuos con propiedades ligeramente similares).



**Figura 15. Modelos teóricos de las estructuras 3D de TcAct1, TcAct2, TcAct3 y TcAct4.** Los modelos se obtuvieron con I-TASSER. Los residuos que conforman el dominio de unión a ATP se muestran en amarillo. Los residuos que conforman la hendidura hidrofóbica están en magenta. Las inserciones se muestran en verde. Los residuos que componen el asa hidrofóbica están en rojo.

Debido a las diferencias en secuencia primaria con respecto a la actina convencional, decidimos analizar la estructura terciaria mediante el modelaje teórico de las proteínas, para ver si conservaban el plegamiento típico (Figura 15). Previamente, ya se había modelado la secuencia de TcAct1, mostrando que su estructura general era similar a la de las actinas eucariontes (De Melo et al. 2008). En el presente trabajo, los resultados del modelaje teórico mostraron que TcAct2, TcAct3 y TcAct4 también conservan el típico plegamiento de una actina, con sus cuatro subdominios (S1-S4). Presentan también la hendidura profunda superior para la unión de nucleótidos (dominio de unión a ATP/ADP) y la hendidura hidrofóbica inferior donde se espera que se unan muchas ABPs. Además, las inserciones en estas actinas no modifican drásticamente el plegamiento de las proteínas. Si observamos las estructuras desde una vista lateral, notamos que en todas ellas se forma también el asa hidrofóbica entre los subdominios 3 y 4 (Figura 15). Sin embargo, a diferencia de lo observado en actinas convencionales, la composición de aminoácidos en TcAct2, TcAct3 y TcAct4 hace que las asas tengan un carácter hidrofílico (Tabla 3).

Debido a que la información sobre estos genes de actina se derivó de un análisis bioinformático, verificamos que se expresaran a nivel de mRNA y no se tratara de pseudogenes. Para ello, se llevaron a cabo reacciones anidadas de PCR a partir de una biblioteca de cDNA de *T. cruzi*. En los tripanosomátidos, el mRNA maduro se genera a partir de procesos de poliadenilación y *trans-splicing* (adición de una secuencia líder o miniexón con cap 5' al extremo 5' de todos los mensajeros) que sufren los transcritos primarios. Para asegurar la amplificación a partir de mensajeros maduros, primero utilizamos oligonucleótidos que se anclaran al miniexón y a cada una de las secuencias de interés (Figura 16). Posteriormente se usaron pares de oligonucleótidos para amplificar fragmentos de cada gen. Todos los oligonucleótidos que se alinean con secuencias codificadoras de las actinas se diseñaron para anclarse en secuencias específicas de cada uno de los genes de las actinas. Como control positivo, realizamos también la amplificación de la actina 1. Los productos de amplificación obtenidos en cada una de estas reacciones demostraron la presencia de mRNA de los genes de actina en estudio en epimastigotes de *T. cruzi* (Figura 16).



**Figura 16. Amplificación de los genes de actina 1, 2, 3 y 4 a partir de una biblioteca de cDNA de *T. cruzi*.** A la izquierda: se muestra un esquema representativo de un RNA mensajero de tripanosomátidos; se indican el miniexón (ME, en azul) con cap 5' (asterisco), las regiones no codificantes (UTR, por sus siglas en inglés) en los extremos 5' y 3' (recuadros grises), la secuencia codificadora de actina (en verde) y la cola de poliAs (representada por una secuencia de cuatro As). Las flechas muestran los sitios aproximados de anclaje de los oligonucleótidos usados en cada reacción. El esquema no está a escala. A la derecha: se muestra un gel de agarosa (1%) con los productos de amplificación (bandas) de los PCRs anidados para cada fragmento de gen: A1 (actina 1)= 590pb; A2 (actina 2)= 562 pb; A3 (actina 3)= 540pb; A4 (actina 4)= 506 pb; control (-), control negativo en el que no se incluyó DNA molde en la reacción. Las bandas de menor tamaño corresponden a los oligonucleótidos no usados durante la reacción.

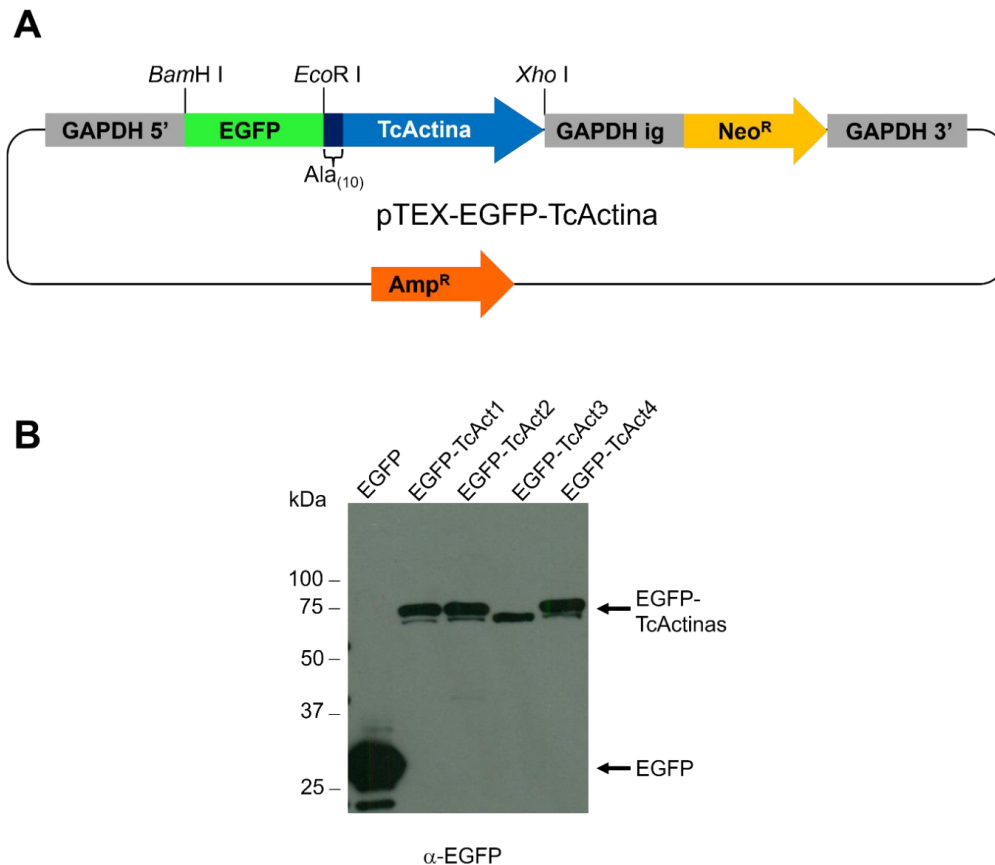
### VI.3. EXPRESIÓN DE TcActinas COMO PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON EGFP

Uno de los objetivos de este trabajo es determinar la localización subcelular de la actina 2 de *T. cruzi*. Una estrategia empleada fue la obtención de epimastigotes transfectantes que expresaban la fusión de esta actina con EGFP en su extremo N-terminal. Para ello, la región codificante de TcAct2 se clonó en pTEX, en fusión con la proteína verde fluorescente, EGFP (Figura 17A). El plásmido pTEX es un vector de expresión para tripanosomátidos que no posee ninguna región promotora; sin embargo, los genes clonados en él pueden expresarse gracias a la capacidad de estos parásitos para realizar transcripción de episomas aún sin promotor (Kelly et al. 1992). Adicionalmente, obtuvimos las construcciones de las demás actinas (TcAct1, TcAct3 y TcAct4) para ver si había una expresión diferencial entre ellas (Figura 17A).

Posterior a la construcción y secuenciación de los plásmidos obtenidos, se transfectaron epimastigotes de *T. cruzi*. La expresión de estas fusiones se evaluó mediante inmunotransferencia



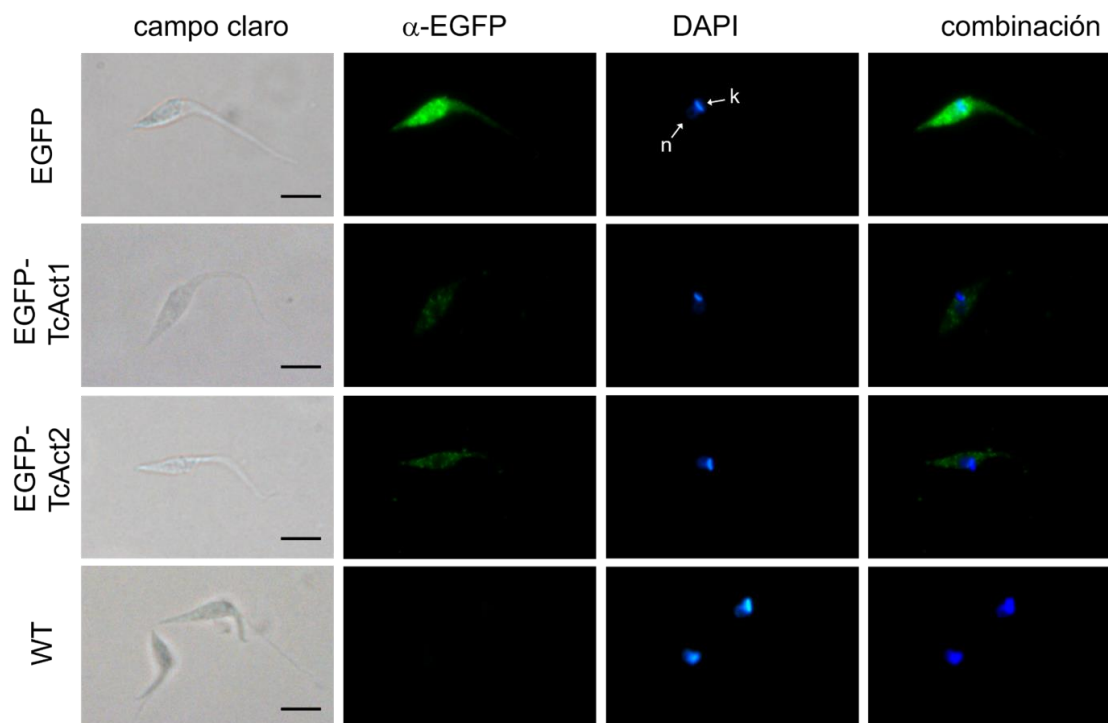
con anticuerpos anti-EGFP (Figura 17B). En todos los parásitos transfectantes se observaron bandas de intensidades similares y dentro del rango del peso molecular esperado (70-74 kDa). Una banda de mayor intensidad y del peso esperado (28 kDa) se detectó en los parásitos que expresaban la proteína EGFP.



**Figura 17. Expresión de EGFP-TcActinas.** A) Representación esquemática de la construcción final utilizada para la expresión de EGFP-TcActinas. Se amplificaron las secuencias codificadoras de EGFP y las actinas en estudio, con los sitios de restricción adecuados, para ser clonados en el vector pTEX (ver la sección Material y métodos). Se muestran sus características principales: genes de resistencia para ampicilina ( $Amp^R$ , para selección en bacterias) y para G418 ( $Neo^R$ , para selección en *T. cruzi*); las secuencias codificadoras de EGFP y TcActina separadas por un brazo de 10 alaninas ( $Ala_{10}$ ); y las secuencias con señales para el procesamiento del mRNA (GAPDH 5', GAPDH intergénica (ig) y GAPDH 3'). B) Inmunotransferencia de epimastigotes transfectantes que expresan las fusiones de cada actina con EGFP en el extremo N-terminal de las actinas, detectados con un anticuerpo comercial anti-EGFP (1:1,000).

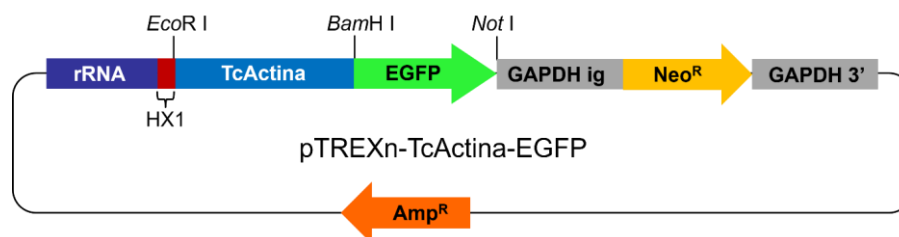
Aunque se demostró que las fusiones de las actinas de *T. cruzi* con EGFP se expresaban en los parásitos, al evaluar a los epimastigotes transfectantes vivos por microscopía de epifluorescencia observamos una señal muy débil y de distribución difusa de las actinas

recombinantes, pero al momento de realizar preparaciones fijas para su análisis, no se observaba marca fluorescente alguna. Por el contrario, como se esperaba, los parásitos control que expresaban solamente EGFP mostraron una fuerte expresión citoplásmica de la proteína. Por lo tanto, para poder observar la localización subcelular de las fusiones de TcAct2 y TcAct1, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos contra la etiqueta (anti-EGFP) (Figura 18; los resultados para las fusiones de EGFP-TcAct3 y EGFP-TcAct4 se muestran en la figura 34 en el Apéndice 4). Detectamos una señal débil (en comparación con la señal de EGFP) y de patrón punteado en todo el cuerpo celular de los parásitos (Figura 18). El patrón de distribución de esta señal fue similar en todos los parásitos transfectantes, incluidos aquellos que expresaban EGFP-TcAct1. Es decir, la localización de la fusión EGFP-TcAct1 no correspondió con la localización de la proteína endógena detectada por anticuerpos, como se había visto previamente (con enriquecimiento de la proteína en la base del flagelo y a lo largo de éste; Cevallos et al. 2011). Por tanto, no podíamos asegurar que la localización de las demás fusiones fuera real.



**Figura 18. Expresión de EGFP-TcActinas en parásitos transfectados.** Ensayos de inmunofluorescencia usando anti-EGFP (1:100) para detectar las proteínas de fusión EGFP-TcAct1 y EGFP-TcAct2. Se usó DAPI para teñir los ácidos nucleicos. WT, cepa silvestre; n, núcleo; k, cinetoplasto. Barra= 5  $\mu$ m.

Se ha reportado que cuando la estrategia de usar proteínas fusionadas por el extremo N-terminal con EGFP es fallida, las construcciones en el extremo C-terminal pueden ser bien toleradas por la célula (Sehring et al. 2010). Decidimos evaluar esta posibilidad clonando las secuencias codificadoras de las actinas de *T. cruzi* TcAct1 y TcAct2 fusionadas por su extremo C-terminal a EGFP. Para incrementar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes, la clonación se hizo en el vector pTREXn. Este vector de expresión posee un promotor transcripcional de RNA pol I (rRNA) y una secuencia para la adición del cap 5' (derivada de la región 5' UTR, denominada HX1, del gen que codifica para una proteína ribosomal de *T. cruzi*), lo que permite clonar regiones codificadoras sin necesidad de que lleven sus propias señales de transcripción (Vazquez y Levin 1999) (Figura 19).



**Figura 19. Representación esquemática de la construcción final utilizada para la expresión de TcActinas-EGFP.** Se amplificaron las secuencias codificadoras de las actinas en estudio, con los sitios de restricción adecuados y se clonaron en el vector pEGFP-N1 entre los sitios *EcoR* I y *BamH* I. La fusión se liberó y se subclonó en el vector pTREXn entre los sitios *EcoR* I y *Not* I. Se muestran sus características principales: genes de resistencia para ampicilina (*Amp*<sup>R</sup>, para selección en bacterias) y para G418 (*Neo*<sup>R</sup>, para selección en *T. cruzi*); las secuencias codificadoras de TcActina y EGFP; promotor ribosomal (rRNA); la secuencia para la adición del cap 5' (HX1) y las secuencias con señales para el procesamiento del mRNA (GAPDH 5', GAPDH intergénica (ig) y GAPDH 3').

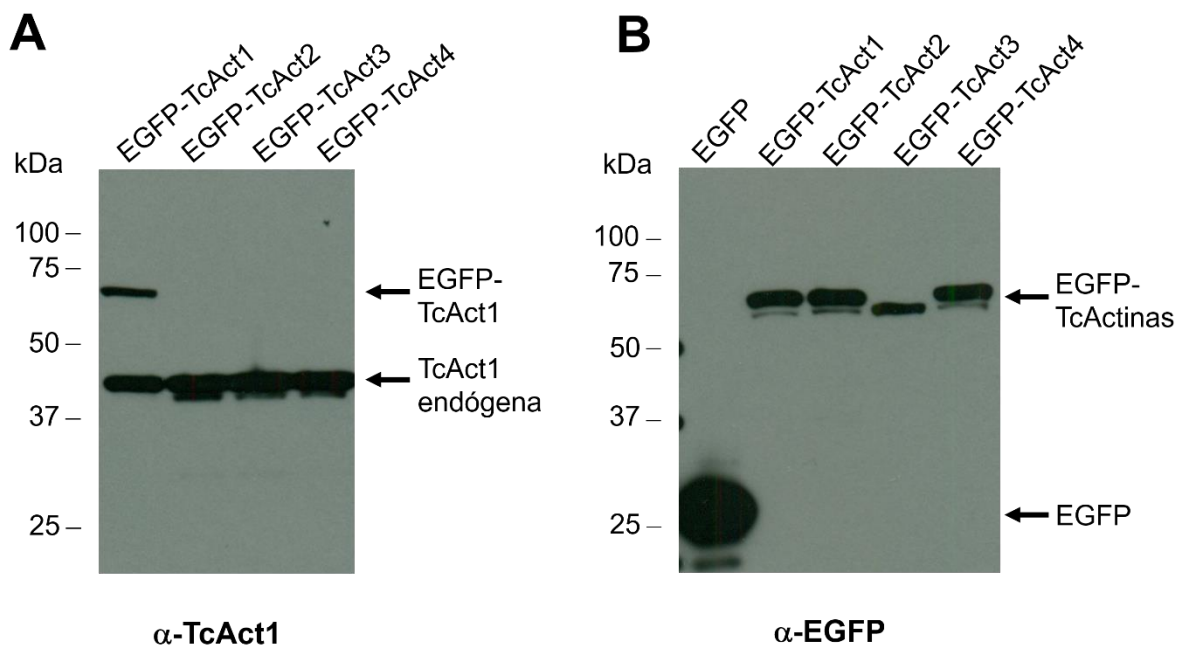
En dos transfecciones independientes con el vector que codificaba para TcAct1-EGFP, observamos parásitos muy brillantes, pero con morfologías redondeadas y aberrantes dentro de los 14 días post-transfección. Estos parásitos fueron incapaces de recuperarse y, eventualmente, murieron, sugiriendo que los parásitos son intolerantes a la sobreexpresión de esta proteína. En cambio, en la transfección con la construcción de la proteína TcAct2-EGFP sí se obtuvieron células viables. En éstas, la proteína mostró una localización en todo el cuerpo celular similar a la observada con el control EGFP, pero con menor intensidad (Figura 35 en el Apéndice 4). Sin embargo, en los ensayos de inmunotransferencia de parásitos estables transfectados con el anticuerpo anti-EGFP se observó la presencia de dos bandas, una del peso esperado para la

proteína de fusión y otra de tamaño similar a EGFP. Debido a las inconsistencias en la localización de estas proteínas observadas con este acercamiento, decidimos cambiar de estrategia y desarrollar un suero policlonal contra TcAct2.

#### **VI.4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TcAct2**

El objetivo principal de este proyecto es estudiar la expresión celular de TcAct2 en *T. cruzi*. Al no obtener resultados concluyentes con el acercamiento experimental de fusiones con EGFP, elegimos usar una estrategia basada en anticuerpos, ya que previamente en el laboratorio se había obtenido exitosamente un suero policlonal en conejo contra la actina convencional de este parásito (anti-TcAct1) (Cevallos et al. 2011). No obstante, aún no habíamos determinado si este anticuerpo mostraba reactividad cruzada con otros miembros de la familia de las actinas codificadas por el genoma de este parásito, siendo TcAct2 el candidato principal a mostrar esta posible reactividad al ser la actina con mayor porcentaje de identidad/similitud con TcAct1. Para evaluar si alguna de las isovariantes detectadas por el anticuerpo anti-TcAct1 se debían a reacción cruzada con las otras actinas del parásito, hicimos ensayos de inmunotransferencia contra lisados de los epimastigotes transfectantes que habíamos obtenido, que expresaban las diferentes fusiones de las actinas de *T. cruzi* con EGFP. En estos ensayos, este anticuerpo detectó una banda del peso molecular teórico para la actina 1 endógena (~42 kDa) en todas las muestras (Figura 20), y sólo detectó a la proteína de fusión EGFP-TcAct1, sin que hubiera reconocimiento de las otras fusiones con EGFP de las actinas 2, 3 y 4. Lo anterior indicaba que este anticuerpo era específico para TcAct1. Asimismo, al no haber reconocimiento cruzado del anticuerpo anti-TcAct1 con las demás actinas fusionadas a EGFP (en particular con TcAct2, que presenta el mayor porcentaje de identidad (49%) con TcAct1), este resultado sugería que las diferencias entre las actinas 1 y 2 serían suficientes para la obtención de anticuerpos específicos contra TcAct2 (ver Apéndice 3 Figura 33).

Para la obtención de un anticuerpo anti-TcAct2, la región codificadora se clonó en el vector de expresión pGEX-3X para expresarla como una proteína fusionada a la etiqueta glutatión S-transferasa, GST (Figura 21). La proteína GST es una etiqueta común usada para expresar y purificar proteínas, que puede incrementar la expresión y solubilidad de la proteína



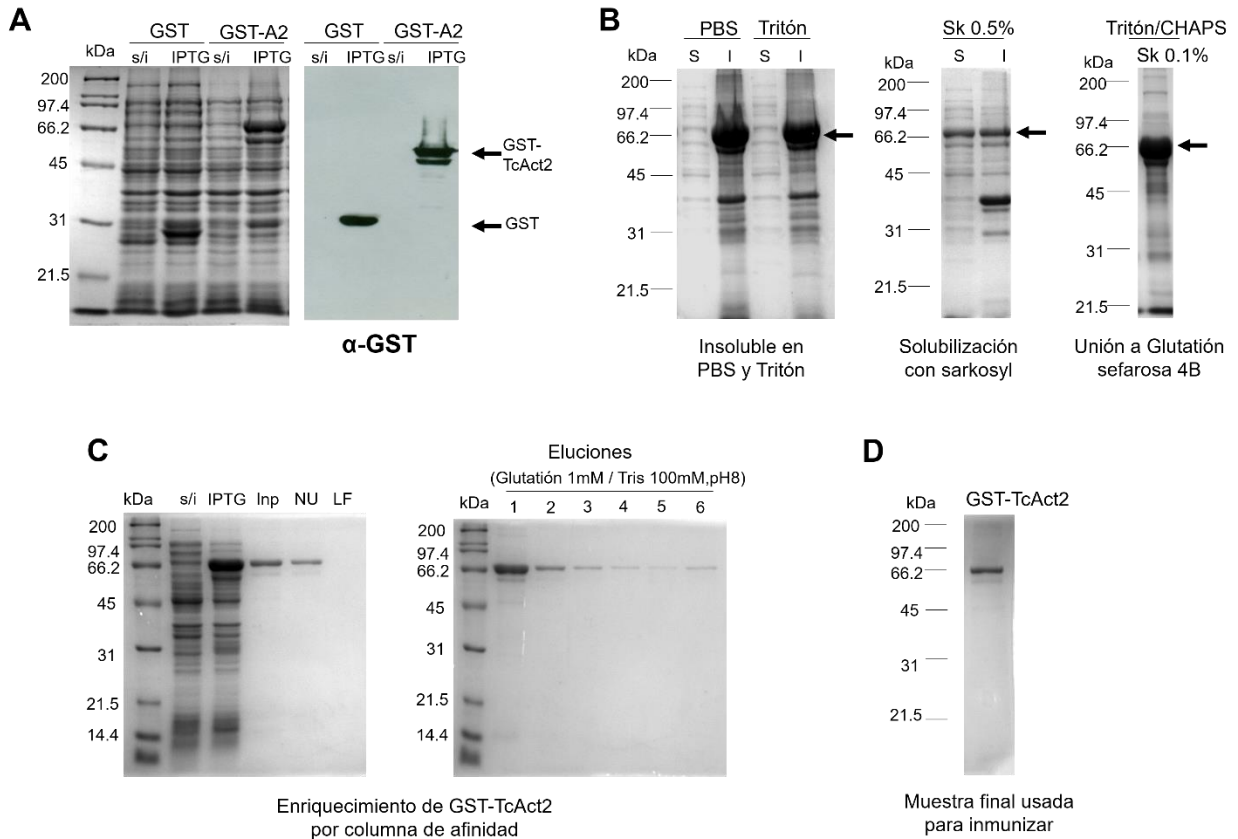
**Figura 20. El anticuerpo anti-TcAct1 no presenta reactividad cruzada con otras EGFP-TcActinas.** A) Ensayo de inmunotransferencia de epimastigotes transfectantes que expresan las diferentes fusiones de actinas con EGFP, detectados con el anticuerpo anti-TcAct1 (1:8,000). B) Inmunotransferencia de epimastigotes transfectantes que expresan las fusiones de cada actina con EGFP en el extremo N-terminal de las actinas, detectados con un anticuerpo comercial anti-EGFP (1:1,000), para demostrar la expresión de las fusiones en los lisados.

expresada (Kimple et al. 2013). Con el plásmido generado, transformamos bacterias *E. coli* e indujimos la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG (Figura 21A). Confirmamos su expresión con el uso de anticuerpos comerciales contra la etiqueta GST. Curiosamente, siempre observamos a las proteínas recombinantes como un doblete en los ensayos de inmunotransferencia. Adicionalmente, también se obtuvieron las proteínas recombinantes de las actinas 3 y 4 fusionadas a GST para usarlas como controles durante la caracterización del suero anti-TcAct2 obtenido (ver Figura 36 en el Apéndice 5).

La proteína recombinante GST-TcAct2 no fue soluble en PBS ni en Tritón (Figura 21B, panel izquierdo), por lo que fue necesario estandarizar los protocolos para su solubilización y purificación por cromatografía de afinidad. Por cuestiones de simplicidad, sólo se mencionará brevemente el proceso y las condiciones finales encontradas. Se ha visto que proteínas que son insolubles en Tritón (detergente recomendado en el proceso de purificación de proteínas recombinantes) son solubles en sarkosyl, como es el caso de GST-TcAct1 (Cevallos et al. 2011).

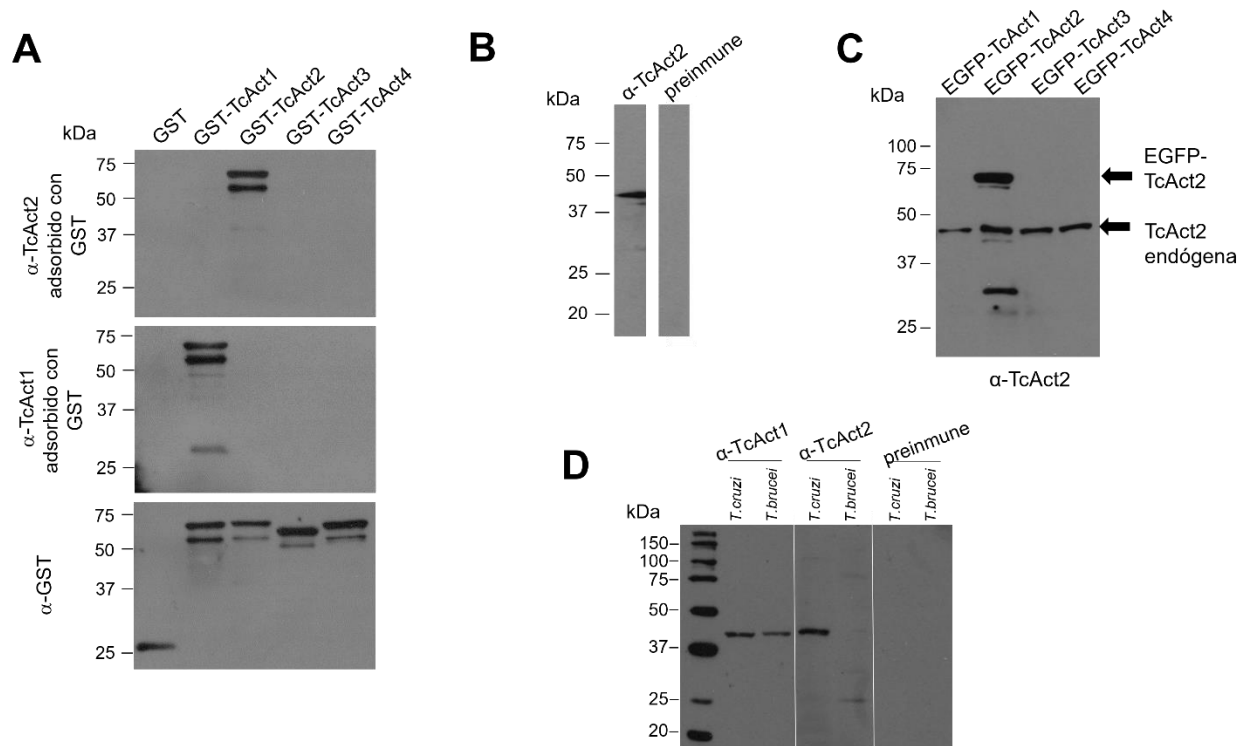
La adición de sarkosyl a una concentración final de 0.5% permitió solubilizar una porción importante de proteínas recombinantes, incrementando la presencia de las proteínas de fusión en la fracción soluble en cantidad suficiente para ser purificada (Figura 21B, panel medio). Sin embargo, la presencia de sarkosyl inhibe la unión de la proteína recombinante a la columna de afinidad. Para evitar este problema se han propuesto diversos protocolos para disminuir la concentración de sarkosyl que incluyen la adición de otros detergentes como Tritón (Frangioni y Neel 1993), o una combinación de Tritón/CHAPS (Tao et al. 2010) para secuestrar el sarkosyl, así como la dilución del lisado bacteriano con Tritón (Park et al. 2011). Encontramos que las mejores condiciones para favorecer la unión de GST-TcAct2 a la resina era diluir el lisado bacteriano con Tritón 1%/CHAPS 10 mM, de forma que la concentración final del sarkosyl quedara en 0.1% (Figura 21B, panel derecho). Finalmente, encontramos que la proteína recombinante podía ser eluída usando glutatión 1 mM en tampón de Tris 100 mM, pH 8, obteniendo una muestra de proteína recombinante enriquecida (Figura 21C). Se realizaron varios ensayos para obtener la cantidad suficiente de GST-TcAct2 para inmunizar ratones y finalmente obtener el suero policlonal correspondiente.

Estudios preliminares demostraron que el suero policlonal obtenido tenía reactividad contra la porción GST de la proteína de fusión. En consecuencia, adsorbimos el suero contra GST y valoramos la especificidad del suero adsorbido. En ensayos de inmunotransferencia con lisados bacterianos que expresaban las diferentes actinas recombinantes, el suero anti-TcAct2 solamente reconoció a la proteína GST-TcAct2, pero no a GST-TcAct1, GST-TcAct3, GST-TcAct4 o GST expresadas en *E. coli* (Figura 22A, panel superior). Como se había mencionado antes, detectamos a las proteínas recombinantes en forma de doblete. Probamos también el anticuerpo anti-TcAct1 preadsorbido con GST con estos lisados bacterianos. De igual forma, el anticuerpo solamente reconoció a GST-TcAct1, pero a ninguna de las demás proteínas recombinantes (Figura 22A, panel medio). Para confirmar que las actinas recombinantes se estaban expresando, incluimos un ensayo usando el anticuerpo anti-GST (Figura 22A, panel inferior). Estos resultados muestran que los anticuerpos contra TcAct2 solamente reconocen a la actina recombinante GST-TcAct2, y que los anticuerpos contra TcAct1 sólo reconocen a GST-TcAct1.



**Figura 21. Expresión y purificación de GST-TcAct2 para la obtención de anticuerpos.** A) Gel de poliácridamida donde se distinguen las proteínas recombinantes tras la inducción con IPTG (izquierda), y la corroboración de su expresión mediante inmunotransferencia, usando el anticuerpo anti-GST (1:5,000; derecha). B) Geles de poliácridamida mostrando la totalidad de GST-TcAct2 en la fracción insoluble (I) en PBS y Tritón (izquierda); al adicionar sarkosyl 0.5% la proteína se distribuye tanto en la fracción soluble (S) como en la insoluble (I) (centro); la dilución de la concentración de sarkosyl a 0.1% tras la adición de Tritón/CHAPS permite la unión de GST-TcAct2 a la resina de glutatión sefarosa 4B (derecha). C) Geles de poliácridamida donde se muestran diferentes etapas del proceso de enriquecimiento de la proteína recombinante GST-TcAct2 mediante columnas de afinidad. Geles representativos de varios ensayos. D) Muestra final, producto de la concentración de varias eluciones, usada para la inmunización de ratones. Todos los geles mostrados fueron teñidos con azul de Coomassie. s/i, lisado bacteriano sin inducir; IPTG, lisado bacteriano inducido con IPTG; S, fracción soluble; I, fracción insoluble; Sk, sarkosyl; Inp, proteína solubilizada que se ingresó a la columna de afinidad (input); NU, fracción no unida a la columna de afinidad; LF, lavado final.

Después, evaluamos si el anticuerpo obtenido podía reconocer a la proteína endógena en los parásitos. Para ello, utilizamos lisados de epimastigotes para los ensayos de inmunotransferencia. El suero anti-TcAct2 reconoció una banda del tamaño esperado (~44 kDa), que no fue detectada por el suero preinmune (Figura 22B), indicando que TcAct2 se expresa en



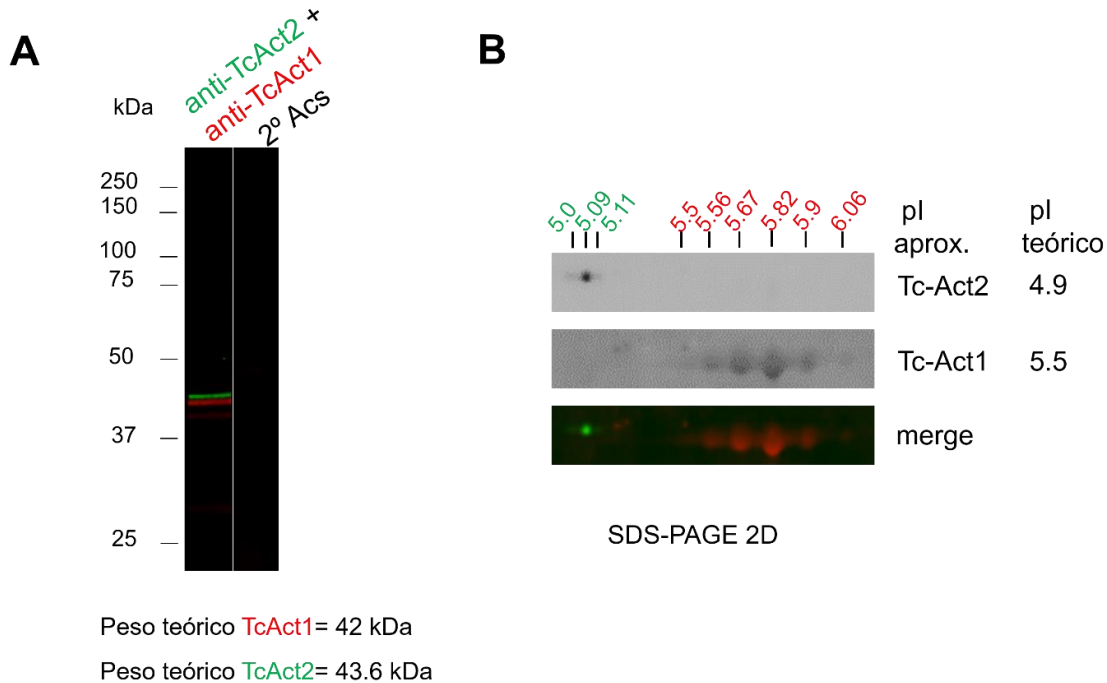
**Figura 22. El anticuerpo anti-TcAct2 detecta específicamente la actina 2 de *T. cruzi* en lisados de parásitos.** A) Inmunotransferencia de actinas recombinantes con la etiqueta GST, expresadas en *E. coli* (lisados bacterianos) incubadas con anti-GST (1:5000) y con los anticuerpos anti-TcAct1 y anti-TcAct2, preadsorbidos con GST (1:20,000). B) Inmunotransferencia de lisado total de epimastigote incubado con el suero anti-TcAct2 y el suero preinmune (1:8,000). C) Inmunotransferencia de epimastigotes transfectantes que expresan las fusiones de cada actina con EGFP, detectados con el anticuerpo anti-TcAct2 (1:8,000). D) Inmunotransferencia de lisados de *T. cruzi* y *T. brucei*, probados con el anticuerpo anti-TcAct1, el suero anti-TcAct2 y el suero preinmune.

epimastigotes de *T. cruzi*. Como los tamaños de las actinas 1 y 2 son muy similares y la especificidad de los anticuerpos es una parte crucial de esta estrategia, evaluamos la posible reactividad cruzada de nuestro anticuerpo utilizando lisados de los parásitos transfectantes que habíamos obtenido. En forma similar a lo que observamos para el anticuerpo anti-TcAct1 (ver figura 20), el suero anti-TcAct2 reconoció una banda del tamaño esperado en todos los lisados de los parásitos transfectantes, que correspondería con la actina 2 endógena de los parásitos. Además, solamente reconoció la fusión EGFP-TcAct2 y otra banda de aproximadamente 30 kDa (posible degradación de la fusión) en el carril de EGFP-TcAct2, sin mostrar reactividad cruzada con alguna de las otras fusiones EGFP-TcActinas (Figura 22C). Probamos también este suero, junto con el anticuerpo contra TcAct1, en lisados de promastigotes de *T. brucei* (Figura 22D). Este



tripanosomátido posee el gen ortólogo para TcAct1 y las cinco TcALPs, pero no codifica para TcAct2, TcAct3 o TcAct4 (ver figura 13 y Cevallos et al 2011). Como esperábamos, el anticuerpo anti-TcAct1 reconoce una banda que correspondería a la actina convencional en ambas especies (cuyas secuencias de aminoácidos tienen un 95% de identidad entre sí), mientras que el suero anti-TcAct2 solamente reconoce una banda clara en el lisado de epimastigotes de *T. cruzi*. Es decir, nuestro suero contra TcAct2 no reconoce ninguna actina en el lisado de *T. brucei*, indicando que no presenta reactividad cruzada con ninguna de las proteínas de la familia de las actinas presentes en ese organismo. En conjunto, estos resultados indican que ambos anticuerpos son específicos.

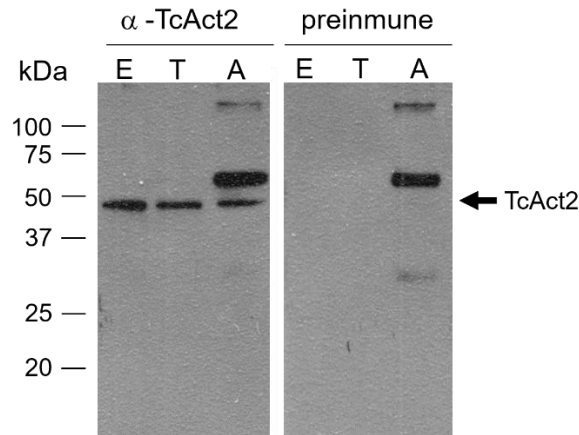
En estudios previos en el laboratorio habíamos visto que el anticuerpo anti-TcAct1 reconocía diversas isovariantes. Para ver si alguna de esas especies de actina correspondía a la actina 2, decidimos ensayar simultáneamente los sueros anti-TcAct1 y anti-TcAct2 con lisados totales de epimastigotes, e identificar su reactividad mediante anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos. Esto fue posible gracias a que los sueros fueron hechos en diferentes especies animales. Primero, hicimos ensayos en una dimensión, en los que detectamos dos bandas de tamaño similar pero discernible: ~43 kDa para anti-TcAct1 y ~44 kDa para anti-TcAct2 (Figura 23A). Cuando se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia en geles 2D, se detectaron al menos 6 isovariantes en lisados de epimastigotes con el anticuerpo anti-TcAct1. Con el suero anti-TcAct2 detectamos tres señales con un pI ácido de aproximadamente 5.0-5.11, el cual es similar al valor teórico de 4.9 estimado de la secuencia deducida de aminoácidos (Figura 23B). Estos resultados corroboran que los anticuerpos reconocen proteínas diferentes.



**Figura 23. Los anticuerpos anti-TcAct1 y anti-TcAct2 detectan diferentes puntos en ensayos 2D.** Inmunotransferencia con marcaje doble de lisados proteicos de epimastigotes con los anticuerpos anti-TcAct1 (rojo; 1:16,000) y anti-TcAct2 (verde; 1:8000) en geles en 1D (A) o 2D (B), usando anticuerpos secundarios acoplados con fluoróforos (anti-IgG de ratón-Alexa 488 y anti-IgG de conejo-Alexa 594). Arriba del punto correspondiente se muestran los valores aproximados de pI de las variantes reconocidas por cada anticuerpo. Las imágenes se obtuvieron en un equipo Typhoon FLA9500.

## VI.5. TcAct2 SE EXPRESA EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE *T. cruzi*

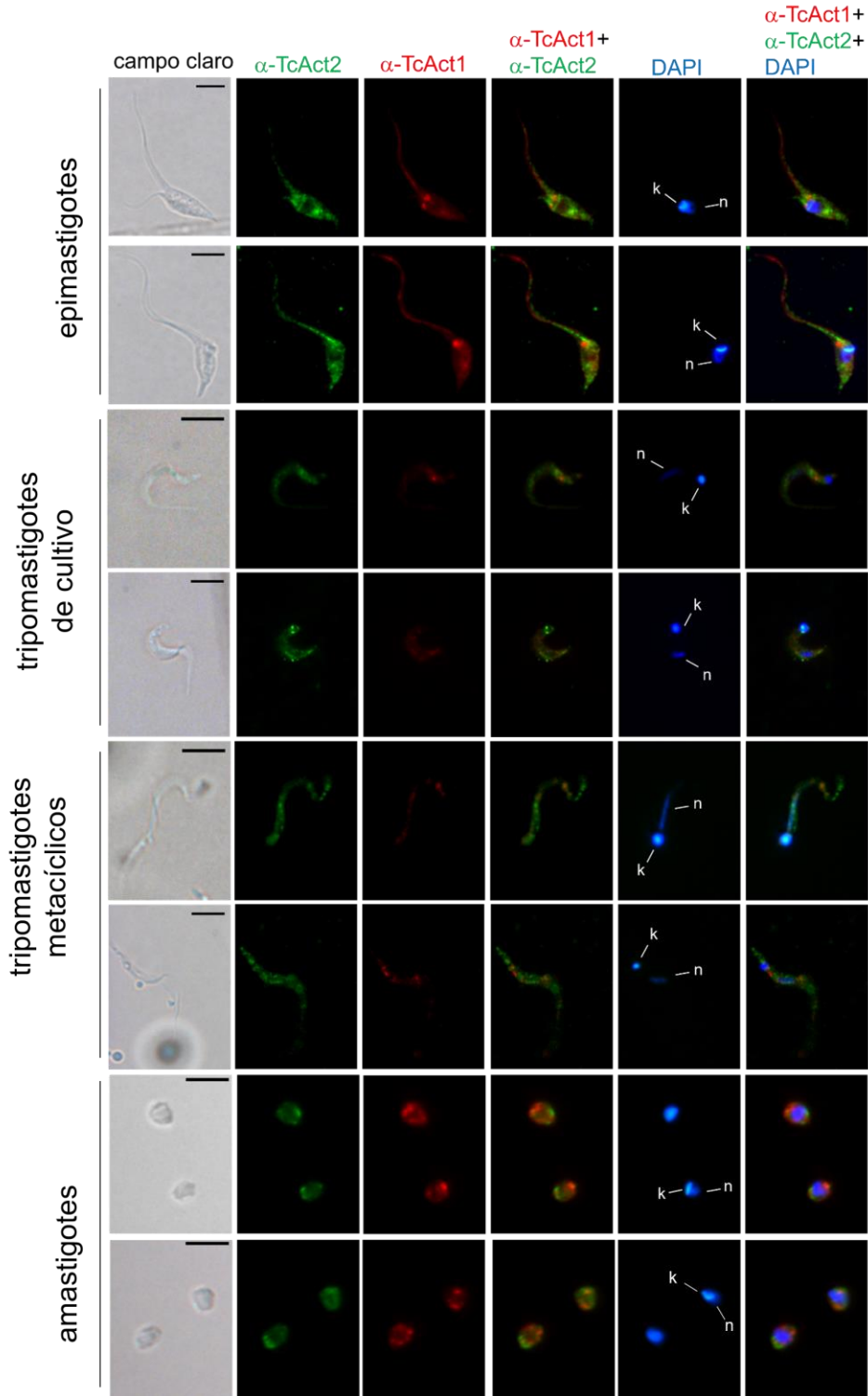
Para estudiar la expresión de TcAct2 en los diferentes estadios de *T. cruzi*, posteriormente realizamos ensayos de inmunotransferencia con lisados proteicos de epimastigotes, y tripomastigotes y amastigotes derivados de cultivo en células HFF-1. Los ensayos mostraron que el suero inmune, pero no el preinmune, reconoció una banda de ~44 kDa en todos los estadios (Figura 24). En los lisados de amastigotes, tanto con el suero inmune como con el preinmune, se observaron otras bandas de mayor y menor tamaño que el correspondiente a TcAct2. Estas bandas corresponden a las cadenas pesada y ligera (55 y 28 kDa, respectivamente) del anticuerpo monoclonal hecho en ratón utilizado para purificar los amastigotes (anti-Ssp-4, un antígeno de superficie de los amastigotes). También se observa una banda de 150 kDa que correspondería al anticuerpo sin reducir.



**Figura 24. TcAct2 se expresa en los tres estadios principales de *T. cruzi*.** Immunotransferencia de lisados proteicos de epimastigotes (E), tripomastigotes (T) y amastigotes (A) incubados con el suero immune (anti-TcAct2) o preimmune (1:8,000).

## VI.6. TcAct2 ES UNA PROTEÍNA CITOSÓLICA

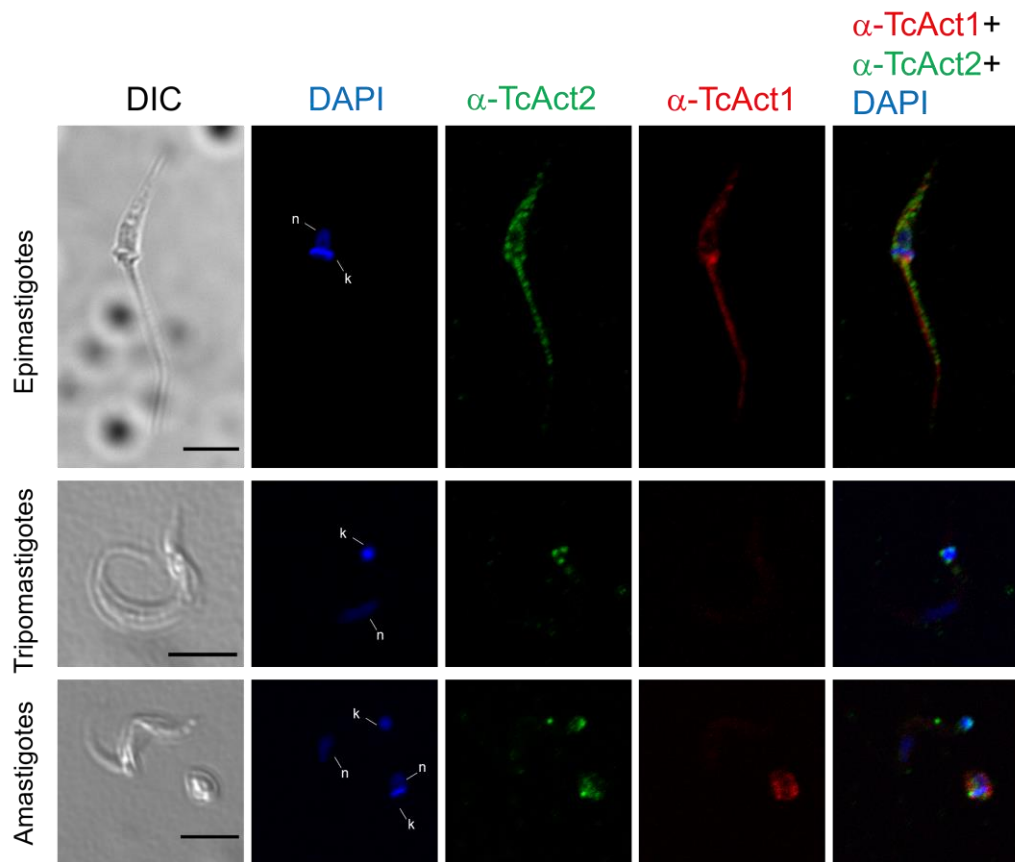
Para visualizar la distribución subcelular de TcAct2 y compararla con la de TcAct1, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia y detección por epifluorescencia en los diferentes estadios del parásito. En epimastigotes, la distribución que observamos con el suero policlonal anti-TcAct2 fue heterogénea, con un patrón punteado o granular en todo el parásito, incluyendo el flagelo, con algunos sitios de expresión incrementada, pero en una localización distinta a la observada en TcAct1 (Figura 25). En contraste, como habíamos reportado previamente, observamos a TcAct1 distribuida en todo el citoplasma, pero con parches definidos en el flagelo y como una densa concentración cerca de su base. En los tripomastigotes, las señales de ambas proteínas fueron más débiles por lo que fue necesario usar mayores concentraciones de ambos anticuerpos. Tanto en los tripomastigotes metacíclicos como en los derivados de cultivo, la mayoría de los parásitos mostró una tinción difusa y débil de ambas actinas en todo el cuerpo celular, pero sin evidencia de colocalización. En ocasiones observamos pequeñas manchas definidas de TcAct2 en algunas partes del flagelo. Algunos tripomastigotes derivados de cultivo mostraron un enriquecimiento de la proteína TcAct2 cerca del cinetoplasto (Figura 25). En el caso de TcAct1, observamos la presencia de puntos definidos entre el núcleo y el cinetoplasto en algunos tripomastigotes derivados de cultivo (Figura 25). En los amastigotes, observamos una distribución heterogénea de TcAct2, con un enriquecimiento hacia la periferia de la célula, similar



**Figura 25. TcAct1 y TcAct2 presentan diferentes distribuciones en los diferentes estadios de *T. cruzi*.** Ensayos de inmunofluorescencia usando los anticuerpos anti-TcAct1 (rojo) y anti-TcAct2 (verde) en epimastigotes, tripomastigotes de cultivo y metacíclicos, y amastigotes. Micrografías obtenidas por epifluorescencia. Los ácidos nucleicos se tiñeron con DAPI (azul). n, núcleo; k, cinetoplasto. Barras= 5  $\mu$ m. Micrografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia.

a lo que habíamos reportado antes para TcAct1, pero en localizaciones diferentes, e incluso con tendencia a observarse en el extremo celular donde se localizaba el cinetoplasto (Figura 25). El suero preinmune sólo mostró señal de fondo (Figura 37 en el Apéndice 6).

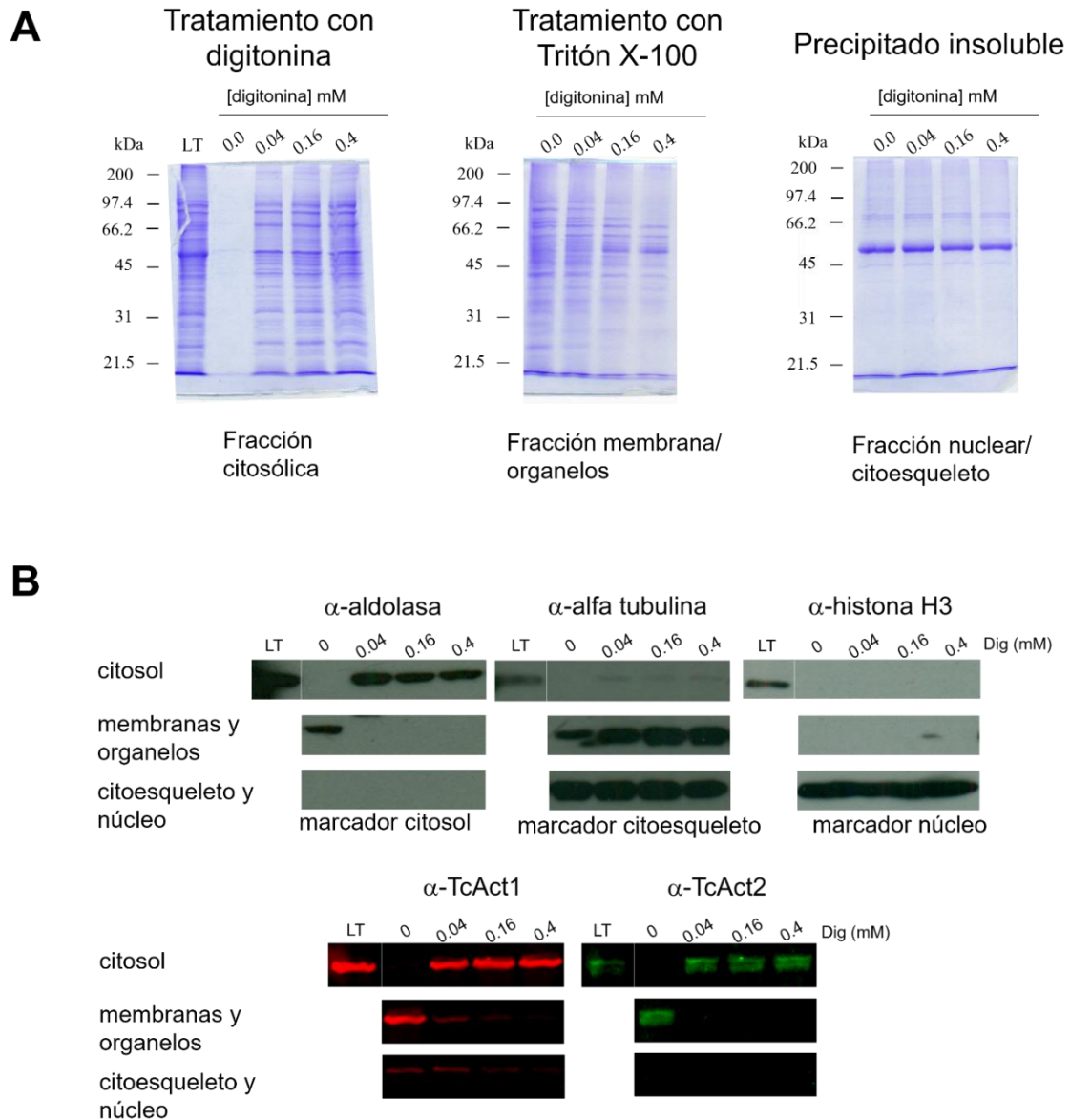
Aunque en todos los estadios se observaron algunos sitios de aparente solapamiento de TcAct1 y TcAct2, es evidente que sus distribuciones dentro de las células son diferentes. Para corroborar la ausencia de colocalización, evaluamos las inmunofluorescencias por microscopía confocal (Figura 26). En el epimastigote se hace más claro el patrón punteado de TcAct2, que no colocaliza con la concentración de actina ubicada en la base del flagelo que corresponde a TcAct1. En el tripomastigote se distinguen concentraciones de actina 2 alrededor del cinetoplasto (lo que sólo se observó en algunos tripomastigotes), mientras que la expresión de actina 1 es casi indetectable. En el caso del amastigote, se ve un punto definido de TcAct2 junto al cinetoplasto, que no se solapa con la expresión de TcAct1.



**Figura 26. TcAct1 y TcAct2 no colocalizan.** Ensayos de inmunofluorescencia usando los anticuerpos anti-TcAct1 (rojo) y anti-TcAct2 (verde) en epimastigotes, tripomastigotes de cultivo, y amastigotes. Los ácidos nucleicos se tiñeron con DAPI (azul). n, núcleo; k, cinetoplasto. Barras= 5  $\mu$ m. Micrografías obtenidas por microscopía confocal.

Estos resultados muestran que la distribución de ambas actinas es diferente en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

Se sabe que las actinas pueden tener diferentes localizaciones celulares, y esto depende en gran medida de su estado de polimerización: cuando se encuentran en forma monomérica u oligomérica se localizan en el citosol, pero cuando se encuentran en forma polimerizada pueden estar asociadas al citoesqueleto formando estructuras basadas en microfilamentos. Las actinas también pueden estar asociadas con los sistemas de membrana a través de la interacción con otras proteínas. Para evaluar la presencia de las actinas 1 y 2 de *T. cruzi* en diferentes compartimentos celulares, realizamos un fraccionamiento celular a base de detergentes en epimastigotes. Usamos concentraciones crecientes de digitonina para obtener la fracción citosólica. La digitonina forma complejos con los esteroides de membrana lo que provoca la permeabilización de las membranas y la liberación de los componentes citosólicos solubles. A bajas concentraciones, la digitonina permeabiliza las membranas plasmáticas, pero se requieren de concentraciones mayores para permeabilizar las membranas glicosomales y mitocondriales (Alonso et al. 2014). Esta extracción fue seguida por la adición de Tritón 0.5% para la obtención de una fracción enriquecida por proteínas de membrana/organelos. El Tritón solubiliza lípidos de membrana y libera el contenido de los organelos; a bajas concentraciones, se preserva la integridad de la membrana nuclear, así como los microfilamentos del citoesqueleto. La fracción insoluble final contiene proteínas que fueron resistentes a la extracción con digitonina y Tritón, y se encuentra enriquecida con componentes nucleares y de citoesqueleto (Ramsby y Makowski 2011) (Figura 27). Para corroborar el adecuado fraccionamiento de las muestras, utilizamos marcadores de citosol [anti-aldolasa de *Plasmodium*; se ha reportado el uso de este anticuerpo como control citosólico en *T. brucei*, pero la proteína reconocida no ha sido caracterizada (Romero-Meza et al. 2017)], de citoesqueleto (anti-alfa tubulina) y de núcleo (anti-histona H3), que se evaluaron por inmunotransferencia con los anticuerpos adecuados. El enriquecimiento de proteínas de membrana no pudo ser evaluado ya que no contamos con un marcador adecuado. La aldolasa fue detectada desde la concentración más baja de digitonina usada, lo que es compatible con una fracción citosólica, así como en la muestra solubilizada con Tritón que no fue tratada previamente con digitonina. La alfa tubulina se enriqueció mayoritariamente en la fracción soluble en Tritón y en el material final insoluble, con presencia tenue en la fracción soluble en digitonina. La histona H3 sólo se detectó en el material nuclear insoluble. No observamos diferencias entre las tres concentraciones de digitonina utilizadas. Con respecto a las proteínas en estudio, detectamos a la



**Figura 27. El fraccionamiento celular por detergentes de epimastigotes de *T. cruzi* indica que TcAct2 es una proteína citoplasmática.** A) Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. B) Estas fracciones se incubaron con los anticuerpos anti-TcAct1 y anti-TcAct2. Los siguientes anticuerpos se usaron como controles de fraccionamiento: anti-aldolasa (fracción citoplasmática), anti-alfa tubulina (fracción de citoesqueleto), anti-histona H3 (fracción nuclear). LT, lisado total; Dig, digitonina. Los paneles que se observan en grises se revelaron por quimioluminiscencia; los paneles a color se visualizaron en un equipo Typhoon FLA9500.

TcAct2 exclusivamente en la fracción citoplasmática. A TcAct1 la encontramos enriquecida en la fracción soluble en digitonina, pero también se apreciaron bandas en las demás fracciones, indicando que TcAct1 se encuentra principalmente en forma soluble, pero se puede asociar a

proteínas de membrana y al citoesqueleto. En estos experimentos, en los que los parásitos no fueron lisados directamente en tampón de carga que contiene SDS, identificamos a TcAct2 como un doblete, que tal vez sea consecuencia de un procesamiento de la proteína nativa. Estos resultados sugieren que ambas actinas se expresan principalmente en formas monoméricas u oligoméricas, con presencia diferente en diversos compartimentos celulares, y que sólo TcAct1 puede asociarse en forma estable con elementos de membrana y del citoesqueleto.

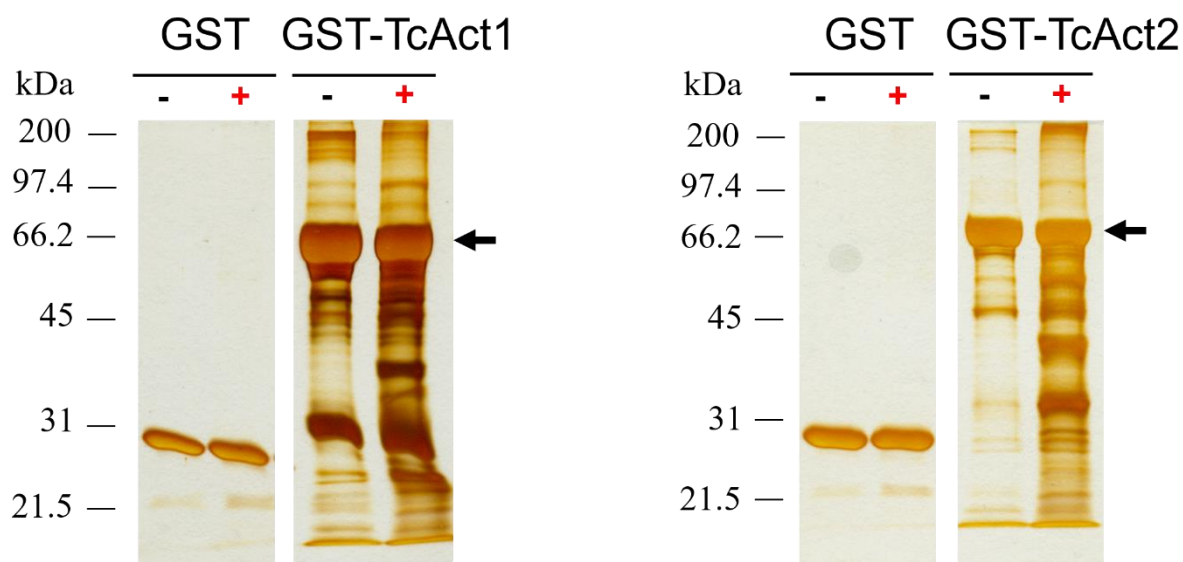
## **VI.7. INTERACCIONES PROTEICAS DE TcAct1 y TcAct2 CON LISADOS DE EPIMASTIGOTES**

Las proteínas que se unen a las actinas pueden influir en la función y localización de las actinas en la célula. Por tal motivo, otro de los objetivos del presente trabajo consistía en encontrar posibles ligandos de unión a las actinas. Considerando que las actinas 1 y 2 de *T. cruzi* presentan una distribución subcelular diferente (de acuerdo con lo observado en los ensayos de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular por detergentes), era posible que, además, las proteínas que interactuaran con dichas actinas también fueran diferentes.

En un acercamiento inicial, llevamos a cabo ensayos de coimmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-TcAct1 con extractos proteicos de epimastigotes. También intentamos coimmunoprecipitar ligandos a partir de los cultivos transfectantes usando el anticuerpo contra la etiqueta EGFP. Sin embargo, no logramos encontrar las condiciones adecuadas, por lo que cambiamos de estrategia y realizamos ensayos de co-precipitación.

Los ensayos de co-precipitación se llevaron a cabo utilizando las proteínas recombinantes GST-TcAct1 y GST-TcAct2, inmovilizadas en una matriz de glutatión sefarosa, usando como control GST (para descartar a las proteínas que se unieran a la etiqueta en lugar de a las actinas). Realizamos tres ensayos para GST-TcAct1 y cinco ensayos para GST-TcAct2. En cada ensayo se incluyó el correspondiente control de GST. Estas resinas se incubaron con extractos proteicos solubles de epimastigotes de *T. cruzi* y, después de lavar, las muestras se hirvieron en tampón Laemmli y se cargaron directamente en el gel (Figura 28).





**Figura 28. Proteínas que interactuaron con GST-TcAct1 y GST-TcAct2.** Geles representativos de los ensayos de co-precipitación realizados en los que se interactuaron las proteínas recombinantes GST-A1 (n=3) y GST-A2 (n=5), unidas a perlas de glutatión sefarosa 4B, con extractos solubles totales de epimastigotes de *T. cruzi*. Se observan diferencias en el patrón de proteínas unidas cuando se incuban con el extracto proteico en comparación con los controles. Las flechas señalan a la proteína recombinante correspondiente: (-), antes de interactuar con extractos de *T. cruzi* (epimastigotes); (+), después de interactuar con extractos de *T. cruzi* (epimastigotes). Tinción con plata de ambos geles.

Observamos un enriquecimiento de proteínas unidas en las muestras de las actinas recombinantes incubadas con los extractos del parásito, pero no en las muestras incubadas con el control GST. Las bandas más abundantes corresponden a las proteínas recombinantes con las que se hizo cada ensayo. Observamos también que, además de las actinas recombinantes, se unieron a la resina varias proteínas bacterianas, como se aprecia en los carriles antes de interactuar con los extractos de *T. cruzi*. Después de la interacción con dichos extractos, observamos la presencia de nuevas bandas, que corresponderían a las proteínas que se unieron a las actinas. Ninguna de estas bandas, tanto bacterianas como del parásito, son apreciables en los controles GST.

Las muestras obtenidas de estos ensayos de co-precipitación se mandaron a analizar por espectrometría de masas. Debido a la presencia de proteínas bacterianas en nuestras muestras, para identificar las proteínas unidas los resultados arrojados se compararon contra una base de datos de secuencias de aminoácidos deducidas del genoma de la cepa CL Brener de *T. cruzi*, que es la cepa con la que trabajamos en el laboratorio. Contrario a lo que se esperaba, el número de proteínas identificadas fue bajo. Entre los tres ensayos realizados con TcAct1, se identificó un total de 85 secuencias proteicas; de los cinco ensayos de TcAct2, 145 secuencias. Del total de

secuencias, sólo se consideraron las proteínas que se identificaron con un nivel de confianza >95% (de acuerdo con el PLGS, el algoritmo de búsqueda utilizado), lo que además se respaldó por la presencia de tres o más péptidos. De éstas, se excluyeron aquellas proteínas cuyas secuencias se identificaron también en los controles de GST (aunque no se apreciaban bandas en los geles, se detectaron unas pocas proteínas por espectrometría de masas). Sólo se consideró una secuencia representativa por familia multigénica (en caso de que hubiera más de una secuencia). En todos los ensayos se detectó la proteína recombinante correspondiente, como era de esperarse dada su abundancia en las muestras. De esta forma, el número final de secuencias seleccionadas fue de 11 para TcAct1, y 21 para TcAct2 (ver Apéndice 7). De estas secuencias, hubo algunas que se encontraron en dos o más ensayos realizados, las cuales se muestran en la tabla 4. Hubo proteínas que se detectaron en ensayos con ambas actinas, como el complejo-t del polipéptido-1 (TCP1), y las proteínas glicosomales gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y piruvato fosfato dicinasa (PPDK). También se identificaron proteínas que interactuaron solamente con una de las actinas, como el factor de elongación 1a (EF1a), que sólo se identificó con TcAct1, o proteínas mitocondriales que sólo interactuaron con TcAct2. Dentro de las proteínas que se identificaron en un solo ensayo, se encontraron algunas proteínas hipotéticas (Tablas 12 y 13 en Apéndice 7). De manera interesante, al realizar un análisis de ortólogos y una búsqueda BlastP en TriTrypDB, encontramos que una de estas proteínas hipotéticas de interacción con TcAct2 (TcCLB.508257.30) sólo se encuentra en los tripanosomas estercorearios (al igual que TcAct2). No se identificaron dominios conservados en dicha proteína. Es de notar que ninguna de las proteínas identificadas está clasificada como proteínas de unión a actina prototípicas. Sin embargo, la capacidad de la actina de mamífero de unir TCP1, GAPDH y EF1a se ha reportado previamente en la literatura.

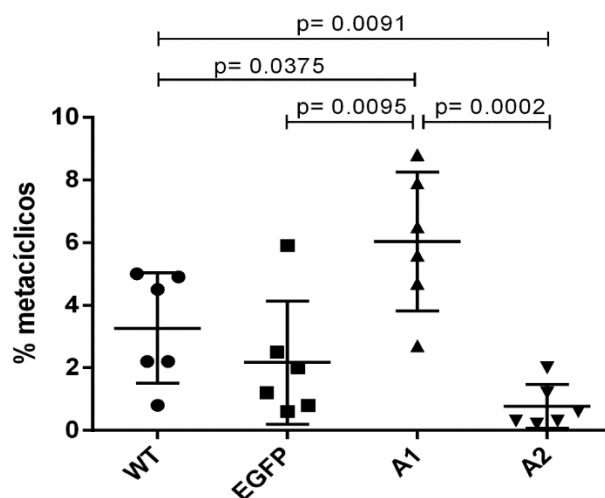
**Tabla 4. Proteínas de *T. cruzi* que interactuaron con actinas recombinantes en ensayos de co-precipitación, identificadas por espectrometría de masas.** Se muestran aquellas proteínas que se identificaron en dos o más ensayos de cada proteína recombinante, que no estuvieron presentes en los controles con GST (en negritas). Entre paréntesis se indica el número de ensayos en los que se detectaron. Algunas de estas proteínas (TCP1 y RHS) se identificaron en dos ensayos con GST-TcAct1, pero en un solo ensayo con GST-TcAct2.

No. Acceso TriTrypDB	Anotación	TcAct1 (n=3)	TcAct2 (n=5)	Interacción con actina	Referencias
TcCLB.509695.200	Complejo-t del polipéptido-1 (TCP1)	✓(2)	✓(1)	Sí	(Stemp et al. 2005; Vallin y Grantham 2019)
TcCLB.506943.50	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	✓(2)	✓(4)	Sí	(Reiss et al. 1996; Tristan et al. 2011)
TcCLB.510101.140	Piruvato fosfato dicinasa (PPDK)	✓(3)	✓(3)	?	--
TcCLB.511019.13	Proteína de retrotransposón hot spot RHS	✓(2)	✓(1)	?	--
TcCLB.511369.30	Factor de elongación 1 alfa (EF 1 alfa)	✓(2)	✗	Sí	(Liu et al. 2002; Gross y Kinzy 2005; Sasikumar et al. 2012)
TcCLB.507641.290	Chaperonina HSP60 mitocondrial	✗	✓(3)	?	--
TcCLB.506211.160	Proteína acarreadora de ATP-ADP mitocondrial	✗	✓(3)	?	--
TcCLB.509429.320	cisteín peptidasa	✗	✓(2)	?	--

## VI.8. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE EGFP-TcActinas EN LA METACICLOGÉNESIS.

Cuando se obtuvieron los parásitos transfectantes que expresaban EGFP-TcActinas, se hicieron curvas de crecimiento para determinar si la expresión de las proteínas de fusión con EGFP alteraba el crecimiento de los parásitos. No se observaron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento de los parásitos transfectados. Sin embargo, al llegar a la fase de crecimiento estacionario, la cantidad de tripomastigotes metacíclicos parecía variar entre los parásitos que expresaban EGFP-TcAct1 y EGFP-TcAct2. Se hicieron entonces ensayos de metaciclogénesis (en los que se induce la transformación del estadio epimastigote a tripomastigote

metacíclico), se fijaron y tiñeron los parásitos y se contó en ciego la cantidad de parásitos completamente transformados. Se incluyeron parásitos de la cepa silvestre (WT) y que expresaban solamente la proteína EGFP como controles (ver Figura 38 en el Apéndice 8 para los ensayos individuales). Se observó una tendencia a que hubiera mayor porcentaje de tripomastigotes metacíclicos en los parásitos que sobreexpresan TcAct1, la cual es estadísticamente significativa con respecto al control EGFP (Figura 29). Por el contrario, la sobreexpresión de TcAct2 tiende a disminuir dicho porcentaje en forma estadísticamente significativa con respecto al control WT y a los parásitos que sobreexpresan TcAct1 (Figura 29).



**Figura 29. La expresión de EGFP-actinas parece afectar el proceso de metacicloogénesis.** Porcentaje de tripomastigotes metacíclicos obtenidos tras la inducción de metacicloogénesis en epimastigotes control (cepa silvestre, WT; y parásitos transfectantes que expresan EGFP, EGFP) y en epimastigotes transfectantes que expresan EGFP-TcAct1 (A1) y EGFP-TcAct2 (A2), como se describe en Material y métodos, sección IV.2. Se muestran los resultados de seis ensayos independientes. Cada círculo, cuadrado o triángulo (normal o invertido) representa un ensayo. En el Apéndice 8 se muestran los ensayos individuales. Los valores de p se obtuvieron por pruebas t en el programa GraphPad Prism 6.

## VII. DISCUSIÓN

Nuestro grupo de trabajo se interesa en el estudio del citoesqueleto del protozoario *T. cruzi*, particularmente en las actinas de este parásito. En el presente trabajo, estudiamos la expresión y localización de la actina 2 de *T. cruzi* en los diferentes estadios del parásito, y presentamos un primer acercamiento para la identificación de posibles ligandos de esta actina.

En un estudio previo realizado en el laboratorio se había identificado bioinformáticamente la presencia de varios genes de actina en el genoma de *T. cruzi*; algunos de estos genes estaban ausentes en los organismos modelo *T. brucei* y *L. major*, entre ellos el gen que codifica para TcAct2, lo que lo hacía interesante para su estudio (Cevallos et al. 2011). En ese momento, sólo se contaba con los genomas de los tres tripanosomátidos mencionados. Actualmente, en la base de datos TriTrypDB se encuentran anotados los genomas de *B. saltans* y de 29 tripanosomátidos (incluido el de *P. confusum*). *P. confusum*, que infecta mosquitos, constituye la rama más antigua conocida del clado de los tripanosomátidos, anterior a su diversificación (Flegontov et al. 2013). El género *Bodo* es el clado de vida libre más cercano a los tripanosomátidos (Jackson et al. 2016). Entonces, para corroborar si la actina 2 era específica de *T. cruzi*, hicimos una nueva búsqueda para identificar ortólogos en estos 30 genomas e incluimos las demás proteínas anotadas como actinas (Figura 13; Tabla 5 en el Apéndice 1). El análisis de los genomas de tripanosomátidos identificó la presencia de un homólogo de la actina convencional (Act1) en todas las especies estudiadas. En cambio, se identificaron ortólogos para Act2, junto con ortólogos para Act3, solamente en *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. theileri* y *T. grayi* (todos ellos pertenecientes al grupo de los tripanosomas estercorearios), además de en *P. confusum* y *B. saltans*. Por su parte, Act4 estuvo presente en todos los genomas salvo en los tripanosomas salivarios *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* y *T. evansi*. Además, las relaciones filogenéticas observadas en el árbol (Figura 13) sugieren que estas actinas surgieron antes de la divergencia del linaje de los tripanosomátidos y, ya que se encuentran también en *P. confusum* y en *B. saltans*, habrían estado presentes en el ancestro común de estos organismos. Durante los eventos de especiación, las actinas 2 y 3 se retuvieron en los tripanosomas estercorearios, pero se perdieron en el linaje de los tripanosomas salivarios. Mediante estudios de genómica comparativa se ha visto que *P. confusum* y los tripanosomas estercorearios retienen más genes ancestrales que otros clados de tripanosomátidos (Skalický et al. 2017). La presencia de un mayor número de actinas en estos organismos podría traducirse en una mayor diversidad funcional. Los resultados indican que la actina 2 no es una actina específica de *T. cruzi*, pero parece que su presencia se

encuentra restringida a un grupo reducido de organismos, constituido por los tripanosomas estercorearios, *P. confusum* y *B. saltans*.

La distribución de las actinas entre las diferentes especies de tripanosomátidos hace pensar en una posible correlación entre un hábitat en particular durante el ciclo de vida de estos parásitos y la pérdida o conservación de ciertos genes de actina. Ahondando un poco en esta idea, se sabe que todos los tripanosomátidos (incluido *P. confusum*) habitan en el intestino de su insecto hospedero o vector durante alguna etapa de su ciclo de vida. Los tripanosomas estercorearios permanecen en el tracto intestinal de los vectores y son transmitidos a través de las heces (*T. cruzi*, *T. theileri*, y *T. grayi*) mientras que los tripanosomas salivarios migran del intestino medio hacia las glándulas salivares y son transmitidos por la picadura del insecto (*T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* y *T. evansi*) (Tielens y van Hellemond 2009). En el caso de *T. rangeli*, la infección natural parece restringirse al intestino de los triatominos infectados excepto por aquéllos del género *Rhodnius*, donde el parásito puede migrar a la saliva y ser transmitido a vertebrados (Maia da Silva et al. 2007). Estudios filogenéticos ubican a *T. rangeli* en el clado de *T. cruzi* (Hughes y Piontkivska 2003). Bajo estas consideraciones podríamos especular que TcAct2 desempeña alguna función en los estadios intestinales dentro del insecto: podría estar relacionada con la permanencia del parásito en el intestino del insecto o participar en los procesos de diferenciación del parásito que toman lugar dentro del intestino del vector. De manera similar, estos datos sugieren que TcAct2 no se requiere cuando la transmisión del insecto al hospedero es por vía salivaria.

Si bien este proyecto se enfocó en la caracterización de TcAct2, nos resultó importante adjuntar un análisis comparativo con las demás actinas de *T. cruzi*. Las secuencias deducidas de aminoácidos de TcAct2, TcAct3 y TcAct4 predicen una proteína de mayor tamaño que las actinas canónicas; aún así, los alineamientos de proteínas muestran que se conserva la mayoría de los residuos involucrados en la unión al nucleótido y en la hendidura hidrofóbica de unión a ABPs (Figura 14), sugiriendo una alta probabilidad de interacción con ATP o ABPs canónicas presentes en el parásito. Los modelos teóricos de estas tres actinas indican que conservan el plegamiento típico de una actina a pesar de los aminoácidos adicionales (Figura 15). El plegamiento del asa hidrofóbica en las tres actinas es casi el mismo que el asa en TcAct1 y ActB, sin embargo, la composición de aminoácidos del asa en TcAct2, TcAct3 y TcAct4 hace que presenten un carácter menos hidrofóbico, siendo el asa de TcAct2 la más hidrofílica (Tabla 3). Esto puede afectar la estabilidad de un polímero, ya que se ha demostrado que la hidrofobicidad de esta asa es importante para la formación de filamentos (Kuang y Rubenstein 1997). Otra característica que

notar en TcAct2 son los extremos extendidos N- y C-terminales. Es tentador especular que esta característica estructural pueda afectar la capacidad de esta proteína de formar polímeros o la forma de interactuar con ABPs canónicas o no identificadas. Algo similar podría ocurrir con TcAct3, que presenta una extensión de residuos en el extremo C-terminal. En el caso de TcAct4, las inserciones en el S4 podrían alterar las interacciones monómero-monómero dentro de un filamento. Será necesario realizar ensayos de polimerización *in vitro* con estas actinas para poder determinar si presentan la capacidad de formar filamentos a pesar de sus diferencias estructurales. La formación de filamentos *in vitro* sería un fuerte indicativo de su potencial de polimerización *in vivo*, aunque es probable que la estabilidad y durabilidad de los filamentos se vean afectadas por la falta de ABPs estabilizadoras en *T. cruzi*. Una manera de identificar la presencia de filamentos sería usar marcadores indirectos, como dominios de unión a actina etiquetados o mediante la identificación de proteínas de unión a actina-F. Una opción sería el uso de LifeAct, un péptido que corresponde a los primeros 17 aminoácidos de la proteína Abp-140 (una ABP presente en *S. cerevisiae* pero ausente en otros organismos), y que es usado como marcador de microfilamentos de actina en eucariontes superiores (Riedl et al. 2008). Otro acercamiento que ha sido utilizado en *Leishmania* es el uso de anticuerpos policlonales anti-coronina de *Leishmania*, con los que se detectó que la coronina se encontraba asociada con estructuras parecidas a filamentos de actina (Nayak et al. 2005).

La expresión de proteínas de fusión con etiquetas fluorescentes ha sido una herramienta poderosa para el estudio de la localización subcelular de proteínas (Stadler et al. 2013). Por ejemplo, Sehring y col. (2007) realizaron construcciones con EGFP en el extremo N-terminal de nueve de los 19 parálogos de actina de *P. tetraurelia*. Con esta estrategia fueron capaces de determinar la localización específica de ocho fusiones directamente por fluorescencia de EGFP de las proteínas sobreexpresadas, algunas veces mejorando la señal mediante el uso de anticuerpos anti-EGFP. La novena construcción no produjo células estables para microscopía de fluorescencia, pero fue posible evaluar la distribución subcelular de este parálogo de actina cuando se usaron anticuerpos específicos contra esta actina (Sehring et al. 2007), y se logró una localización más rigurosa cuando se colocó la etiqueta EGFP en el extremo C-terminal de la proteína (Sehring et al. 2010). Usando este acercamiento, obtuvimos transfectantes que expresaban actinas de *T. cruzi*, fusionadas por su extremo N-terminal con EGFP (Figura 17). Desafortunadamente, estos parásitos no mostraron señal de fluorescencia significativa, un fenómeno que ha sido reportado previamente y que se ha atribuido a un mal plegamiento de la

proteína (Waldo et al. 1999). La detección de las proteínas de fusión usando anticuerpos anti-EGFP demostró que se expresaban en citoplasma (Figura 18). Sin embargo, no pudimos identificar una señal incrementada de EGFP-TcAct1 en las áreas en las que previamente habíamos identificado concentraciones importantes de actina por estudios de inmunofluorescencia (Cevallos et al. 2011). Sospechamos que la etiqueta pudo interferir con su distribución y/o incorporación de la actina 1 a sus sitios funcionales dentro de la célula. Por tanto, decidimos evaluar el efecto de mover la etiqueta al extremo C-terminal en las actinas 1 y 2, así como incrementar los niveles de expresión usando un vector diferente con un promotor fuerte (Figura 19). La transfección de epimastigotes con TcAct1-EGFP resultó en una expresión intensa de la proteína de fusión, pero los parásitos no sobrevivieron a largo plazo por lo que no se obtuvieron transfectantes estables. Se ha observado que la sobreexpresión de actina en *S. cerevisiae* es tóxica para esta levadura (Makanae et al. 2013). Por otro lado, la sobreexpresión de TcAct2-EGFP resultó en una distribución citoplásmica de la proteína de fusión. Sin embargo, se detectaron dos bandas en los ensayos de inmunotransferencia usando el anticuerpo anti-EGFP, una del peso esperado para la proteína de fusión y otra de tamaño similar a EGFP (Figura 35 en el Apéndice 4). Esto sugería que la proteína de fusión sufría modificaciones dentro del parásito que liberaban la fracción EGFP. Los resultados, por tanto, no fueron concluyentes, ya que la fluorescencia observada en los parásitos podría provenir tanto de la fusión como de la fracción EGFP liberada.

Decidimos utilizar una estrategia alternativa para la caracterización de la expresión celular de TcAct2. Así, obtuvimos un suero policlonal de ratón contra esta proteína que resultó específico para esta actina y no mostró reactividad cruzada contra las otras TcActinas (Figura 22). Con este anticuerpo comprobamos que TcAct2 se expresa en los tres estadios principales de *T. cruzi* (Figura 24). Comprobamos también que el anticuerpo anti-TcAct1 con el que ya contábamos tampoco mostraba reactividad cruzada (Figura 20). En epimastigotes, estudios de 2D demostraron que la TcAct2 se expresa como tres especies diferentes, ninguna de las cuales corresponde con las variantes previamente identificadas por nuestro anticuerpo anti-TcAct1 (Figura 23). Así, el desarrollo de anticuerpos específicos contra estas dos actinas de *T. cruzi* probó ser un acercamiento exitoso que puede ser usado para realizar futuros estudios con TcAct3 y TcAct4.

De manera interesante, identificamos seis especies de TcAct1 en lugar de las cinco que se habían reportado. Esta diferencia puede deberse a que ahora utilizamos lisado total de parásitos en lugar del protocolo de extracción de proteínas optimizado para enriquecer proteínas de



citoesqueleto (Ambrosio et al. 2003). Considerando la especificidad de nuestros anticuerpos y que TcAct2 es la actina más cercana en identidad/similitud a TcAct1 (y, por ende, la reactividad cruzada con cualquiera otra de las actinas es menos factible), lo más probable es que estas señales correspondan a TcAct1 con diferentes modificaciones postraduccionales. Se sabe que las actinas convencionales pueden sufrir diversas modificaciones postraduccionales; las más estudiadas son la acetilación del extremo N-terminal, la arginilación del extremo N-terminal y la fosforilación y oxidación de varios residuos. En los tripanosomátidos, sólo se ha identificado la fosforilación de algunos residuos en las actinas convencionales de *L. donovani* (Ser48) y *T. brucei* (Ser234 y Ser236), y la acetilación de Ser2 y Lys19 en TcAct1 (Nett et al. 2009; Tsigankov et al. 2013; Moretti et al. 2018). Es probable que alguna de estas modificaciones se corresponda con alguna de las seis especies que detectamos en TcAct1 en los ensayos en 2D que realizamos. Las tres especies detectadas para TcAct2 también pueden ser consecuencia de PTMs. La determinación de la naturaleza química de las PTMs en actina es importante ya que constituyen otra forma de regular sus funciones dentro de las células. Por tal motivo, la confirmación de su identidad en TcAct1 y TcAct2 está en proceso.

Los ensayos de inmunofluorescencia de TcAct2 en epimastigotes mostraron un patrón punteado en todo el cuerpo celular, sugiriendo una distribución citosólica de la proteína (Figura 25). Los ensayos de inmunotransferencia de muestras de extractos de epimastigotes obtenidas por fraccionamiento subcelular usando detergentes confirmaron que TcAct2 se encuentra localizada en el citosol (Figura 27). Esto podría implicar que no tiene la capacidad de polimerizar o de formar filamentos estables que le permitan permanecer asociada al citoesqueleto, posiblemente como consecuencia de las diferencias estructurales y en secuencia que presenta con respecto a TcAct1. Esta propiedad sería similar a la observada con las actinas de *Plasmodium*, las cuales son propensas a formar polímeros muy cortos que son altamente dinámicos, transitorios e inestables (Schmitz et al. 2005, 2010). En el caso de TcAct1, las bandas inmunorreactivas detectadas después del fraccionamiento con detergentes indicaron que TcAct1 es predominantemente una proteína citosólica pero que puede estar asociada también con membranas o con el citoesqueleto de *T. cruzi*. Estudios previos realizados con anticuerpos contra la actina convencional (TcAct1) han mostrado que la mayoría de la actina en epimastigotes de *T. cruzi* está presente en la fracción soluble de extractos con Tritón (De Melo et al. 2008; Cevallos et al. 2011). De acuerdo con los ensayos de inmunofluorescencia, la distribución de TcAct2 en amastigotes y tripomastigotes también parece ser citosólica (Figura 25). Sin embargo, en algunos parásitos de estos dos estadios

se observaron concentraciones en la forma de puntos o manchas cerca del cinetoplasto. La asociación de actina con el cinetoplasto ha sido demostrada en *Leishmania* (Sahasrabudde et al. 2004), en donde se cree que participa en procesos de remodelación del kDNA (Kapoor et al. 2010). La falta de colocalización de TcAct2 con TcAct1 (Figura 26) y su diferente distribución subcelular en todos los estadios del parásito sugieren que estas actinas participan en diferentes funciones dentro de la célula.

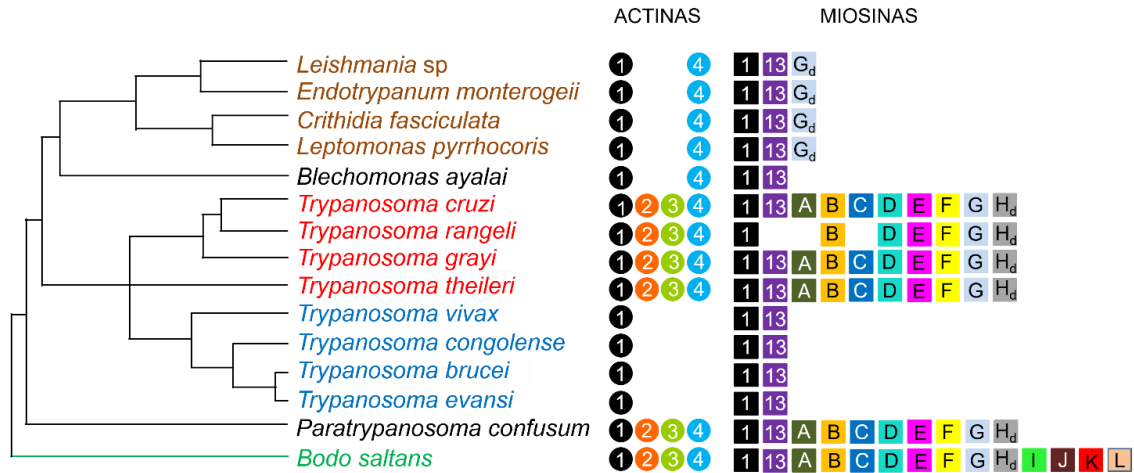
Las diferencias en el porcentaje de tripomastigotes metacíclicos observadas en los ensayos de metaciclologénesis también sugieren funciones diferentes entre las actinas 1 y 2 (Figura 29). La expresión moderada de EGFP-TcAct1 y EGFP-TcAct2 (expresadas usando pTEX, un vector que carece de promotor) afectó de forma opuesta el porcentaje de diferenciación de los epimastigotes: mientras que los transfectantes que expresaban EGFP-TcAct1 mostraron una tendencia a que hubiera un mayor porcentaje de tripomastigotes metacíclicos, la expresión de EGFP-TcAct2 condujo a una disminución en dicho porcentaje. Con estos experimentos no es posible determinar si la sobreexpresión de estas proteínas afecta directamente sobre la función de las actinas o si su exceso “secuestra” los elementos de interacción y favorece (en el caso de TcAct1) o impide (en el caso de TcAct2) el proceso de diferenciación. Se requiere una evaluación en detalle para dilucidar los mecanismos involucrados. Algo a considerar es que el porcentaje de transformación es bajo para la cepa CL Brener (lo cual ha sido reportado previamente; Contreras et al. 1985). Sería conveniente repetir estos ensayos utilizando una cepa de *T. cruzi* cuyo rendimiento de transformación sea mayor (por ejemplo, la cepa DM28c), para corroborar las tendencias observadas. De ser así, sería interesante infectar cultivos celulares con estos parásitos transfectantes y ver cómo afecta la sobreexpresión de estas actinas en el proceso de infección del parásito, aportando pistas sobre las funciones de ambas actinas.

Las diferencias en localización y compartimentalización observadas entre ambas actinas pueden deberse también a las proteínas con las que tengan interacción. Por lo que intentamos identificar algunos de sus posibles ligandos. En un primer acercamiento, realizamos ensayos de coimmunoprecipitación utilizando anticuerpos (anti-TcAct1, con extractos proteicos de epimastigotes; o anti-EGFP, con extractos de los cultivos transfectantes). Debido a que no logramos encontrar las condiciones adecuadas, cambiamos de estrategia y llevamos a cabo ensayos de co-precipitación utilizando como carnadas a las actinas recombinantes fusionadas a GST expresadas en bacteria (Figura 28). Entre los ligandos, esperábamos encontrar algunas proteínas de interacción canónica, tales como profilina, twinfilina o cofilina. Sin embargo, ninguna de ellas

se identificó con estos experimentos. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio y usando una estrategia similar, pero con GST-profilina como carnada, encontramos que la profilina de *T. cruzi* se une a la actina convencional del parásito (Osorio-Méndez et al. 2016). Una posibilidad que explique la falta de ABPs canónicas es que las actinas recombinantes no hayan sido plegadas a un estado funcional. Se sabe que las actinas requieren ser plegadas a su forma madura y nativa por medio de chaperonas especializadas conocidas como TCP1 (Sternlicht et al. 1993; Vallin y Grantham 2019). Las chaperoninas bacterianas pueden plegar a las actinas expresadas en forma heteróloga para evitar la formación de agregados, pero no consiguen que sea el plegamiento correcto para su función (Stemp et al. 2005). Además, se ha visto que no es suficiente con utilizar un complejo de chaperonina de eucariote, sino que se requiere la presencia de la TCP1 homóloga para el adecuado plegamiento de las actinas (Olshina et al. 2016). Esperábamos que estos complejos de chaperonina, que deberían estar presentes en nuestros lisados del parásito, plegaran a las actinas recombinantes a su forma madura funcional, pero tal vez el tiempo de incubación no fue suficiente y sólo permitió el plegamiento a estados intermedios de la actina. Otra posible explicación es que la etiqueta GST obstaculizó la interacción de ABPs por impedimento estérico. La etiqueta se encuentra unida al extremo N-terminal de las actinas, el cual se localiza en el S1, cerca de la hendidura hidrofóbica, donde se unen muchas de las ABPs, incluyendo a profilina y twinfilina. Otra posibilidad es que la gran cantidad de proteína recombinante presente en la muestra que se envió a analizar por espectrometría de masas haya enmascarado la presencia de ligandos que estuvieran presentes en cantidades menores. La mayoría de las proteínas identificadas pertenece a familias de proteínas multigénicas que suelen ser muy abundantes dentro de las células, como chaperoninas, proteínas de metabolismo, factores de traducción. Esto podría indicar deficiencias en el protocolo empleado que llevaron a la unión por abundancia proteica más que por interacciones específicas. Sin embargo, para la selección final, sólo se consideraron aquellas proteínas que no fueron detectadas en los ensayos control con GST, sugiriendo que su presencia se debió a interacción con las actinas recombinantes. Dentro de estas proteínas hay algunas cuya presencia podría ser explicada, ya que su interacción con actina en otros sistemas ha sido previamente reportada (Tabla 4). Por un lado, en ensayos con ambas actinas, se identificaron subunidades de TCP1, la chaperona encargada del plegamiento correcto de las actinas, lo que sería de esperarse considerando que las actinas usadas como carnada fueron expresadas en un sistema heterólogo. También con ambas actinas se identificó a GAPDH, proteína de la vía glicolítica que se ha visto que participa en diversas

funciones en diferentes compartimentos celulares, incluyendo la interacción con actina y facilitando su polimerización (Tristan et al. 2011). Se sabe que GAPDH presenta un dominio de unión conservado para actina, el cual ha sido identificado también por análisis de acoplamiento en *Babesia microti*, un parásito apicomplejo (Liu et al. 2019). En células NIH 3T3 (fibroblastos de embrión de ratón), la privación de suero (que posiblemente se asocia a estrés oxidativo) promueve la asociación de GAPDH con fibras de estrés (Schmitz y Bereiter-Hahn 2002). Aunque pareciera que se une principalmente a actina-F, simulaciones computacionales indicaron que GAPDH puede unirse tanto a actina monomérica como filamentosa (Ouporov et al. 2001). Por otro lado, en ensayos con TcAct1 se identificó la presencia de EF1a, cuya interacción con actina también ha sido descrita en la literatura. EF1a es un componente clave de la maquinaria de traducción, pero desempeña funciones no canónicas que incluyen la capacidad de interactuar con el citoesqueleto y modularlo (Jakobsson et al. 2018). De hecho, se ha propuesto que el citoesqueleto de actina sirve como un andamio para los componentes de la maquinaria de traducción, ya que varios de los factores involucrados se encuentran asociados al citoesqueleto de actina (Sasikumar et al. 2012). La identificación de EF1a como una proteína de unión a actina se realizó por primera vez en *Dictyostelium discoideum* (Yang et al. 1990), organismo en el que se ha estimado que más del 60% de EF1a está asociado con el citoesqueleto de actina (Edmonds et al. 1995). EF1a puede unir actina-G y actina-F, promueve la formación de haces de actina (Murray et al. 1996) y sirve como anclaje de mRNA a actina-F (Liu et al. 2002). Además, mediante mutantes de EF1a en levadura se demostró que las funciones de traducción y organización del citoesqueleto son funciones separadas de EF1a, ya que las mutaciones alteraron el citoesqueleto de actina sin afectar la traducción (Gross y Kinzy 2005). Por otro lado, debido a las diferencias en secuencia de las actinas de *T. cruzi* con respecto a las de humano, además de las ABPs canónicas, esperábamos encontrar varios posibles ligandos dentro de las proteínas específicas o anotadas como hipotéticas de *T. cruzi* (Tabla 4). Aunque la cantidad de proteínas de este tipo que identificamos fue baja, encontramos una proteína hipotética de interacción con TcAct2, que no tiene dominios conservados, pero que, al igual que esta actina, sólo está presente en los tripanosomas estercorarios, haciéndola un blanco interesante para su estudio. Estos resultados nos indican que es posible encontrar tanto diferencias como similitudes en el patrón de ligandos de actinas de *T. cruzi*, pero que es necesario replantear las estrategias a seguir para su estudio, ya que las asociaciones detectadas *in vitro* no necesariamente reflejan la situación real dentro de los parásitos, por lo que no podemos asegurar que tengan relevancia biológica.

Otra familia de proteínas de unión a actina que estuvo ausente en los resultados de co-precipitación fueron las miosinas, proteínas motoras que unen actinas. Sin embargo, ya que las miosinas sólo se unen a actina-F, era improbable que interactuaran con las actinas recombinantes inmovilizadas en la resina. De manera interesante, un análisis reciente reveló una expansión y pérdidas secundarias de los genes de miosinas que cercanamente reflejan nuestros hallazgos (De Souza et al. 2018). Como ya mencionamos, los tripanosomas estercorarios tienen ortólogos para las cuatro actinas de *T. cruzi* mencionadas en el presente proyecto, pero además presentan un conjunto expandido de 10 genes de miosina, con la excepción de *T. rangeli*, que sólo tiene seis (Figura 30). Las especies de la subfamilia Leishmaniinae que tienen Act1 y Act4 tienen un conjunto reducido de tres miosinas (1, 13 y G<sub>d</sub>). Los tripanosomas salivarios, que carecen de las actinas 2, 3 y 4, contienen sólo dos miosinas (1 y 13), con la excepción de *T. congolense* que sólo tiene la miosina 1. *B. saltans* y *P. confusum* también presentan ortólogos para estos cuatro genes de actina; *P. confusum* presenta la misma cantidad de genes de miosina que los tripanosomas estercorarios, mientras que *B. saltans* tiene un mayor repertorio de genes de miosina. Esto sugiere que los genes faltantes se perdieron después de la diversificación de los tripanosomátidos, como ocurrió con otras proteínas (Jackson et al. 2016).



**Figura 30. Esquema de las relaciones filogenéticas entre diferentes tripanosomátidos.** El árbol está basado en el reportado por De Souza y col. (2018). Las letras y línea verde indican al cinetoplástido de vida libre *B. saltans*. Las líneas negras indican especies de la familia Trypanosomatidae. Especies de la subfamilia Leishmaniinae se encuentran en letras cafés. Especies del grupo de tripanosomas estercorarios se encuentran en letras rojas, mientras que especies del grupo de tripanosomas salivarios están en letras azules. Los círculos representan la presencia de diferentes genes de actina (mencionados en esta tesis). Los cuadros representan la presencia de diferentes genes de miosinas (De Souza et al. 2018).

## VIII. CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que TcAct2 es una proteína diferente a TcAct1 ya que:

- aunque ambas se expresan en todos los estadios de *T. cruzi*, su localización subcelular es diferente, sin evidencias de colocalización.
- ambas están presentes en el citosol, pero sólo TcAct1 se asocia en forma estable con el citoesqueleto y membranas de epimastigotes de *T. cruzi*.
- ambas presentan variantes (en ensayos de electroforesis en 2D), pero sus pIs son diferentes; estas variantes podrían ser consecuencia de posibles modificaciones postraduccionales de estas proteínas.

Todo lo anterior sugiere que las funciones que llevan a cabo TcAct1 y TcAct2 no son redundantes. Los resultados obtenidos con el presente proyecto también sugieren que el sistema de actina de tripanosomas estercorarios, incluyendo a *T. cruzi*, parece ser más complejo que el de los organismos modelo (triptanosomas salivarios y leishmanias), debido al conjunto expandido de actinas, proteínas de unión a actina y proteínas motoras que han conservado. Dadas las diferencias en secuencia y estructura que presentan TcAct3 y TcAct4 con TcAct1 y TcAct2, es muy posible también que presenten funciones específicas. En el caso de TcAct2, los resultados preliminares obtenidos en los ensayos de metaciclógenésis sugerirían su participación en la reorganización de organelos. Sin embargo, aún no conocemos con certeza la naturaleza de los ligandos de estas actinas, que podrían dar pistas sobre sus funciones. Estos ligandos podrían involucrar ABPs no canónicas o desconocidas, o proteínas con propiedades de *moonlighting*. Es necesario caracterizar el papel biológico de cada actina para descifrar la correlación entre la conservación de los genes de actina y una especialización funcional en tripanosomas estercorarios.

## IX. PERSPECTIVAS

### A corto plazo:

- Identificar el tipo de modificaciones postraduccionales que se producen en TcAct1 y TcAct2, y determinar su posible asociación con compartimentos celulares específicos.
- Verificar y completar la interacción de estas actinas con otros ligandos. Una opción prometedora para seguir sería la proteína hipotética que se identificó y que parece ser exclusiva de tripanosomas estercorarios.

### A largo plazo:

- Determinar el papel funcional de estas actinas en *T. cruzi*, mediante la obtención de parásitos *knockout* por recombinación homóloga o por CRISPR/Cas9.
- Caracterizar a las actinas TcAct3 y TcAct4.
- Estudiar el efecto de la expresión de EGFP-TcActinas en la metaciclologénesis. Los resultados preliminares obtenidos requieren una valoración completa. Sería importante utilizar una cepa que presente un mayor porcentaje de metaciclologénesis, o utilizar etiquetas más pequeñas para disminuir la posibilidad de que interfieran con las funciones de las actinas.

## X. REFERENCIAS

- Alberico E. O., Zhu Z. C., Wu Y.-F. O., Gardner M. K., Kovar D. R. y Goodson H. V. 2016. Interactions between the microtubule binding protein EB1 and F-actin. *J. Mol. Biol.*, **428**:1304–1314.
- Alonso V. L., Villanova G. V., Ritagliati C., Motta M. C. M., Cribb P. y Serra E. C. 2014. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 3 binds acetylated  $\alpha$ -tubulin and concentrates in the flagellum during metacyclogenesis. *Eukaryot. Cell*, **13**:822–831.
- Amberg D. C. 1998. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol. Biol. Cell*, **9**:3259–3262.
- Ambrosio J. R., Reynoso-Ducoing O., Hernández-Sánchez H., Correa-Piña D., González-Malerva L., Cruz-Rivera M. y Flisser A. 2003. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biol. Int.*, **27**:727–733.
- Ampe C. y Van Troys M. 2017. Mammalian actins: isoform-specific functions and diseases. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **235**:1–37.
- Bamburg J. R. y Bernstein B. W. 2010. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol. Rep.*, **2**:62.
- Belyantseva I. A., Perrin B. J., Sonnemann K. J., Zhu M., Stepanyan R., McGee J., Frolenkov G. I., Walsh E. J., Friderici K. H., Friedman T. B. y Ervasti J. M. 2009.  $\gamma$ -Actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**:9703–9708.
- Beneke T., Demay F., Hookway E., Ashman N., Jeffery H., Smith J., Valli J., Becvar T., Myskova J., Lestinova T., Shafiq S., Sadlova J., Volf P., Wheeler R. J. y Gluenz E. 2019. Genetic dissection of a *Leishmania* flagellar proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections. *PLoS Pathog.*, **15**:e1007828.
- Bern C. 2015. Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.*, **373**:456–466.
- Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., Blandin G., Renauld H., Bartholomeu D. C., Lennard N. J., Caler E., Hamlin N. E., Haas B., Böhme U., Hannick L., Aslett M. A., Shallom J., Marcello L., Hou L., Wickstead B., Alsmark U. C. M., Arrowsmith C., Atkin R. J., Barron A. J., Bringaud F., Brooks K., Carrington M., Cherevach I., Chillingworth T. J., Churcher C., Clark L. N., Corton C. H., Cronin A., Davies R. M., Doggett J., Djikeng A., Feldblyum T., Field M. C., Fraser A., Goodhead I., Hance Z., Harper D., Harris B. R., Hauser H., Hostetler J., Ivans A., Jagels K., Johnson D., Johnson J., Jones K., Kerhornou A. X., Koo H., Larke N., Landfear S., Larkin C., Leech V., Line A., Lord A., MacLeod A., Mooney P. J., Moule S., Martin D. M. A., Morgan G. W., Mungall K., Norbertczak H., Ormond D., Pai G., Peacock C. S., Peterson J., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Rajandream M. A., Reitter C., Salzberg S. L., Sanders M., Schobel S., Sharp S., Simmonds M., Simpson A. J., Tallon L., Turner C. M. R., Tait A., Tivey A. R., Van Aken S., Walker D., Wanless D., Wang S., White B., White O., Whitehead S., Woodward J., Wortman J., Adams M. D., Embley T. M., Gull K., Ullu E., Barry J. D., Fairlamb A. H., Opperdoes F., Barrell B. G., Hall N., Fraser C. M., Melville S. E. y El-Sayed N. M. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* ., **309**:416–422.
- Bertling E., Englund J., Minkeviciene R., Koskinen M., Segerstråle M., Castrén E., Taira T. y Hotulainen P. 2016. Actin tyrosine-53-phosphorylation in neuronal maturation and synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, **36**:5299–5313.
- Bezanilla M., Gladfelter A. S., Kovar D. R. y Lee W. L. 2015. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *J. Cell Biol.*, **209**:329–337.
- Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., Sykes C. y Plastino J. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.*, **94**:235–263.
- Bretscher A. 2013. Deconstructing formin-dependent actin cable assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**:18744–18745.



- Broadhead R., Dawe H. R., Farr H., Griffiths S., Hart S. R., Portman N., Shaw M. K., Ginger M. L., Gaskell S. J., McKean P. G. y Gull K. 2006. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature*, **440**:224–227.
- Burgess S., Walker M., Knight P. J., Sparrow J., Schmitz S., Offer G., Bullard B., Leonard K., Holt J. y Trinick J. 2004. Structural studies of arthrin: monoubiquitinated actin. *J. Mol. Biol.*, **341**:1161–1173.
- Cevallos A. M., López-Villaseñor I., Espinosa N., Herrera J. y Hernández R. 2003. *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Exp. Parasitol.*, **103**:27–34.
- 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. y Hernández R. 2011. *Trypanosoma cruzi*: Multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. *Exp. Parasitol.*, **127**:249–259.
- Chen A., Arora P. D., McCulloch C. A. y Wilde A. 2017. Cytokinesis requires localized  $\beta$ -actin filament production by an actin isoform specific nucleator. *Nat. Commun.*, **8**.
- Collins A., Warrington A., Taylor K. A. y Svitkina T. 2011. Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.*, **21**:1167–1175.
- Contreras V. T., Salles J. M., Thomas N., Morel C. M. y Goldenberg S. 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **16**:315–327.
- Cupples C. G. y Pearlman R. E. 1986. Isolation and characterization of the gene from *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**:5160–5164.
- De Lanerolle P. 2012. Nuclear actin and myosins at a glance. *J. Cell Sci.*, **125**:4945–4949.
- De Melo L. D. B., Sant'anna C., Reis S. A., Lourenço D., De Souza W. D., Lopes U. G. y 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.
- De Souza D. A. S., Pavoni D. P., Krieger M. A. y Ludwig A. 2018. Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization. *Sci. Rep.*, **8**:1376–1387.
- De Souza W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.*, **86**:197–283.
- De Souza W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.*, **8**:269–285.
- De Souza W., de Carvalho T. U. y Barrias E. S. 2017. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. Second Edi. Elsevier Inc. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00018-6>
- De Souza W., Meza I., Martínez-Palomo A., Sabanero M., Souto-Padron T. y Meirelles M. N. L. 1983. *Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *J. Parasitol.*, **69**:138–142.
- Dobrowolski J. M., Niesman I. R. y Sibley L. D. 1997. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **37**:253–262.
- Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P. y 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. y Holmes K. C. 2011. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.*, **40**:169–186.
- Dugina V. B., Shagieva G. S. y Koprnin P. B. 2019. Biological role of actin isoforms in mammalian cells. *Biochem.*, **84**:583–592.
- Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clément S. y Chaponnier C. 2009.  $\beta$ - and  $\gamma$ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J. Cell Sci.*, **122**:2980–2988.
- Edmonds B. T., Murray J. y Condeelis J. 1995. pH regulation of the F-actin binding properties of *Dictyostelium* elongation factor 1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **270**:15222–15230.

- Engqvist-Goldstein Å. E. Y. y Drubin D. G. 2003. Actin assembly and endocytosis: From yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**:287–332.
- Ersfeld K. y Gull K. 2001. Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.*, **114**:141–148.
- Figueiredo R. C. B. Q., Rosa D. S. y Soares M. J. 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J. Parasitol.*, **86**:1213–1218.
- Flegontov P., Votýpka J., Skalický T., Logacheva M. D., Penin A. A., Tanifuji G., Onodera N. T., Kondrashov A. S., Volf P., Archibald J. M. y Lukeš J. 2013. *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr. Biol.*, **23**:1787–1793.
- Fletcher D. A. y Mullins R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **463**:485–492.
- Frangioni J. V. y Neel B. G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.*, **210**:179–187.
- Fujii T., Iwane A. H., Yanagida T. y Namba K. 2010. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature*, **467**:724–728.
- Gallwitz D. y Seidel R. 1980. Molecular cloning of the actin gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **8**:1043–1059.
- García-Salcedo J. A., Pérez-Morga D., Gijón P., Dilbeck V., Pays E. y Nolan D. P. 2004. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, **23**:780–789.
- Gefen A. y Weihs D. 2016. Mechanical cytoprotection: a review of cytoskeleton-protection approaches for cells. *J. Biomech.*, **49**:1321–1329.
- Gordon J. L. y Sibley L. D. 2005. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics*, **6**:179–191.
- Grintsevich E. E., Ge P., Sawaya M. R., Yesilyurt H. G., Terman J. R., Zhou Z. H. y Reisler E. 2017. Catastrophic disassembly of actin filaments via Mical-mediated oxidation. *Nat. Commun.*, **8**:2183–2192.
- Gross S. R. y 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.
- Gull K. 1999. The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**:629–655.
- Gunning P. W., Ghoshdastider U., Whitaker S., Popp D. y Robinson R. C. 2015. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.*, **128**:2009–2019.
- Hanson J. y Lowy J. 1963. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.*, **6**:46–60.
- Herman I. M. 1993. Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**:48–55.
- Hild G., Bugyi B. y Nyitrai M. 2010. Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function. *Cytoskeleton*, **67**:609–629.
- Hofmann W. A., Arduini A., Nicol S. M., Camacho C. J., Lessard J. L., Fuller-Pace F. V. y De Lanerolle P. 2009. SUMOylation of nuclear actin. *J. Cell Biol.*, **186**:193–200.
- Hohmann y Dehghani. 2019. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, **8**:362.
- Hughes A. L. y Piontkivska H. 2003. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: Evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol. Biol. Evol.*, **20**:644–652.
- Hurley J. H. 1996. The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **25**:137–62.
- Hurst V., Shimada K. y Gasser S. M. 2019. Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair. *Trends Cell Biol.*, **29**:462–476.

- Jackson A. P., Otto T. D., Aslett M., Armstrong S. D., Bringaud F., Schlacht A., Hartley C., Sanders M., Wastling J. M., Dacks J. B., Acosta-Serrano A., Field M. C., Ginger M. L. y Berriman M. 2016. Kinetoplastid phylogenomics reveals the evolutionary innovations associated with the origins of parasitism. *Curr. Biol.*, **26**:161–172.
- Jakobsson M. E., Malecki J. y Falnes P. 2018. Regulation of eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) by dynamic lysine methylation. *RNA Biol.*, **15**:314–319.
- Johnston A. B., Collins A. y Goode B. L. 2015. High-speed depolymerization at actin filament ends jointly catalysed by Twinfilin and Srv2/CAP. *Nat. Cell Biol.*, **17**:1504–1511.
- Kabsch W. y Holmes K. C. 1995. The actin fold. *FASEB J.*, **9**:167–174.
- Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F. y Holmes K. C. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature*, **347**:37–44.
- Kaksonen M., Toret C. P. y Drubin D. G. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**:404–414.
- Kapoor P., Kumar A., Naik R., Ganguli M., Siddiqi M. I., Sahasrabudhe A. A. y Gupta C. M. 2010. *Leishmania* actin binds and nicks kDNA as well as inhibits decatenation activity of type II topoisomerase. *Nucleic Acids Res.*, **38**:3308–3317.
- Kapoor P., Sahasrabudhe A. A., Kumar A., Mitra K., Siddiqi M. I. y Gupta C. M. 2008. An unconventional form of actin in protozoan hemoflagellate, *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, **283**:22760–22773.
- Karakozova M., Kozak M., Wong C. C. L., Bailey A. O., Yates J. R. I., Mogilner A., Zebroski H. y Kashina A. 2006. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science (80-. )*, **313**:192–196.
- Kelly J. M., Ward H. M., Miles M. A. y Kendall G. 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.*, **20**:3963–3969.
- Kimple M. E., Brill A. L. y Pasker R. L. 2013. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **73**:9.9.1-9.9.23.
- Klages-Mundt N. L., Kumar A., Zhang Y., Kapoor P. y Shen X. 2018. The nature of actin-family proteins in chromatin-modifying complexes. *Front. Genet.*, **9**:1–16.
- Kohl L. y Gull K. 1998. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **93**:1–9.
- Kowalska A., Kowalski P. y Torres-Torres M. Á. 2011. Chagas disease- American trypanosomiasis. *Pol. Ann. Med.*, **18**:156–167.
- Kuang B. y Rubenstein P. A. 1997. Beryllium fluoride and phalloidin restore polymerizability of a mutant yeast actin ( V266G , L267G ) with severely decreased hydrophobicity in a subdomain 3 / 4 loop \*. *J. Biol. Chem.*, **272**:1237–1247.
- Kumar A., Crawford K., Close L., Madison M., Lorenz J., Doetschman T., Pawlowski S., Duffy J., Neumann J., Robbins J., Boivin G. P., O'Toole B. A. y Lessard J. L. 1997. Rescue of cardiac  $\alpha$ -actin-deficient mice by enteric smooth muscle  $\gamma$ -actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**:4406–4411.
- Kumar S., Stecher G. y Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **33**:1870–1874.
- Kustermans G., Piette J. y Legrand-Poels S. 2008. Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction. *Biochem. Pharmacol.*, **76**:1310–1322.
- Kyte J. y Doolittle R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**:105–132.
- Lacayo C. I., Pincus Z., VanDuijn M. M., Wilson C. A., Fletcher D. A., Gertler F. B., Mogilner A. y Theriot J. A. 2007. Emergence of large-scale cell morphology and movement from local actin filament growth dynamics. *PLoS Biol.*, **5**:2035–2052.

- Lee E. y Knecht D. A. 2002. Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic*, **3**:186–192.
- Letort G., Ennomani H., Gressin L., Théry M. y Blanchoin L. 2015. Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000Research*, **4**:1–11.
- Liu G., Grant W. M., Persky D., Latham V. M. J., Singer R. H. y Condeelis J. 2002. Interactions of elongation factor 1a with F-actin and b-Actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. *Mol. Biol. Cell*, **13**:579–592.
- Liu X., Li H., Deng H., Zheng C., Yan H., Chen Z., Bian A., Chen J. y Zheng K. 2019. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Babesia microti* is a plasminogen- and actin-binding protein. *Front. Vet. Sci.*, **6**:228–235.
- Liu X., Shu S., Hong M. S. S., Levine R. L. y Korn E. D. 2006. Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**:13694–13699.
- Macedo A. M., Oliveira R. P. y Pena S. D. J. 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.*, **4**:1–16.
- Maia da Silva F., Junqueira A. C. V., Campaner M., Rodrigues A. C., Crisante G., Ramirez L. E., Caballero Z. C. E., Monteiro F. A., Coura J. R., Añez N. y Teixeira M. M. G. 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol. Ecol.*, **16**:3361–3373.
- Makanai K., Kintaka R., Makino T., Kitano H. y Moriya H. 2013. Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res.*, **23**:300–311.
- May R. C. y Machesky L. M. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, **114**:1061–1077.
- Migocka-Patrzałek M., Makowiecka A., Nowak D., Mazur A. J., Hofmann W. A. y Malicka-Błaszczkiewicz M. 2015.  $\beta$ - and  $\gamma$ -Actins in the nucleus of human melanoma A375 cells. *Histochem. Cell Biol.*, **144**:417–428.
- Mishra M., Huang J. y Balasubramanian M. K. 2014. The yeast actin cytoskeleton. *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**:213–227.
- Miyamoto K. y Gurdon J. B. 2013. Transcriptional regulation and nuclear reprogramming: Roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**:3289–3302.
- Moretti N. S., Cestari I., Anupama A., Stuart K. y Schenkman S. 2018. Comparative proteomic analysis of lysine acetylation in trypanosomes. *J. Proteome Res.*, **17**:374–385.
- Mortara R. A. 1989. Studies on trypanosomatid actin I. Immunochemical and biochemical identification. *J. Protozool.*, **36**:8–13.
- Mostowy S. y Cossart P. 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**:183–194.
- Muller J., Oma Y., Vallar L., Friederich E., Poch O. y Winsor B. 2005. Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol. Biol. Cell*, **16**:5736–5748.
- Müller M., Diensthuber R. P., Chizhov I., Claus P., Heissler S. M., Preller M., Taft M. H. y Manstein D. J. 2013. Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins. *PLoS One*, **8**:e70636.
- Muñoz-Saravia S. G., Haberland A., Wallukat G. y Schimke I. 2012. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail. Rev.*, **17**:45–64.
- Murakami K., Yasunaga T., Noguchi T. Q. P., Gomibuchi Y., Ngo K. X., Uyeda T. Q. P. y Wakabayashi T. 2010. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell*, **143**:275–287.
- Murray J. W., Edmonds B. T., Liu G. y Condeelis J. 1996. Bundling of actin filaments by elongation factor 1  $\alpha$  inhibits polymerization at filament ends. *J. Cell Biol.*, **135**:1309–1321.
- Nayak R. C., Sahasrabudhe A. A., Bajpai V. K. y Gupta C. M. 2005. A novel homologue of coronin colocalizes with actin in filament-like structures in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **143**:152–164.

- Nett I. R. E., Martin D. M. A., Miranda-Saavedra D., Lamont D., Barber J. D., Mehlert A. y Ferguson M. A. J. 2009. The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**:1527–1538.
- Nogueira N. P., Saraiva F. M. S., Sultano P. E., Cunha P. R. B. B., Laranja G. A. T., Justo G. A., Sabino K. C. C., Coelho M. G. P., Rossini A., Atella G. C. y Paes M. C. 2015. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS One*, **10**:e0116712.
- Olshina M. A., Baumann H., Willison K. R. y Baum J. 2016. *Plasmodium* actin is incompletely folded by heterologous protein-folding machinery and likely requires the native *Plasmodium* chaperonin complex to enter a mature functional state. *FASEB J.*, **30**:405–416.
- Osoario-Méndez J. F., Vizcaíno-Castillo A., Manning-Cela R., Hernández R. y Cevallos A. M. 2016. Expression of profilin in *Trypanosoma cruzi* and identification of some of its ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **480**:709–714.
- Ouporov I. V., Knull H. R., Lowe S. L. y Thomasson K. A. 2001. Interactions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with G- and F-actin predicted by Brownian dynamics. *J. Mol. Recognit.*, **14**:29–41.
- Paavilainen V. O., Bertling E., Falck S. y Lappalainen P. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.*, **14**:387–394.
- Paredes A. R., Assaf Z. J., Sept D., Timofejeva L., Dawson S. C., Wang C. J. R. y Cande W. Z. 2011. An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**:6151–6.
- Park D. W., Kim S. S., Nam M. K., Kim G. Y., Kim J. y Rhim H. 2011. Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins. *BMB Rep.*, **44**:279–284.
- Percipalle P. y Vartiainen M. 2019. Cytoskeletal proteins in the cell nucleus: A special nuclear actin perspective. *Mol. Biol. Cell*, **30**:1781–1785.
- Perrin B. J. y Ervasti J. M. 2010. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton*, **67**:630–634.
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C. y Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **25**:1605–1612.
- Polge C., Heng A.-E., Jarzaguat M., Ventadour S., Claustre A., Combaret L., Béchet D., Matondo M., Uttenweiler-Joseph S., Monsarrat B., Attaix D. y Taillandier D. 2011. Muscle actin is polyubiquitinated *in vitro* and *in vivo* and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J.*, **25**:3790–3802.
- Pollard T. D. 2003. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature*, **422**:741–745.
- Pollard T. D. 2016. Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**:a018226.
- Pollard T. D. y Borisy G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**:453–465.
- Pollard T. D. y Cooper J. A. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science (80- )*, **326**:1208–1212.
- Pollard T. D. y O’Shaughnessy B. 2019. Molecular mechanism of cytokinesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **88**:661–689.
- Portman N. y Gull K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int. J. Parasitol.*, **40**:135–148.
- Portman N. y Gull K. 2012. Proteomics and the *Trypanosoma brucei* cytoskeleton: advances and opportunities. *Parasitology*, **139**:1168–1177.
- Ramsby M. y Makowski G. 2011. Differential detergent fractionation of eukaryotic cells. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **6**:337–348.

- Reiss N., Oplatka A., Hermon J. y Naor Z. 1996. Phosphatidylserine directs differential phosphorylation of actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein kinase C: possible implications for regulation of actin polymerization. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **40**:1191–1200.
- Riedl J., Crevenna A. H., Kessenbrock K., Yu J. H., Neukirchen D., Bista M., Bradke F., Jenne D., Holak T. a, Werb Z., Sixt M. y Wedlich-soldner R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *5*:605–607.
- Romero-Meza G., Vélez-Ramírez D. E., Florencio-Martínez L. E., Román-Carraro F. C., Manning-Cela R., Hernández-Rivas R. y Martínez-Calvillo S. 2017. Maf1 is a negative regulator of transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.*, **103**:452–468.
- Sahasrabuddhe A. A., Bajpai V. K. y 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.
- Sahasrabuddhe A. A., Nayak R. C. y Gupta C. M. 2009. Ancient *Leishmania* coronin (CRN12) is involved in microtubule remodeling during cytokinesis. *J. Cell Sci.*, **122**:1691–1699.
- Sasikumar A. N., Perez W. B. y Kinzy T. G. 2012. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **3**:543–555.
- Schleicher M. y Jockusch B. M. 2008. Actin: its cumbersome pilgrimage through cellular compartments. *Histochem. Cell Biol.*, **129**:695–704.
- Schmitz H. D. y Bereiter-Hahn J. 2002. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associates with actin filaments in serum deprived NIH 3T3 cells only. *Cell Biol. Int.*, **26**:155–164.
- Schmitz S., Grainger M., Howell S., Calder L. J., Gaeb M., Pinder J. C., Holder A. A. y Veigel C. 2005. Malaria parasite actin filaments are very short. *J. Mol. Biol.*, **349**:113–125.
- Schmitz S., Schaap I. A. T., Kleinjung J., Harder S., Grainger M., Calder L., Rosenthal P. B., Holder A. A. y Veigel C. 2010. Malaria parasite actin polymerization and filament structure. *J. Biol. Chem.*, **285**:36577–36585.
- Sehring I. M., Reiner C., Mansfeld J., Plattner H. y Kissmehl R. 2007. A broad spectrum of actin paralogs in *Paramecium tetraurelia* cells display differential localization and function. *J. Cell Sci.*, **120**:177–190.
- Sehring I. M., Reiner C. y Plattner H. 2010. The actin subfamily PtAct4, out of many subfamilies, is differentially localized for specific local functions in *Paramecium tetraurelia* cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **89**:509–524.
- Shawlot W., Deng J. M., Fohn L. E. y Behringer R. R. 1998. Restricted  $\beta$ -galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the  $\beta$ -actin locus and embryonic lethality of  $\beta$ -actin mutant mice. *Transgenic Res.*, **7**:95–103.
- Shmerling D., Danzer C. P., Mao X., Boisclair J., Haffner M., Lemaistre M., Schuler V., Kaeslin E., Korn R., Bürki K., Ledermann B., Kinzel B. y Müller M. 2005. Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the  $\beta$ -actin locus by Cre/lox cassette replacement. *Genesis*, **42**:229–235.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D. y Higgins D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, **7**:539.
- Singh K., Veluru N. K., Trivedi V., Gupta C. M. y Sahasrabuddhe 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.
- Skalický T., Dobáková E., Wheeler R. J., Tesařová M., Flegontov P., Jirsová D., Votýpka J., Yurchenko V., Ayala F. J. y Lukeš J. 2017. Extensive flagellar remodeling during the complex life cycle of *Paratrypanosoma*, an early-branching trypanosomatid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**:11757–11762.
- Skillman K. M., Diraviyam K., Khan A., Tang K., Sept D. y Sibley L. D. 2011. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.*, **7**:e1002280.

- Šlajcherová K., Fišerová J., Fischer L. y Schwarzerová K. 2012. Multiple actin isoforms in plants: Diverse genes for diverse roles? *Front. Plant Sci.*, **3**:226.
- Souza L. C. K., Gonçalves Pinho R. E. G., de Paula Lima C. V., Perdigão Fragoso S. y José Soares M. 2013. Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **108**:631–636.
- Stadler C., Rexhepaj E., Singan V. R., Murphy R. F., Pepperkok R., Uhlén M., Simpson J. C. y Lundberg E. 2013. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nat. Methods*, **10**:315–323.
- Stemp M. J., Guha S., Hartl F. U. y Barral J. M. 2005. Efficient production of native actin upon translation in a bacterial lysate supplemented with the eukaryotic chaperonin TRiC. *Biol. Chem.*, **386**:753–757.
- Sternlicht H., Farr G. W., Sternlicht M. L., Driscoll J. K., Willison K. y Yaffe M. B. 1993. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**:9422–9426.
- Takeda S., Minakata S., Koike R., Kawahata I., Narita A., Kitazawa M., Ota M., Yamakuni T., Maéda Y. y Nitani Y. 2010. Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation-steric and allosteric inhibition. *PLoS Biol.*, **8**:e1000416.
- Tao H., Liu W., Simmons B. N., Harris H. K., Cox T. C. y Massiah M. A. 2010. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques*, **48**:61–64.
- Terman J. R. y Kashina A. 2013. Post-translational modification and regulation of actin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**:30–38.
- Tielens A. G. M. y van Hellemond J. J. 2009. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol.*, **25**:482–490.
- Tristan C., Shahani N., Sedlak T. W. y Sawa A. 2011. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell. Signal.*, **23**:317–323.
- Tsigankov P., Gherardini P. F., Helmer-Citterich M., Späth G. F. y Zilberstein D. 2013. Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. *J. Proteome Res.*, **12**:3405–3412.
- Vallin J. y Grantham J. 2019. The role of the molecular chaperone CCT in protein folding and mediation of cytoskeleton-associated processes: implications for cancer cell biology. *Cell Stress Chaperones*, **24**:17–27.
- Varland S., Vandekerckhove J. y Drazic A. 2019. Actin post-translational modifications: the Cinderella of cytoskeletal control. *Trends Biochem. Sci.*, **44**:502–516.
- Vazquez M. P. y Levin M. J. 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 $\beta$  gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*, **239**:217–225.
- Velle K. B. y Fritz-Laylin L. K. 2019. Diversity and evolution of actin-dependent phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **59**:40–48.
- Vidal J. C. y De Souza W. 2017. Morphological and functional aspects of cytoskeleton of Trypanosomatids. In: *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*. p. 55–71.
- Waelkens E., Gettemans J., De Corte V., De Ville Y., Goris J., Vandekerckhove J. y Merlevede W. 1995. Microfilament dynamics: regulation of actin polymerization by actin-fragmin kinase and phosphatases. *Adv. Enzyme Regul.*, **35**:199–227.
- Waldo G. S., Standish B. M., Berendzen J. y Terwilliger T. C. 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, **17**:691–695.
- Wesseling J. G., Smits M. A. y Schoenmakers J. G. G. 1988. Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**:143–154.

- Wesseling J. G., Snijders P. J. F., van Someren P., Jansen J., Smits M. A. y Schoenmakers J. G. G. 1989. Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **35**:167–176.
- Wetzel D. M., Håkansson S., Hu K., Roos D. y Sibley L. D. 2003. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol. Biol. Cell*, **14**:396–406.
- Woods A., Sherwin T., Sasse R., MacRae T. H., Baines A. J. y Gull K. 1989. Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.*, **93**:491–500.
- Yang F., Demma M., Warren V., Dharmawardhane S. y Condeelis J. 1990. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a. *Nature*, **347**:494–496.
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J. y Zhang Y. 2015. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, **12**:7–8.
- Zingales B., Miles M. A., Campbell D. A., Tibayrenc M., Macedo A. M., Teixeira M. M. G., Schijman A. G., Llewellyn M. S., Lages-Silva E., Machado C. R., Andrade S. G. y Sturm N. R. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.*, **12**:240–253.



## XI. APÉNDICES

### Apéndice 1. Ortólogos de las actinas 1, 2, 3 y 4 de *T. cruzi*.

**Tabla 5.** Secuencias ortólogas de las actinas TcAct1-4 de *T. cruzi*. Secuencias identificadas en los genomas de los tripanosomátidos anotados en TriTrypDB, que se usaron para la construcción del árbol filogenético.

Organismo	ID TriTryp			
	ACTINA 1	ACTINA 2	ACTINA 3	ACTINA 4
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TcCLB.510571.30 (No-E)	TcCLB.507129.10 (E)	TcCLB.510945.30	TcCLB.503841.40 (E)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_00036	TRSC58_02602	TRSC58_05355	
<i>Trypanosoma grayi</i>	DQ04_00531190	DQ04_00521160	DQ04_02581080	DQ04_04421030
<i>Trypanosoma theileri</i>	TM35_000351080	TM35_000171030	TM35_000431540	TM35_000421240
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.9.8850			
<i>Trypanosoma congolense</i>	TcIL3000_0_09560			
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.9.6310			
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0903650			
<i>Leishmania major</i>	LMJLV39_040018100			LMJSD75_350013000
<i>Leishmania mexicana</i>	LmxM.04.1230			LmxM.34.0790
<i>Leishmania panamensis</i>	LPAL13_040019300			LPAL13_340012700
<i>Leishmania donovani</i>	LdBPK_041250.1			LdBPK_350810.1
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.04.1250			LinJ.35.0810
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_040020500			LbrM.34.0780
<i>Leishmania tropica</i>	LTRL590_040017500			LTRL590_350012800
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	LpyrH10_24_1370			LpyrH10_01_2480
<i>Blechnomonas ayalai</i>	Baya_369_0010*			Baya_010_0230
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_030022500			CFAC1_240033500
<i>Endotrypanum monterogei</i>	EMOLV88_040017200			
<i>Paratrypanosoma confusum</i>	PCON_0067890	PCON_0016600	PCON_0080190	PCON_0019270
<i>Bodo saltans</i>	BSAL_45355	BSAL_58450	BSAL_10095	BSAL_07330
<i>Euglena gracilis</i>	AAC99646.1**			
<i>Homo sapiens</i> ActB	AAH16045.1**			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_116614.1**			

\*\* ID de la base de datos del GenBank; \*, la secuencia está incompleta y no se usó en la construcción del árbol filogenético; E, alelo tipo Esmeraldo; No-E, alelo no-Esmeraldo

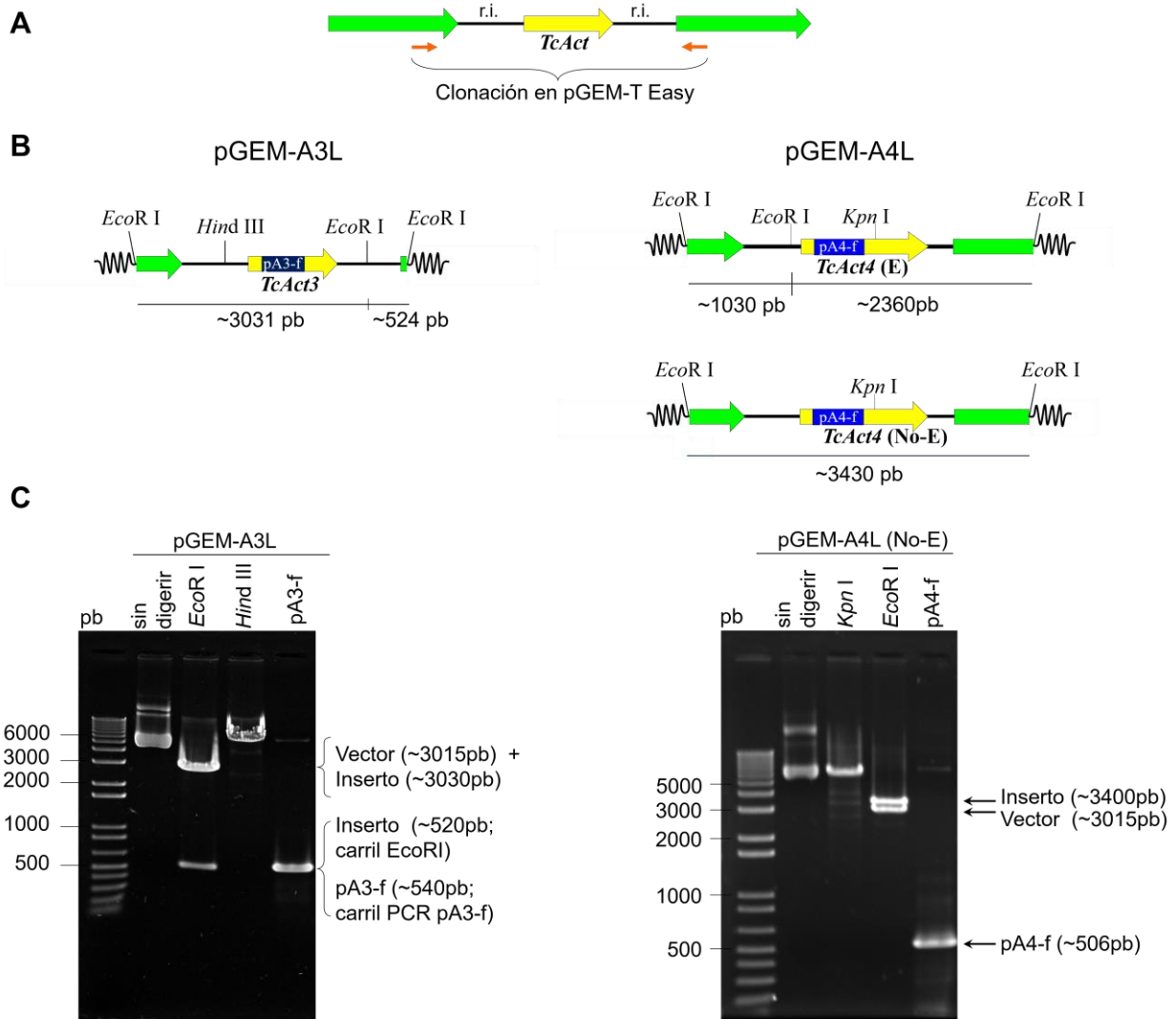
## Apéndice 2. Oligonucleótidos usados para clonar y expresar las actinas de *T. cruzi*, y otros plásmidos usados.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos usados para la amplificación de secuencias específicas de actina a partir de una biblioteca de cDNA

Gen amplificado	Secuencia oligonucleótido <sup>a</sup>	Sentido	Observaciones
miniexón	5'-CGCTATTATTGATACAGTTTCTG-3'	F	Específico para la secuencia líder o miniexón (ME)
<i>TcAct1</i>	5'-GTGGGATCCCTAAAAGCATTTGTTGTGC-3'	R	Usado en combinación con ME (PCR1)
<i>TcAct2</i>	5'-GAATTCTACTTGGAGACAAAAGTGGAGG-3'	R	Usado en combinación con ME (PCR1)
<i>TcAct3</i>	5'-GAATTC CTAATCCCCTCCTCGGCAAC-3'	R	Usado en combinación con ME (PCR1)
<i>TcAct4</i>	5'-GAATTC TTAGCCACACGGCGGTTGT-3'	R	Usado en combinación con ME (PCR1)
<i>TcAct1</i>	5'-TTGGCCGACCAAAGAACGAG-3'	F	Usados para hacer el PCR anidado
	5'-TGGCACTGTTGTCACCTC-3'	R	
<i>TcAct2</i>	5'-GCAGCAGCAGCAGTCAGCGTG-3'	F	Usados para hacer el PCR anidado
	5'-ATCCTCTCCGCCGCTGTAG-3'	R	
<i>TcAct3</i>	5'-CGTGCCGGCAAAGAAGATGG-3'	F	Usados para hacer el PCR anidado
	5'-CACCGTTAGCCTATCCTGCGG-3'	R	
<i>TcAct4</i>	5'-GATGCGATGTGGTGTCTGTGG-3'	F	Usados para hacer el PCR anidado
	5'-ATACCCATTACCCTACCAGG-3'	R	

**Tabla 7.** Oligonucleótidos usados para clonar secuencias codificadoras de las actinas 3 y 4. Oligonucleótidos usados para clonar secuencias codificadoras de las actinas 3 y 4, y las regiones intergénicas (r.i.) que las flanquean. Los productos de amplificación se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy.

Gen amplificado	Secuencia oligonucleótido	Sentido	Observaciones
<i>TcAct3</i> + r.i.	5'-GATCGATGCTCCATGGACAGT-3'	F	Usados para clonar la región codificadora de actina 3 junto con las regiones intergénicas que la flanquean
	5'-CAAGCAGACGTATGTTCTC-3'	R	
<i>TcAct4</i> + r.i.	5'-GATGTCATCACGGAGCTACTG-3'	F	Usados para clonar la región codificadora de actina 4 junto con las regiones intergénicas que la flanquean
	5'-CAGCATCTTGTAGCTGCAC-3'	R	



**Figura 31. Clonación de los genes de actina 3 y 4, con sus regiones intergénicas, en el vector pGEM-T.** A) Esquema general de la región amplificada a partir del genoma de *T. cruzi*, indicando el anclaje aproximado de los oligonucleótidos (flechas naranjas) en las regiones codificantes de genes río arriba y río abajo (flechas verdes) del gen de actina correspondiente (flecha amarilla). B) Esquemas de las regiones que se amplificaron y clonaron en el vector pGEM-T Easy. Hay dos alelos anotados para el gen de TcAct4; sólo hay un alelo anotado para TcAct3. La presencia del inserto de interés se evaluó por el patrón de digestión y por amplificación por PCR de un fragmento específico de cada actina (indicado en azul); se indican los sitios de restricción de las enzimas usadas y el tamaño de los productos de la digestión esperados. En actina 3 se espera la linearización del plásmido al digerir con la enzima *Hin* dIII y la liberación del inserto (en dos fragmentos) con *EcoR* I. En actina 4, el patrón de digestión con *EcoR* I ayudará a determinar el alelo clonado: para el alelo No-E (No-Esmeraldo) se espera la liberación del inserto, para el alelo E (Esmeraldo) se observará el inserto en dos fragmentos; ambos alelos se linearizarán usando la enzima *Kpn* I. C) Geles de agarosa mostrando los patrones de digestión obtenidos y la amplificación de los productos de PCR. Los esquemas no están a escala.

**Tabla 8.** Oligonucleótidos usados para generar proteínas de fusión con EGFP en el extremo N-terminal de las actinas (EGFP-TcActinas). Se usó el vector pTEX, para su expresión en *T. cruzi*.

Gen amplificado	Secuencia oligonucleótido <sup>a</sup>	Sentido	Observaciones
EGFP	5'- <u>GGATCC</u> CATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'	F	Amplificación de EGFP, para clonar en fase en el extremo N-terminal de las actinas
	5'- <u>GAATTC</u> CCTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'	R <sup>b</sup>	
<i>TcAct1</i>	5'- <u>GAATTC</u> <b><i>GCTGCCGAGCGGCGGCAGCCGCTG</i></b> <b><i>CAGCA</i></b> ATGTCTGACGAAGAACAGTCCGC-3'	F	Usados para expresar TcAct1 como proteína de fusión con EGFP (EGFP-TcAct1)
	5'- <u>CTCGAG</u> CTAAAAGCATTTGTTGTGCACAATG-3'	R	
<i>TcAct2</i>	5'- <u>GAATTC</u> <b><i>GCTGCCGAGCGGCGGCAGCCGCTG</i></b> <b><i>CAGCA</i></b> ATGGAGGCAACATTGTGGGATGAAG-3'	F	Usados para expresar TcAct2 como proteína de fusión con EGFP (EGFP-TcAct2)
	5'- <u>CTCGAG</u> CTACTTGGAGACAAAAGTGGGGAG TCG-3'	R	
<i>TcAct3</i>	5'- <u>GAATTC</u> <b><i>GCTGCCGAGCGGCGGCAGCCGCTG</i></b> <b><i>CAGCA</i></b> ATGATCATCGTGGACTTTGGGTCTTC-3'	F	Usados para expresar TcAct3 como proteína de fusión con EGFP (EGFP-TcAct3)
	5'- <u>CTCGAG</u> CTACTCCCTCCTTCGGCAACATCA CTG-3'	R	
<i>TcAct4</i>	5'- <u>GAATTC</u> <b><i>GCTGCCGAGCGGCGGCAGCCGCTGC</i></b> <b><i>AGCA</i></b> ATGCAAAGTACCATCGTGCTGGATGCCG-3'	F	Usados para expresar TcAct4 como proteína de fusión con EGFP (EGFP-TcAct4)
	5'- <u>CTCGAG</u> TTAGCCACACGGCGGTTGTGCAG TG-3'	R	

<sup>a</sup> la secuencia codificadora para el brazo de 10 Ala se muestra en cursiva y negritas; los sitios de restricción adicionales se muestran subrayados

<sup>b</sup> se usó el oligonucleótido para eliminar el codón de paro.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos usados para generar proteínas de fusión con EGFP en el extremo C-terminal de las actinas (TcActinas-EGFP). Se usó el vector pTREXn<sup>a</sup>, para su expresión en *T. cruzi*.

Gen amplificado	Secuencia oligonucleótido <sup>b,c</sup>	Sentido	Observaciones
<i>TcAct1</i>	5'- <u>GAATTC</u> ATGTCTGACGAAGAAGTCCGC-3'	F	Usados para expresar TcAct1 como proteína de fusión con EGFP (TcAct1-EGFP)
	5'- <u>GGATCC</u> GCAAAGCATTGTTGTGCACAATG-3'	R	
<i>TcAct2</i>	5'- <u>GAATTC</u> ATGGAGGCAACATTGTGGGATGA AG-3'	F	Usados para expresar TcAct2 como proteína de fusión con EGFP (TcAct2-EGFP)
	5'- <u>GGATCC</u> GCCTTGGAGACAAAAGTGGGGAG-3'	R	
<i>TcAct3</i>	5'- <u>GAATTC</u> ATGATCATCGTGGACTTTGGGTCTTC-3'	F	Usados para expresar TcAct3 como proteína de fusión con EGFP (TcAct3-EGFP)
	5'- <u>GGATCC</u> GCCTCCCTCCTTCGGCAACATCA CTG-3'	R	
<i>TcAct4</i>	5'- <u>GAATTC</u> ATGCAAAGTACCATCGTGCTGGATG CCG-3'	F	Usados para expresar TcAct4 como proteína de fusión con EGFP (TcAct4-EGFP)
	5'- <u>GGATCC</u> AAGCCACACGGCGGTTGTGCA GTG-3'	R	

<sup>a</sup> donado amablemente por la Dra. Rebeca Manning-Cela

<sup>b</sup> los sitios de restricción adicionales se muestran subrayados

<sup>c</sup> se usaron los oligonucleótidos reversos (R) para eliminar el codón de paro

**Tabla 10.** Oligonucleótidos usados para generar proteínas de fusión de las actinas con GST (GST-TcActinas) expresadas en bacterias *E. coli*. Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se subclonaron en el vector pGEX-3X.

Gen amplificado	Secuencia oligonucleótido <sup>a</sup>	Sentido	Observaciones
<i>TcAct2</i>	5'- <u>GGATCCC</u> CATGGAGGCAACATTGTGGG-3'	F	Usados para expresar TcAct2 como una proteína de fusión con GST (GST-TcAct2)
	5'- <u>GAATTCT</u> ACTTGGAGACAAAAGTGGAGG-3'	R	
<i>TcAct3</i>	5'- <u>GGATCCC</u> CATGATCATCGTGGACTTTGG-3'	F	Usados para expresar TcAct3 como una proteína de fusión con GST (GST-TcAct3)
	5'- <u>GAATTC</u> CTACTCCCCTCCTTCGGCAAC-3'	R	
<i>TcAct4</i>	5'- <u>GGATCCC</u> CATGCAAAGTACCATCGTGCTG-3'	F	Usados para expresar TcAct4 como una proteína de fusión con GST (GST-TcAct4)
	5'- <u>GAATTC</u> TTAGCCACACGGCGGTTGT-3'	R	

<sup>a</sup> los sitios de restricción adicionados se muestran subrayados

**Tabla 11.** Plásmidos utilizados como controles

Plásmido	Observaciones
pTEX-EGFP	Usado para expresar EGFP en <i>T. cruzi</i> , clonado en el vector pTEX. Previamente obtenido en el laboratorio (Guerrero-Sánchez et al., 2015).
pTREN-EGFP	Usado para expresar EGFP en <i>T. cruzi</i> , clonado en el vector pTREN. Proporcionado por la Dra. Rebeca Manning-Cela
pGEX-3X	Plásmido comercial, para expresar la etiqueta GST

### Apéndice 3. Comparación de secuencias de aminoácidos.

```

TcAct2-NoE      MEATLWDEEPAVVLNDSGNKICGFAGEEI PRCVFP SVTGVS MNIRSSGSSSSQ RVVYVD 60
TcAct2-E       MEATLWDEEPAVVLNDSGNKICGFAGEEI PRCVFP SVTGVS MNIRSSGSSSSQ RVVYVD 60
*****

TcAct2-NoE      EALQEKGLRYFYPMEHGIVFDWDQMERVVRHAYEQLRVPPERQAVLLTEAPLNPI SNREK 120
TcAct2-E       EALQEKGLRYFYPMEHGIVSDWDQMERVVRHAYEQLRVPPERQAVLLTEAPLNPI SNREK 120
*****

TcAct2-NoE      MAETLFESFGVPALHVQIQAVLTLYSSGRTDGLVLDSGDGVTHLVPVFEGQTMPQSVRRL 180
TcAct2-E       MAETLFESFGVPALHVQIQAVLTLYSSGRTDGLVLDSGDGVTHLVPVFEGQTMPQSVRRL 180
*****

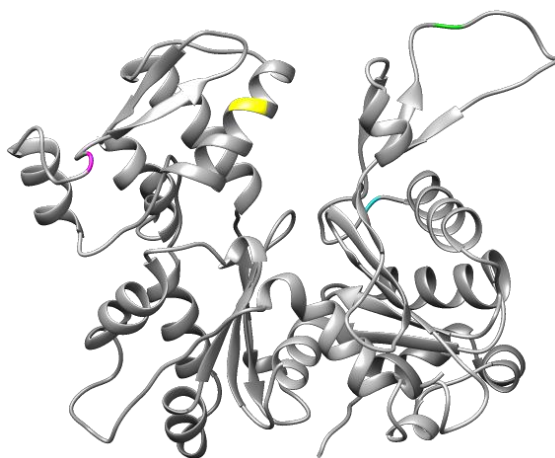
TcAct2-NoE      ELAGRDLTEWMMELLSDELDRPFTTSADREIARRVKESLCYIPLFFEEELQAAEEDGINE 240
TcAct2-E       ELAGRDLTEWMMELLSDELDRPFTTSADREVARRVKESLCYIPLFFEEELQAAEEDGINE 240
*****

TcAct2-NoE      DVKGKEPFTLPDGEVIHVGRARFCCPEILFNPALAEKPYDGIQHAVINCVNSCPIDLRQ 300
TcAct2-E       DAKGKEPFTLPDGEVIHVGRARFCCPEILFNPALAEKPYDGIQHAVINCVNSCPIDLRQ 300
*****

TcAct2-NoE      LLGSIVLSGGNTMFKGMQQRLOSELAALANKRAEDVRVVAASERKFSVWIGAAI LASLT 360
TcAct2-E       LLGSIVLSGGNTMFKGMQQRLOSELAALANKRAEDVRVVAASERKFSVWIGAAI LASLT 360
*****

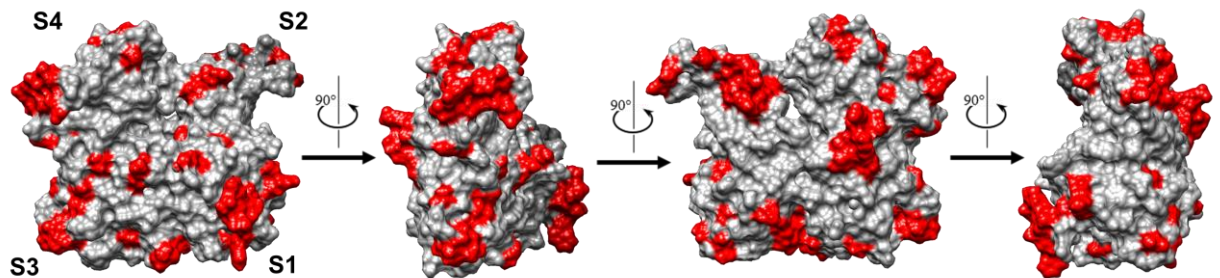
TcAct2-NoE      SFASEWITRTEYAEQGAAVLHKRCDLSLFSVSK 392
TcAct2-E       SFASEWITRTEYAEQGAAVLHKRCDLSLFSVSK 392
*****

```



**Figura 32. Comparación de las secuencias de aminoácidos de los alelos E y No-E de TcAct2.** Los genes que codifican para TcAct2 son TcCLB.507129.10 (E) y TcCLB.507969.50 (No-E), con 98.6% de identidad entre ellos; las secuencias traducidas de aminoácidos sólo presentan cuatro diferencias (98.98% de identidad). Arriba: alineamiento de los alelos E y No-E de TcAct2, resaltando las cuatro diferencias en residuos de aminoácidos en diferentes colores. El significado de los símbolos del consenso es el dado por Clustal Omega (\* residuo conservado; : residuo con propiedades muy similares; · residuos con propiedades ligeramente similares) Abajo: estructura terciaria teórica de TcAct2, en donde se muestra la ubicación de los residuos de aminoácidos diferentes, conservando el mismo código de color que en el alineamiento.

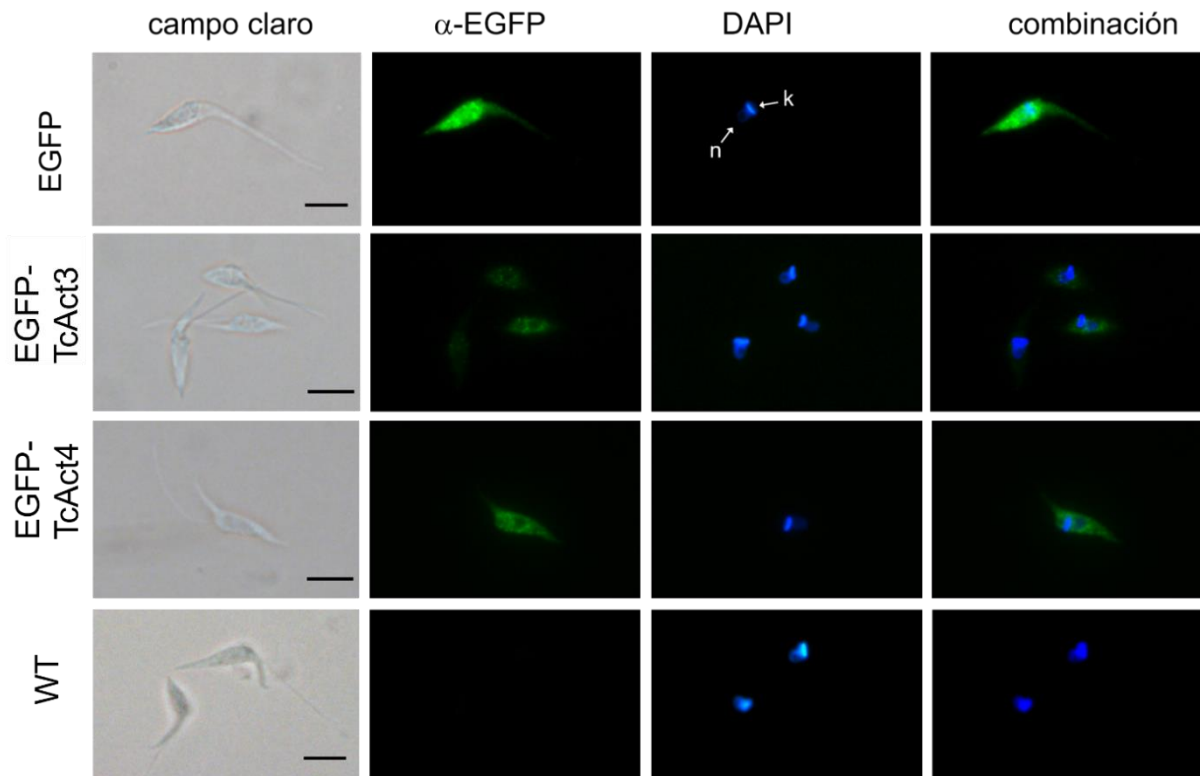
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	
TcruziAct1	----MSDEEQSAIVCDNGSGMVKAGFSGDDAPRHVFPISIVGRPKNEQAMMGSASKKLFVGD		57
TcruziAct2	MEATLWDEE-FAVVIDNGSGNLIKCGFAGEEIPRCVFPSPVTGVSMNTRSSGSSSSQSRVYVGD		60
	*** :*: ***** :*.***:*. : ** *****:.* * :. :*.***:***		
	<b>S1</b>		
TcruziAct1	EAQAKRGVLSLKYPIDIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVNPESHVLLTEAPMNPQNR		117
TcruziAct2	EALQEKGL-RYFYPMIEHGIVSDWDQMERVWRHA-YEQLRVPEEQAVLLTEAPLNPISNR		118
	** :*:* **:* *****:***:***:***: * :*:*** ** :*:*****:*** **		
	<b>S3</b>		
TcruziAct1	EKMTQIMFETFGVPAMYVGIQAVLSLYSSGRTTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAIR		177
TcruziAct2	EKMAEILFESFGVPALHVQIQAVLTLYSSGRTDGLVLDSGDGVTHIVPVFEGQTMPQSVR		178
	***:.* :*.***:***:.* *****:***** *:*:*:***** **:*:* :*:*:.*		
	<b>S4</b>		
TcruziAct1	RMDMAGRDLTEYLMKLLME-SGMTFTTSAEKEIVRNVKEQLCYVALDFDEEVTNSA----		232
TcruziAct2	RLELAGRDLTEWMMELLSDELDRPFTTSADREVARRVKESLCYIPLFEFEELQAAEEDGI		238
	*:*:*****:*.*** : . *****:*.*. * .***.***: * *:*:* :		
	<b>S3</b>		
TcruziAct1	--KTVNEEPFELPDGTIMQVGNQRFRCPEALFKPMLIGLDEAPGFHEMTFQSINKCDIDV		290
TcruziAct2	NEDAKGKEPFLPDGEVIHVGRARFCPEILFNPLAEK-PYDGIQHAVINCNSCIDL		297
	.: :*** ***** :*:*.* ** ** ** *** * * * * * :*:. :*:. :*.* **:		
	<b>S1</b>		
TcruziAct1	RRDLYGNIVLSGGTTMFKNLPERLGKEISNLAPSSI--KPKVVAPPERKYSVWIGGSILS		348
TcruziAct2	RRQLGSIIVLSGGNTMFKGMQRLQSELAALANKRAEDVVRVVAASERKFSVWIGAAILA		357
	**:* * .*****.*****: :*.* :*:* ** . . :*** *****:***:***:		
TcruziAct1	SLTTFQTMWIKKSEYDEAGPSIVHNKCF----- 376		
TcruziAct2	SLTSFASLWITRTEYAEQGNVAVLHKRCDLSLFSVSK 392		
	***:* : **:*:* * * :*:*:.*		



**Figura 33.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de TcAct1 y TcAct2. Arriba: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las actinas 1 y 2 de *T. cruzi*. Las líneas en distintos tonos de azul ubicadas sobre las secuencias delimitan los subdominios (S1 a S4) de las proteínas. El significado de los símbolos del consenso es el dado por Clustal Omega (\* residuo conservado; : residuo con propiedades muy similares; · residuos con propiedades ligeramente similares); los residuos no conservados en la secuencia de TcAct2 (con respecto a TcAct1) se resaltan en rojo. Se observa que las diferencias y similitudes se encuentran distribuidas a lo largo de la secuencia, sin concentrarse en un dominio específico. Abajo: Modelo teórico de la estructura 3D de TcAct2, obtenido con I-TASSER, donde se indican los residuos no conservados (rojo), con respecto a TcAct1. Se observa que dichos residuos se localizan en la superficie de la proteína.

#### Apéndice 4. Expresión de TcActinas fusionadas a EGFP.

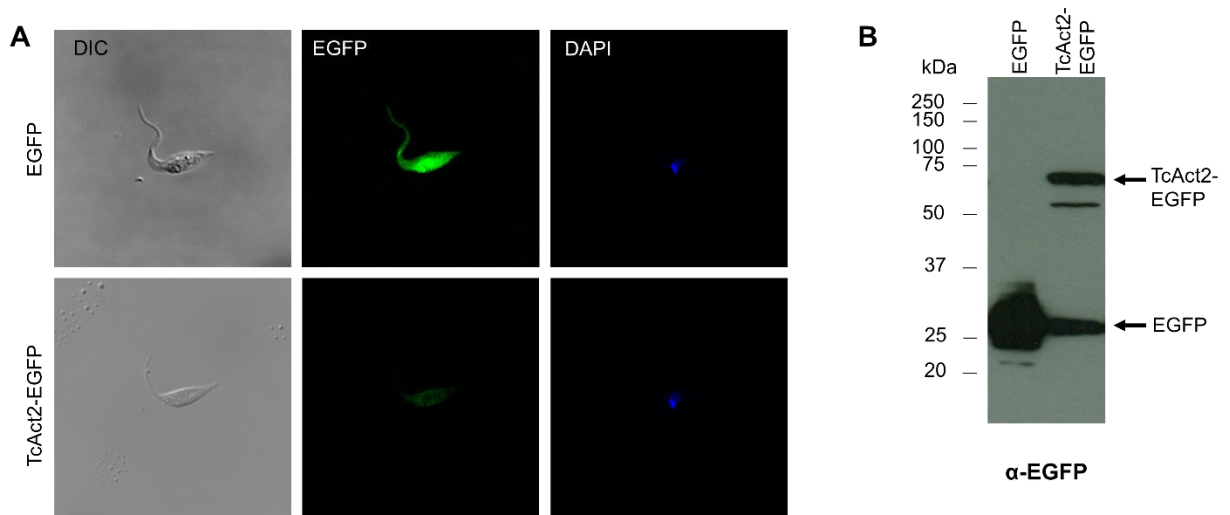
Las actinas 3 y 4 se fusionaron por su extremo N-terminal a EGFP (EGFP-TcAct3 y EGFP-TcAct4, respectivamente) y expresadas en epimastigotes usando el vector pTEX, sin que se observara fluorescencia. Por tal motivo, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo comercial anti-EGFP.



**Figura 34. Expresión de EGFP-TcActinas en parásitos transfectados.** Ensayos de inmunofluorescencia usando anti-EGFP (1:100) para detectar las proteínas de fusión EGFP-TcAct3 y EGFP-TcAct4. El patrón de distribución es similar al que se observó para las fusiones de las actinas 1 y 2 (Figura 18). Se usó DAPI para teñir los ácidos nucleicos. WT, cepa silvestre; n, núcleo; k, cinetoplasto. Barra= 5  $\mu$ m.



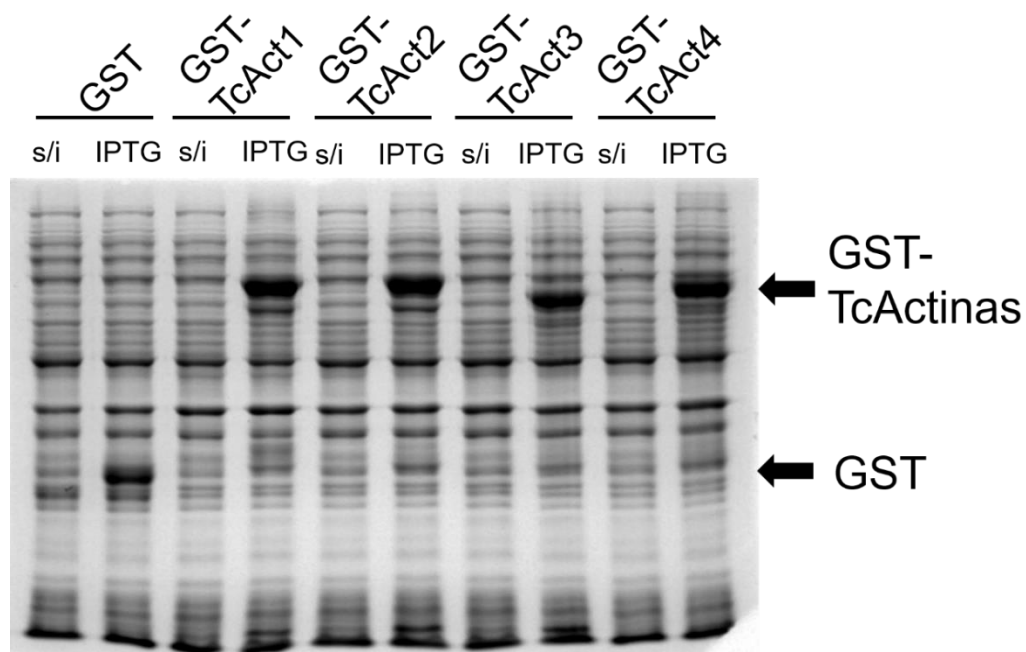
La actina TcAct2 se fusionó por su extremo C-terminal a la proteína EGFP (TcAct2-EGFP) y se expresó en epimastigotes usando el vector pTREXn.



**Figura 35. Expresión de TcAct2-EGFP.** A) Detección de fluorescencia en parásitos transfectados que expresan EGFP o TcAct2-EGFP. B) Inmunotransferencia de lisados de parásitos transfectantes incubados con el anticuerpo comercial anti-EGFP.

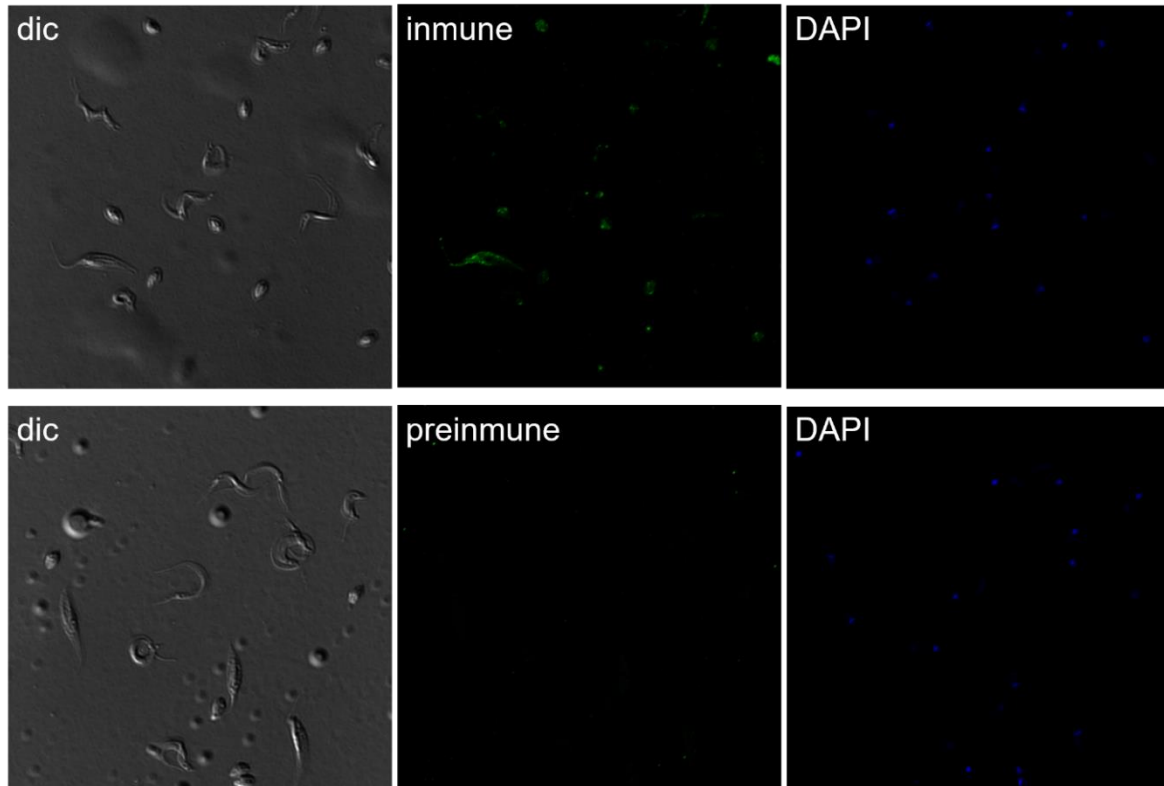
## Apéndice 5. Expresión de las actinas recombinantes fusionadas a GST.

Las cuatro actinas de *T. cruzi* (TcAct1-TcAct4) se expresaron como proteínas de fusión con la etiqueta GST. Las proteínas GST-TcAct3 y GST-TcAct4 se usaron como controles en algunos experimentos de esta tesis.



**Figura 36. TcActinas recombinantes fusionadas a GST.** Gel de poliacrilamida mostrando lisados bacterianos antes y después de la inducción de las proteínas recombinantes con IPTG. s/i, sin inducir; IPTG, inducido con IPTG.

## Apéndice 6. Especificidad del suero inmune anti-TcAct2.



**Figura 37. Especificidad del suero inmune anti-TcAct2.** Inmunofluorescencias en una mezcla de estadios de *T. cruzi* (epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes) usando el suero inmune anti-TcAct2 y el suero preinmune correspondiente. EL DNA es visualizado mediante tinción con DAPI.

## Apéndice 7. Proteínas que se identificaron en los ensayos de co-precipitación.

Usando la proteína recombinante GST-TcAct1 como carnada:

- Se identificaron 85 secuencias en un total de tres ensayos de co-precipitación
- Se excluyeron todas las secuencias que también salieron en los controles
- Se consideró sólo una secuencia representativa por familia multigénica (en caso de que hubiera más de una secuencia)
- Se consideraron sólo las secuencias que tuvieran un nivel de confianza de 95%

El número final de proteínas fue de 11, de las cuales cinco se detectaron en dos o más ensayos (Tabla 12).

**Tabla 12.** Lista de proteínas que interactuaron con TcAct1, después de aplicar los criterios de selección. Las proteínas que se detectaron en dos o más ensayos se presentan en negritas. Se indica el número de péptidos y % de cubrimiento obtenidos en cada ensayo, separados por diagonales.

	No. Acceso TriTrypDB	Proteína identificada	No. Ensayos (n=3)	No. Péptidos	% cubrimiento
1	TcCLB.506297.190	<b>pyruvate phosphate dikinase (PPDK)</b>	3	45/30/ 32	40/24/ 35
2	TcCLB.506943.50	<b>glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)</b>	2	9/7	28/8
3	TcCLB.511369.30	<b>elongation factor 1 alpha (EF1a)</b>	2	5/3	21/20
4	TcCLB.509695.200	<b>T complex polypeptide 1 (TCP1)</b>	2	10/9	23/20
5	TcCLB.506139.200	<b>retrotransposon hot spot (RHS)</b>	2	16/7	27/16
6	TcCLB.511585.190	eukaryotic initiation factor 4a	1	7	20
7	TcCLB.509755.20	hypothetical protein	1	6	33
8	TcCLB.507029.30	heat shock 70 kDa protein mitochondrial precursor	1	10	24
9	TcCLB.507689.40	glutamamyl carboxypeptidase	1	9	325
10	TcCLB.509419.40	trans sialidase Group V putative protein	1	14	24
11	TcCLB.509967.170	dynein arm light chain	1	3	15

Usando la proteína recombinante GST-TcAct2 como carnada:

- Se identificaron 145 secuencias en un total de cinco ensayos de co-precipitación
- Se excluyeron todas las secuencias que también salieron en los controles
- Se consideró sólo una secuencia representativa por familia multigénica (en caso de que hubiera más de una secuencia)
- Se consideraron sólo las secuencias que tuvieran un nivel de confianza de 95%

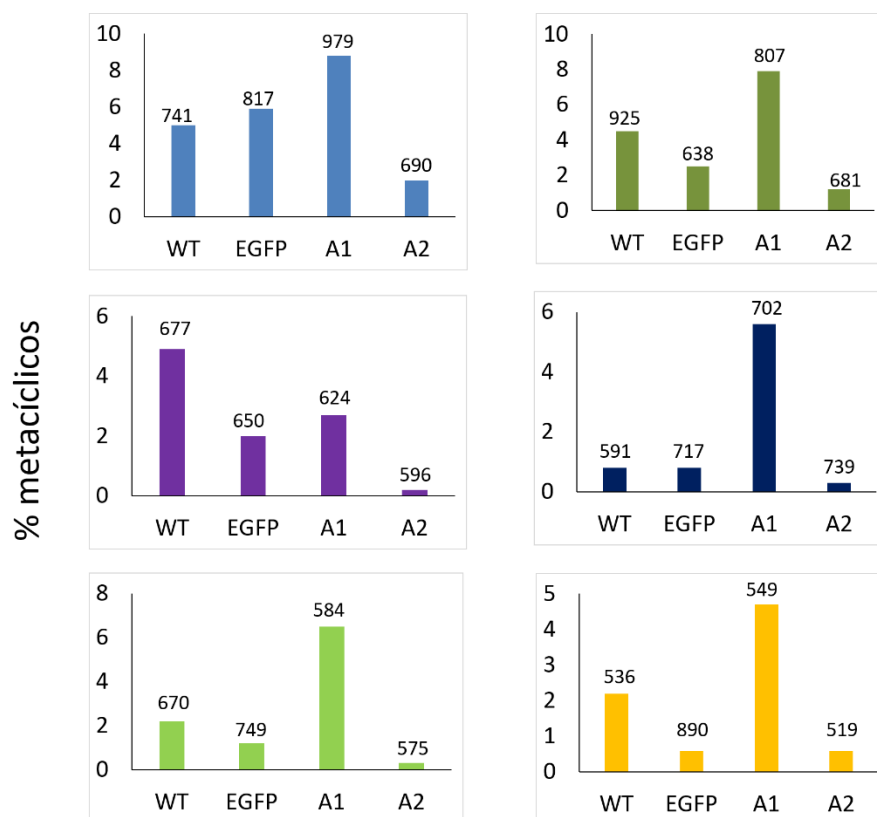
El número final de proteínas fue de 21, de las cuales seis se detectaron en dos o más ensayos (Tabla 13).

**Tabla 13.** Lista de proteínas que interactuaron con TcAct2, después de aplicar los criterios de selección. Las proteínas que se detectaron en dos o más ensayos se presentan en negritas. Se indica el número de péptidos y % de cubrimiento obtenidos en cada ensayo, separados por diagonales.

	No. Acceso TriTrypDB	Proteína identificada	No. Ensayos (n=5)	No. Pépti- dos	% cubri- miento
1	TcCLB.506943.50	<b>glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)</b>	4	13/9/ 9/15	46/29/ 27/31
2	TcCLB.506297.190	<b>pyruvate phosphate dikinase (PPDK)</b>	3	35/48/ 18	33/37/ 17
3	TcCLB.507641.290	<b>chaperonin HSP60 mitochondrial precursor</b>	3	14/30/ 9	31/41/ 15
4	TcCLB.506211.160	<b>ADP ATP carrier protein 1 mitochondrial</b>	3	8/7/8	20/18/19
5	TcCLB.509429.320	<b>cysteine peptidase</b>	2	4/3	9/11
6	TcCLB.508257.30	hypothetical protein	1	5	32
7	TcCLB.509695.200	T complex protein 1 delta subunit putative pr	1	7	20
8	TcCLB.511019.13	retrotransposon hot spot (RHS)	1	15	22
9	TcCLB.511585.190	eukaryotic initiation factor 4a	1	13	27
10	TcCLB.507029.30	heat shock 70 kDa protein mitochondrial	1	25	37
11	TcCLB.508973.30	NUDIX family hydrolase	1	5	5
12	TcCLB.506959.30	ATP dependent DEAD H RNA helicasa	1	11	28
13	TcCLB.507689.40	glutamamyl carboxypeptidase putative metallo peptidasa	1	13	36
14	TcCLB.506519.130	guanosine monophosphate reductase putative protein	1	5	14
15	TcCLB.510507.20	3 ketoacyl CoA thiolase putative protein length	1	7	24
16	TcCLB.507147.10	dispersed gene family protein 1 DGF 1 putative protein	1	1	18
17	TcCLB.506357.40	Elongation factor Tu mitochondrial putative	1	11	21
18	TcCLB.509127.110	hypothetical protein conserved protein length 42	1	11	32
19	TcCLB.510475.30	hypothetical protein protein length 136	1	5	46
20	TcCLB.508179.30	hypothetical protein conserved protein length 10	1	22	19
21	TcCLB.508257.190	hypothetical protein conserved protein lengt	1	8	26

## Apéndice 8. Ensayos de metaciclogénesis.

Tras la inducción de la metaciclogénesis, se hicieron preparaciones de parásitos fijados en portaobjetos y se tiñeron con HEMA3. Se contó en ciego la cantidad de parásitos completamente transformados. Se incluyeron parásitos de la cepa silvestre (WT) y que expresaban solamente la proteína EGFP como controles. Se realizó un total de seis ensayos independientes.



**Figura 38. Ensayos de metaciclogénesis.** Porcentaje de tripomastigotes metacíclicos obtenidos tras la inducción de metaciclogénesis en epimastigotes control (cepa silvestre y parásitos transfectantes que expresan EGFP) y en epimastigotes transfectantes que expresan EGFP-TcAct1 y EGFP-TcAct2. Se hicieron seis ensayos independientes. Cada gráfica corresponde a un ensayo. Encima de las barras se indica el número total de parásitos contados en cada caso. WT= cepa silvestre; EGFP= parásitos que expresan EGFP; A1= parásitos que expresan EGFP-TcAct1; A2= parásitos que expresan EGFP-TcAct2

## Apéndice 9. Condiciones usadas en los equipos

### Typhooon FLA9500

Modo de lectura: fluorescencia (usar la base para fluorescencia). Se coloca la membrana con la cara donde están las proteínas viendo hacia la base.

Parámetros:

- método de lectura (selecciona la combinación de láser y filtro adecuada): Alexa Fluor 488, láser: 473 nm, filtro: LPB; Alexa Fluor 555, láser 532: nm, filtro: LPG
- PMT (ajusta el voltaje que se aplica al tubo foto-multiplicador (photo-multiplier tube, PMT) como un valor integral dentro del rango predeterminado; mientras mayor sea el valor, mayor será la sensibilidad): 400
- Tamaño de pixel (selecciona el tamaño de pixel para la lectura; un tamaño de pixel pequeño puede ser analizado con mejor detalle, aunque requiere más tiempo de lectura)

### Microscopios

#### Microscopio Olympus BX51 (Epifluorescencia)

- objetivos: UPlanFl 100x/1.30 Oil immersion
- aumento: 100x
- filtros:
  - WG: filtro de fluorescencia “verde”. Excitación: 510-550 nm / Dicroico 570 nm / Barrera 590 nm+; para detectar señal en color rojo (para anticuerpos secundarios acoplados con Alexa 594);
  - WB: filtro de fluorescencia “azul”. Excitación: 450-480 nm / Dicroico 500 nm / Barrera 515 nm+; para detectar señal en color verde (para anticuerpos secundarios acoplados con Alexa 488);
  - WU: filtro de fluorescencia “ultravioleta”. Excitación: 330-385 nm / Dicroico 400 nm / Barrera 420 nm+; para detectar señal en color azul (DAPI).

### Microscopio Nikon A1R+ STORM (Confocal)

- objetivos: Apo TIRF 100x Oil DIC N2 (apertura numérica:1.49; índice refractivo 1.515); Plan Apo VC 60xA WI DIC N2 (apertura numérica:1.2; índice refractivo 1.333)
- aumento: 100x (epimastigotes); 60x3x (tripomastigotes y amastigotes)
- modalidad del canal: Laser Scan Confocal, PMT
- longitud de onda ( $\lambda$ ) y láser:

	$\lambda$ emisión	$\lambda$ excitación	Poder del láser 60X/100X (mW)	Canal
DAPI	450	402.4	2/4	1
FITC	525	488.6	3.5/14	2
TRITC	595	560.9	14/7	3

### **Procesamiento de las muestras para su análisis en el espectrómetro de masas modelo Synapt G2S (Waters).**

Las bandas de gel teñidas con azul de Coomassie se destiñeron con una solución de metanol y ácido acético (50%/5%) durante 12 horas; se lavaron durante 15 minutos con una solución de bicarbonato de amonio 100 mM; se redujeron con DTT 50 mM por 45 minutos; se alquilaron con iodoacetamida 20 mM durante 2 h; se deshidrataron con acetonitrilo 100% y se digirieron con 30  $\mu$ L de tripsina porcina 20 ng/ $\mu$ L durante 18 h a 37°C. Posteriormente, se extrajeron los péptidos digeridos por sonicación en una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (50%/5%) y se resuspendieron en ácido fórmico 1%. Para desalar y concentrar los péptidos, se usaron columnas Ziptip C18 empleando una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (3%/0.1%) como fase móvil.



## Apéndice 10. Tinción con plata

### SOLUCIONES (todas las soluciones deben ser frescas)

#### 1) SOLUCIÓN FIJADORA

- 20 mL de metanol
- 25  $\mu$ L de formaldehído al 37%
- Aforar a 50 mL

#### 2) TIOSULFATO DE SODIO 0.2 g/L (0.02%)

- 0.01 g tiosulfato de sodio
- Aforar a 50 mL

#### 3) NITRATO DE PLATA 0.1%

- 0.05 g de nitrato de plata
- Aforar a 500 mL

- ó tener un stock de  $\text{AgNO}_3$  20%;  
tomar 250  $\mu$ L de stock + 49.5 mL de agua

#### 4) SOLUCIÓN REVELADORA

- 1.5 g de carbonato de sodio
- 1 mL de tiosulfato de sodio 0.02%
- Aforar a 500 mL

NOTA: 5 minutos antes de usar, agregar 25  $\mu$ L de formaldehído

#### 5) SOLUCIÓN DE PARO

##### a) ácido cítrico 2.3 M

- 2.5 g de ácido cítrico
- Aforar a 50 mL de agua

##### b) solución de ácido acético 6%

- 3 mL ácido acético
- Aforar a 50 mL

### PROCEDIMIENTO

NOTA: la tinción se realiza en recipientes de vidrio. Todos los pasos van en agitación suave.

1. Lavar el gel con 50 mL de agua milliQ durante 10 min.
2. Eliminar el agua y agregar la solución fijadora durante 10 min  
NOTA: si se requiere detener el proceso puede hacerse en este paso.
3. Lavar dos veces con agua milliQ, durante 5 min c/u.
4. Colocar tiosulfato de sodio 0.2 g/mL durante 1 min.
5. Lavar dos veces con agua milliQ, durante 20 seg cada lavado.
6. Agregar el nitrato de plata 0.1% durante 30 min.
7. Eliminar el nitrato de plata y agregar la solución reveladora durante aproximadamente 1 min o hasta que aparezcan las bandas.
8. Eliminar la solución reveladora y agregar la solución de ácido cítrico durante 10 min para detener la reacción.
9. Lavar con agua milliQ durante 10 min

## Apéndice 11. Publicaciones

Artículo derivado de la presente investigación:

**Vizcaíno-Castillo A**, Osorio-Méndez JF, Rubio-Ortiz M, Manning-Cela RG, Hernández R, Cevallos AM. 2019. *Trypanosoma cruzi* actins: Expression analysis of actin 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513:347-353. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.007.

Artículo de revisión, relacionado con la presente investigación:

**Vizcaíno-Castillo A**, Osorio-Méndez JF, Ambrosio JR, Hernández R, Cevallos AM. 2020. The complexity and diversity of the actin cytoskeleton of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 237:111278. doi: 10.1016/j.molbiopara.2020.111278

Artículo de co-autoría, relacionado con la presente investigación. Se trabajó en conjunto con Juan Felipe Osorio-Méndez (estudiante de doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas) para la estandarización de metodologías usadas en ambas tesis; algunos de los experimentos se realizaron de manera conjunta:

Osorio-Méndez JF, **Vizcaíno-Castillo A**, Manning-Cela R, Hernández R, Cevallos AM. 2016. Expression of profilin in *Trypanosoma cruzi* and identification of some of its ligands. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 480:709-714. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.044.



## Trypanosoma cruzi actins: Expression analysis of actin 2

Andrea Vizcaíno-Castillo<sup>a</sup>, Juan Felipe Osorio-Méndez<sup>a,1</sup>, Margarita Rubio-Ortiz<sup>b</sup>,  
Rebeca Georgina Manning-Cela<sup>b</sup>, Roberto Hernández<sup>a</sup>, Ana María Cevallos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360, Ciudad de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 March 2019  
Accepted 1 April 2019  
Available online 5 April 2019

#### Keywords:

Actin variants  
*Bodo saltans*  
Cytoskeleton  
Kinetoplastida

### ABSTRACT

The genome of *Trypanosoma cruzi* encodes for an expanded number of actins, myosins and actin binding proteins compared to *Trypanosoma brucei* or *Leishmania* spp. In *T. cruzi* only the expression of actin 1 (i.e. conventional actin) and profilin, an actin binding protein, has been described. In this work, the expression of a kinetoplastid-specific actin, named actin 2 (TcAct2; TriTryp Gene ID: TcCLB.507129.10) was characterized in different developmental stages of *T. cruzi*. With the aid of a polyclonal antibody, we showed that TcAct2 is expressed throughout the life cycle of the parasite. Detergent fractionation of epimastigote extracts showed that this protein is cytosolic and is not associated with membrane or cytoskeletal fractions. The protein is localized along the cellular body and the flagellum in all parasite stages with a fine granular pattern and does not co-localize with actin 1. 2DE-immunoblotting studies demonstrated the presence of several variants of each actin. We also demonstrate that TcAct1 and TcAct2 have distinct subcellular distributions suggesting differential functions in this organism. The search of TcAct2 orthologues in the TriTrypDB, allowed the identification of this gene in other trypanosomatids, all of them restricted to the stercoarian clade. In addition, TcAct2 was also identified in the closely related non-trypanosomatid species *Bodo saltans*. Our findings are consistent with the appearance of a complex actin system early in the evolution of kinetoplastids.

© 2019 Published by Elsevier Inc.

### 1. Introduction

*Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease, is a digenetic parasite with a complex life cycle that involves insect vectors and mammalian stages. It belongs to the Trypanosomatidae family, a group of protist parasites that includes *Trypanosoma brucei*, the etiological agent of the sleeping sickness and *Leishmania* spp, responsible for a variety of diseases known as Leishmaniasis. These organisms contain a distinctive cytoskeleton characterized by the presence of a single flagellum and a regular array of microtubules located beneath the cell membrane, known as the

subpellicular corset [1]. Although the presence of microfilaments has never been demonstrated, all analysed trypanosomatid genomes encode for actins, a sparse set of regulatory proteins (actin-binding proteins, ABPs), and for myosins that are expected to move along microfilaments [2].

Actins are globular multi-functional proteins that form microfilaments that participate in multiple cellular functions in eukaryotes, including maintenance of cell shape, cellular motility, adhesion, cytokinesis, endocytosis and vesicular traffic [3]. The function of these proteins depends on the precise spatio-temporal control of its polymerization, the stability of these polymers and their eventual disassembly back into actin monomers [4]. The assembly and spatial organization of actin filaments is regulated by the expression of distinct pools of actin isoforms as well as by their interaction with a large repertoire of ABPs [4,5]. The number of actins varies with the species, and their pattern of expression varies between and within species [6].

The information regarding actin function in trypanosomatids is very limited. This protein participates in endocytosis and vesicular

Abbreviations: TcAct1, *Trypanosoma cruzi* actin 1; TcAct2, *Trypanosoma cruzi* actin 2; TcAct3, *Trypanosoma cruzi* actin 3; TcAct4, *Trypanosoma cruzi* actin 4; PBST, PBS with 0.05% Triton X-100; ABP, actin-binding protein.

\* Corresponding author.

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

<sup>1</sup> Present address: Facultad de Medicina, Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt, Armenia, Quindío, Colombia.

trafficking [7]. However, it does not appear to have a role in other cellular functions that usually involve actin, such as cell motility or cytokinesis. In *T. brucei* bloodstream forms, but not in procyclics, actin is essential for cell survival [7].

There is evidence to suggest that the actin cytoskeleton of *T. cruzi* is more complex than that of *T. brucei* and *Leishmania* spp. In *T. cruzi*, an expanded set of actin genes has been identified. Besides one conserved gene encoding for a conventional actin (named TcAct1 in *T. cruzi*), there are two actins that are not identified in the model trypanosomatids *T. brucei* nor *Leishmania major* (TcAct2 and TcAct3). A fourth actin (TcAct4) is encoded by *T. cruzi* and *L. major*, but not by *T. brucei* [8]. In addition, *T. cruzi* has an expanded set of ABPs, including myosins, formins and the two subunits of the actin capping protein CapZ (CapZ $\alpha$  and CapZ $\beta$ ) [2,9]. Despite the greater number of genes related to the actin cytoskeleton in *T. cruzi*, only the expression and localization of two of them (TcAct1 and the ABP profilin) has been reported [8–11]. The biological significance of the expansion of the actin cytoskeleton in *T. cruzi* remains to be established.

In this work, we have characterized a trypanosomatid specific actin (TcAct2), the most similar *T. cruzi* actin to TcAct1, and found it is expressed along the life cycle of the parasite. There is no co-localization of both actins, thus suggesting that they have non-redundant functions in the parasite. Both proteins are expressed as several isoforms probably derived from post-translational modifications of the proteins, which increases the level of complexity of the actin system in this organism. The functional relevance of our findings remains to be established.

## 2. Materials and methods

### 2.1. In silico analysis

Three-dimensional models of TcAct1 and TcAct2 were generated using Raptor X [12–14] and the visualization of the structures was made with Chimera [15].

The orthologues of the four actins present in other trypanosomatids were identified with the orthologue function at TriTrypDB using as query their GeneIDs and confirmed by reciprocal best blast against *T. cruzi*. Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequences was performed with Clustal Omega [16]. A phylogenetic tree to verify the orthology relationship of the sequences was inferred with the Neighbor-Joining method using MEGA7 [17], with a bootstrap test of 1000 replicates and using the p-distance method to compute evolutionary distances. The analysis involved a total of 49 amino acid sequences (Table S2). All incomplete sequences were excluded. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 599 positions in the final dataset.

### 2.2. Parasites

*T. cruzi* CL-Brenner epimastigotes were grown at 28 °C in Liver Infusion Triptose medium (LIT) supplemented with 10% fetal bovine serum, 25 mg/L haemin and antibiotics (60 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin). Trypomastigotes and amastigotes were obtained from infected HFF-1 cells as previously described [8].

### 2.3. Expression of recombinant actins and production of anti-TcAct2 serum

To obtain GST fusion proteins in *Escherichia coli*, full length open reading frames of TcAct2 (TcCLB.507129.10), TcAct3 (TcCLB.510945.30) and TcAct4 (TcCLB.503841.40) were amplified by PCR from parasite's genomic DNA and cloned in frame into

pGEX-3X expression vector (GE Healthcare Life Sciences). We have previously cloned and expressed TcAct1 (TcCLB.510571.30) as a GST-fusion protein [8]. See Table S1 for oligonucleotides used.

The recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) using standard methods. GST-TcAct2 was affinity purified using a GSTrapFF column (GE Healthcare Life Sciences). For the production of mouse anti-TcAct2 polyclonal antibodies, 10 µg of purified GST-TcAct2 was emulsified with complete Freund's adjuvant and were intraperitoneally administered to BALB/c mice (200 µl per mouse). After seven weeks a booster dose of 10 µg of recombinant protein, but emulsified with incomplete Freund's adjuvant, was administered. Two additional doses with 5 µg of protein each were subsequently given at seven and three weeks intervals. Immune sera were obtained two weeks after the last antigen boost. Preimmune sera were collected 15 days before to the first immunization. Animal handling and immunization protocol were approved by local Bioethics Committee for Animal Research (approval number ID 129). Adsorption of the anti-TcAct2 serum with GST bound to Glutathione Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences) was performed to eliminate anti-GST antibodies.

The IgG fraction of our rabbit anti-TcAct1 serum was purified with a Protein-A/Sepharose 4B column (Thermo Fisher Scientific) using standard methods. Other antibodies used were anti-GST (1:5000; Thermo Fisher Scientific [PA1-982A]), monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (1:50,000; Sigma-Aldrich, [T6199]), anti-aldolase (1:4000; Abcam, [ab207494]), anti-histone H3 (1:8000; Abcam, [ab1791]).

### 2.4. Two-dimensional electrophoresis (2DE)

Total epimastigote proteins were obtained lysing the parasites in 60 mM Tris-base, 100 mM DTT, 2% SDS and separated by 2DE. Protein (110 µg/sample) was loaded into Immobiline Drystrips (7 cm, linear pH 4 to 7; GE Healthcare Life Sciences) and separated by IEF using IPGphor system (GE Healthcare Life Sciences) using a five-step ramping protocol for a total of 7500 V/h and a maximum current setting of 50 µA per strip. After first dimension, strips were equilibrated according to manufacturer's recommendations, and run on 10% polyacrylamide gels. Then, proteins were transferred into a 0.45 µm PVDF membranes (Thermo Fisher Scientific) using standard techniques.

### 2.5. Cell fractionation

We performed a differential cellular fractionation procedure using detergents based on reported protocols [18,19]. Briefly, epimastigotes were harvested, washed twice with pre-chilled PBS and resuspended in 1 ml per 200 × 10<sup>6</sup> epimastigotes of digitonin extraction buffer (PIPES buffer, 0.05 mM EDTA, with cComplete protease inhibitors [Roche Diagnostics GmbH], supplemented with different concentrations of digitonin). Cells were incubated at 28 °C for 20 min and centrifuged at 14,000 ×g for 2 min at 4 °C. The supernatants were collected and the digitonin-insoluble pellets were resuspended in 1 ml of ice-cold Triton X-100 extraction buffer (0.5% Triton X-100, 9 mM EDTA, PIPES buffer, with cComplete protease inhibitors). The insoluble samples were incubated for 30 min at 4 °C with agitation and then centrifuged at 5000 ×g for 10 min at 4 °C. The supernatants were collected and the Triton-insoluble pellets were resuspended in 1 ml of cytoskeleton solubilization buffer (5% SDS in PBS). The different fractions were analysed by SDS-PAGE and immunoblot, loading equal volumes of each fraction.

### 2.6. Immunoblotting

Epimastigote pellets were directly resuspended in Laemmli

buffer ( $5 \times 10^6$  parasites per lane [ $\sim 40 \mu\text{g}$  of protein]), the proteins were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes by conventional protocols. Membranes were blocked with 5% skimmed milk in PBS for 2 h at RT, and then were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the appropriate primary antibodies diluted in PBST with 2% skimmed milk. After three washes with PBST, the membranes were incubated with secondary antibody diluted in PBST with 2% skimmed milk, either goat anti-mouse IgG-HRP (1:5000) or anti-rabbit IgG-HRP (1:15,000), for 1 h at RT. Membranes were washed again three times with PBST and, finally, incubated with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) and revealed by exposure to film. For simultaneous detection of TcAct1 and TcAct2 proteins, the IgG-purified rabbit anti-TcAct1 antibody and mouse anti-TcAct2 polyclonal serum were simultaneously incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the membrane and bound antibody was detected using fluorescent secondary antibodies (anti-mouse IgG Alexa-488 (1:1000) and anti-rabbit IgG Alexa-594 (1:2000)). The fluorescent signal was detected in a Typhoon FLA9500 (GE Healthcare Life Sciences) and analysed using Image J.

### 2.7. Immunofluorescence microscopy

Parasites were harvested, washed once with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde during 10 min at  $4^\circ\text{C}$  and allowed to adhere to silane-prep slides (Sigma-Aldrich). After permeabilization for 5 min with 0.5% Triton-X 100 in PBS, slides were blocked with 2% BSA during 2 h at RT and then incubated with a mix of anti-TcAct2 (1:300–1:400) and IgG-purified anti-TcAct1 (1:400–1:800) in 1% BSA for 1 h at RT. Slides were washed three times and incubated with a mix of anti-mouse IgG Alexa-488 and anti-rabbit IgG Alexa-594 (1:400 each in 1% BSA) during 1 h at RT. After three washes with 1% BSA, the slides were counterstained with  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI and mounted with DAKO Fluorescent Mounting Medium (Dako). The

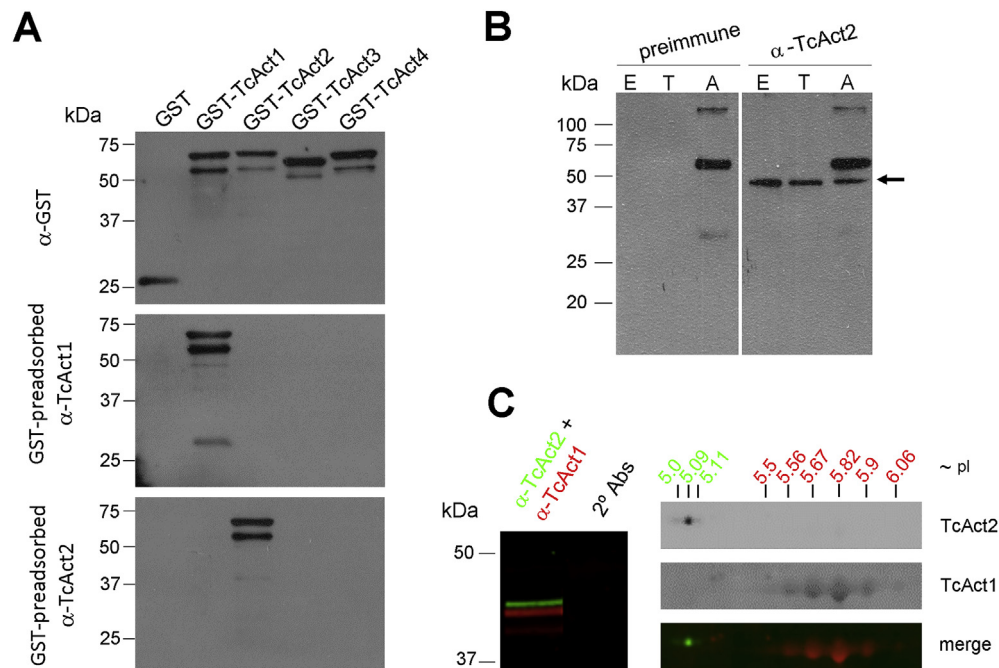
samples were observed with an epifluorescent Olympus BX51 microscope. The images were obtained with an Olympus camera and analysed using Image J.

## 3. Results

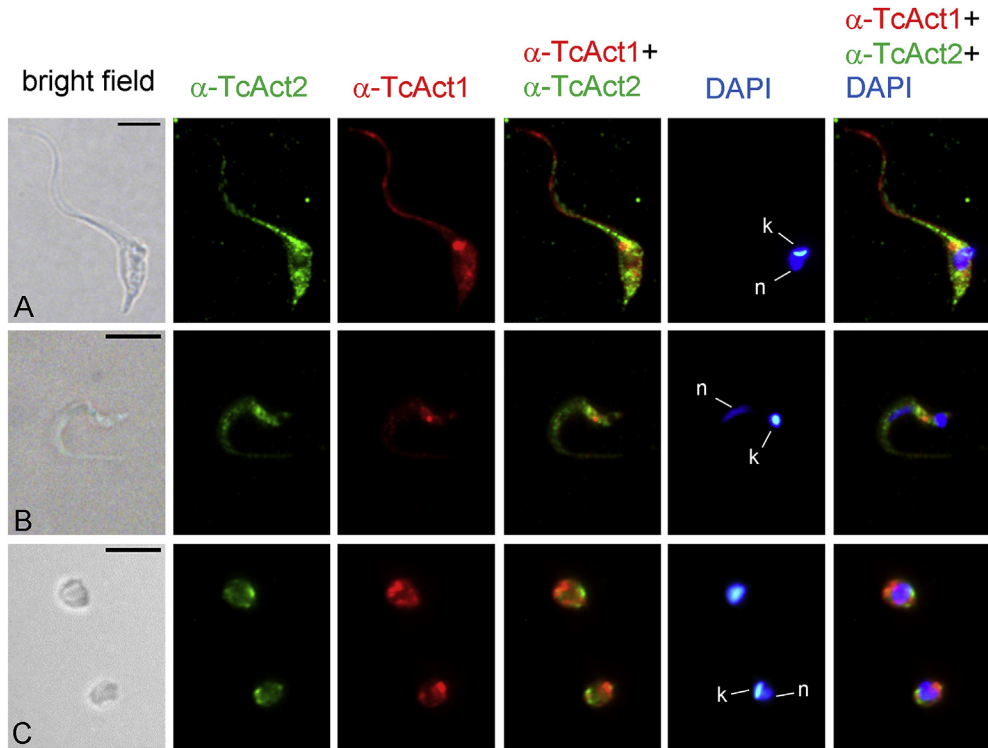
### 3.1. TcAct2 structural model is typical of actins and it is expressed along the parasite life cycle

*T. cruzi* CL Brener is a hybrid strain and its diploid genome is formed by both Esmeraldo-like (S) and Non-Esmeraldo (P) haplotypes [20]. Therefore, there are two *TcAct2* genes annotated in the genome: the S haplotype (TcCLB.507129.10) and the P haplotype (TcCLB.507969.50), that differ in 16 nucleotides (98.6% identity) that result in 4 amino acid substitutions. The identity of TcAct2 with TcAct1 is 51% and TcAct2 is 16 amino acids longer (392 vs 376 aa) (Fig. S1). The theoretical modelling of the tertiary structure showed that TcAct2 conserves the typical folding of an actin protein, with its four subdomains (S1–S4), the nucleotide binding cleft and the hydrophobic cleft where many ABPs are expected to bind.

To study the expression of TcAct2, a GST-recombinant version of this protein was used to obtain mouse anti-TcAct2 antibodies. A reactive serum was adsorbed with GST to eliminate cross-reacting epitopes with the GST fragment. The adsorbed serum only recognized GST-TcAct2, but not GST nor other GST-TcActins expressed in *E. coli* (Fig. 1A). Our IgG anti-TcAct1 adsorbed with GST only recognized the GST-TcAct1 fusion protein. Immunoblotting of protein lysates from insect and mammalian stages of the parasite showed that the anti-TcAct2 serum, but not the preimmune serum, recognized a  $\sim 44$  kDa band (Fig. 1B). Amastigotes were purified from other parasite stages using a monoclonal antibody against the amastigote's specific surface protein Ssp4. Hence, in the amastigote lysates, bands that correspond to the heavy and light chains (55 and 28 kDa), and a fraction of non-reduced IgG (150 kDa) were also



**Fig. 1. Characterization of anti-TcAct2 polyclonal serum.** (A) GST-TcActins expressed in *E. coli* probed with antibodies IgG-purified anti-TcAct1 or anti-TcAct2 serum, both preadsorbed with purified GST (1:20,000), or anti-GST. (B) Protein lysates from epimastigotes (E), trypomastigotes (T) and amastigotes (A) probed with either preimmune or immune anti-TcAct2 serum (1:8000). The arrow indicates the position of the band that corresponds to TcAct2. (C) Dual-labelling immunoblotting of epimastigote protein lysates with anti-TcAct1 (red; 1:16,000) and anti-TcAct2 (green; 1:8000) in either 1DE (left) or 2DE (right) blots. Approximate pI values of recognized variants are shown above the corresponding spot. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



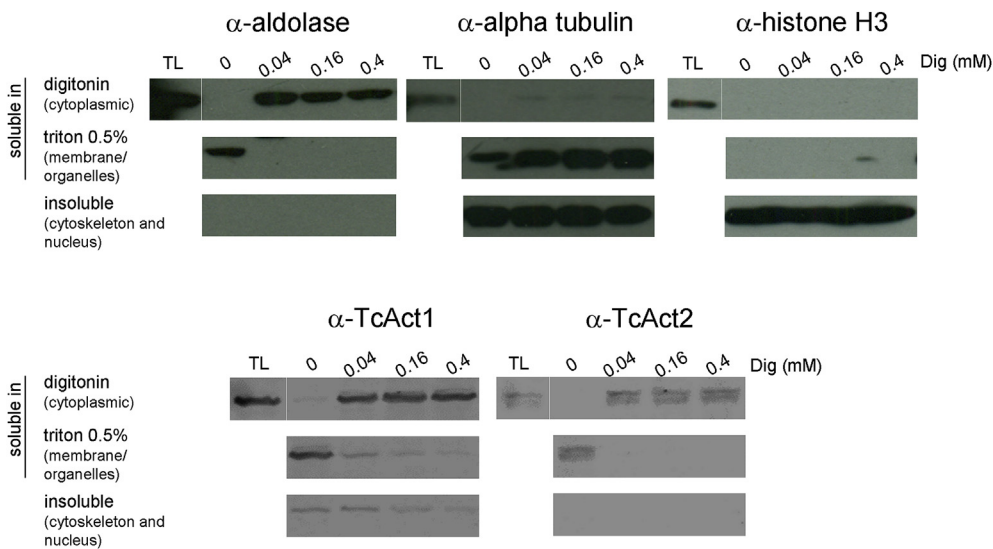
**Fig. 2. Subcellular localization of TcAct1 and TcAct2 along the life cycle of *Trypanosoma cruzi*.** Immunofluorescence assays using anti-TcAct2 (green) and anti-TcAct1 (red) in epimastigotes (A), trypomastigotes (B) and culture-derived amastigotes (C). DNA was stained with DAPI. n, nucleus; k, kinetoplast. Bars = 5 μm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

detected in immunoblot assays. To confirm the specificity of the anti-TcAct2 serum, we simultaneously probed epimastigote protein lysates with anti-TcAct1 and anti-TcAct2 antibodies. Two bands of slightly different, but discernible, sizes were detected (Fig. 1C): ~43.0 kDa for anti-TcAct1 and ~44 kDa for anti-TcAct2. When epimastigote protein lysates were separated using 2DE, the anti-TcAct1 antibody detected six spots (pI 5.5–6.1), and the anti-TcAct2 serum detected three different and more acidic spots (pI 5.0–5.2). The range of detected pI for both proteins agree the

expected pI values calculated from the amino acid sequences (TcAct1 = 5.5, TcAct2 = 4.9). As both antibodies were specific for each actin (Fig. 1A), the different spots identified probably correspond to multiple post-translational modifications of the proteins.

3.2. TcAct1 and TcAct2 have different subcellular distributions

Immunofluorescence microscopy showed that TcAct1 and TcAct2 have distinct cellular distributions. As previously reported,

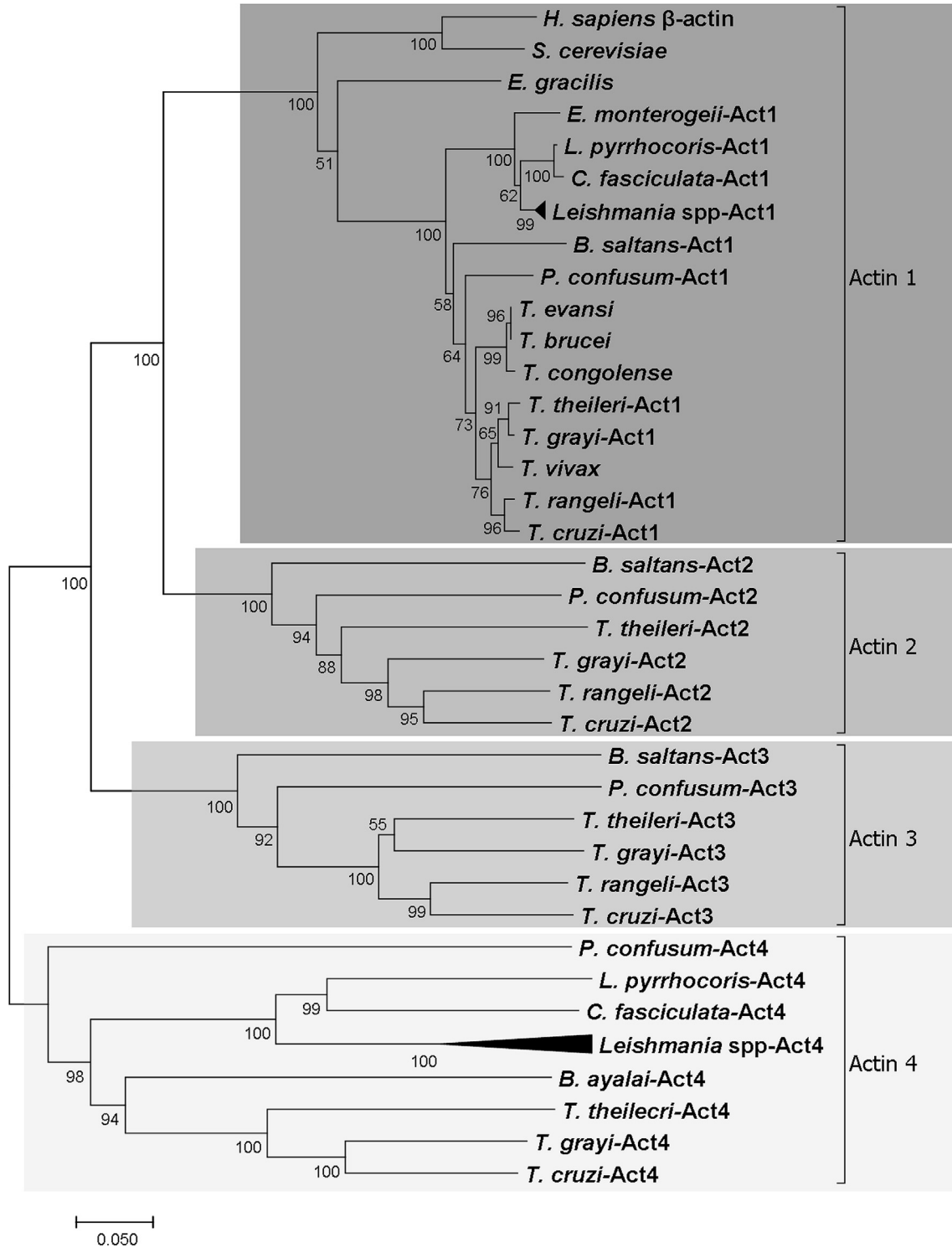


**Fig. 3. Detergent fraction analysis of the localization of TcAct1 and TcAct2.** Detergent-based fractionation was performed on *T. cruzi* epimastigotes. Different fractions obtained were probed with anti-TcAct1 and anti-TcAct2. The following antibodies were used as fractionation controls: anti-aldolase (cytoplasmic), anti-alpha tubulin (cytoskeleton), anti-histone H3 (nuclear). Dig = digitonin.



in epimastigotes TcAct1 was observed in the flagellum and as a dense concentration near its base. Diffuse expression within the cytoplasm was also present. In trypomastigotes, the distribution was weak and diffuse and, occasionally, a defined spot could be identified between the nucleus and kinetoplast. In amastigotes,

TcAct1 expression was heterogeneous with increased concentrations near the parasite surface [8] (Fig. 2). In contrast, TcAct2 showed a heterogeneous distribution along the cellular body and flagellum with a granular pattern in all stages of the parasite (Fig. 2). In amastigotes, areas of increased concentrations of TcAct2



**Fig. 4. Neighbor-joining tree of actin protein sequences belonging to some trypanosomatids and other species.** The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the units of the number of amino acid differences per site. On the right, the brackets identified the four clusters obtained from these analysis, shaded in different grays. For the *Leishmania* group, only 7 of the 15 organisms present in TryTrypDb were included (Table S2).

were identified near the parasite surface as described for TcAct1. However, there was no evidence of co-localization of these actins in any of the different parasitic stages. To explore the cellular distribution of TcAct2 further, we performed a detergent fractionation analysis of epimastigotes. This protocol produces fractions enriched with proteins from the cytosol, those associated with membranes and, finally, with nuclear and cytoskeletal proteins (Fig. 3) [18,19]. TcAct1 was detected in all three fractions but was highly enriched in the cytosolic fraction. In contrast, TcAct2 was detected exclusively in the cytosolic fractions. In these experiments, where parasites were not directly lysed in a SDS containing buffer, TcAct2 was identified as a doublet, that most likely correspond to some processing of the native protein. These results suggest that both actins are expressed mainly as monomeric or oligomeric forms and that only TcAct1 is also stably associated with the plasma membrane and cytoskeleton.

### 3.3. TcAct2, TcAct 3 and TcAct 4 are paralogues of conventional actin

When our initial bioinformatic analysis was performed, only the genomes of *T. cruzi*, *T. brucei* and *L. major* were available and TcAct2 was initially thought to be species-specific [8]. The current TriTryp DB (release 42), includes the genomes of 29 species belonging to the Trypanosomatidae family and of *Bodo saltans*, a free-living, closely related kinetoplastid. We searched these genomes for sequences encoding for homologous genes to the *T. cruzi* actins. As expected, TcAct1 orthologues were present in all species analysed. Orthologues for TcAct4 were found in most genomes. However, the probable orthologues in *T. rangeli* (TRSC58\_01920-TRSC58\_05914), *E. monterogeii* (EMOLV88\_350011700) and *B. saltans* (BSAL\_07330), were incomplete and excluded from further analyses. No TcAct4 orthologues were identified in *T. brucei*, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma evansi*. In contrast, TcAct2 and TcAct3 orthologues were absent in the majority of trypanosomatids, and were only present in *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma grayi*, *Trypanosoma rangeli*, *Paratrypanosoma confusum* and in *B. saltans*. A Neighbor-Joining tree of trypanosomatid actins clustered each actin in independent clades suggesting that TcAct2, TcAct3 and TcAct4 are paralogues of the conventional actin (Fig. 4; Table S2).

## 4. Discussion

The number of actin genes varies significantly among eukaryotic organisms. Each actin isoform has its own pattern of expression and subcellular compartmentalization. Their biological role can be overlapping, but frequently cannot completely substitute for each other [21]. Actin function is regulated not only through their interaction with a wide variety of ABPs, but also by a large number of post-translational modifications including acetylation, arginylation, methylation, phosphorylation and oxidation [22].

*T. cruzi* has four actin encoding genes. In this study, we demonstrate that TcAct2 is expressed in all stages of the parasite. In 2DE immunoblotting assays, three variants of TcAct2 were detected, none of which correspond to the previously reported variants of TcAct1. Considering the specificity of our antibodies and that TcAct2 is the closest in identity/similarity to TcAct1, these variants probably correspond to post-translational modifications of these actins. These findings suggest that the complexity of actin regulation in this organism is not only due to the presence of multiple actins, but also through post-translational modifications of these proteins.

The immunolocalization assays showed a diffuse distribution of TcAct2 that is different from that of TcAct1. Fractionation studies

suggest that TcAct2 is exclusively a cytosolic protein, whereas TcAct1, although predominantly cytosolic, is also associated with cellular membrane and with the cytoskeleton. The apparent lack of co-localization of TcAct2 with TcAct1 and their different subcellular distribution in all stages of the parasite suggest that these actins participate in non-redundant functions within the cell.

Analysis of the trypanosomatid genomes identified the presence of a homologue to the conventional actin (Act1) in all species studied, whereas Act2 and Act3 were identified only in *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. theileri* and *T. grayi*, all of which are stercoarian trypanosomes. Act4 was present in all trypanosomatids searched but was lost in the salivarian trypanosomes *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* and *T. evansi*. The presence of actin orthologues in *B. saltans*, the closest free-living known relative of obligatory parasitic trypanosomatids, suggests that the missing genes were lost after the diversification of trypanosomatids [23]. Interestingly, an analysis of myosins, motor proteins that bind actins, revealed expansion and secondary losses of myosins genes that closely mirrored our findings, with stercoarian trypanosomes having an expanded set of myosins, and the salivarian trypanosomes containing a reduced set of these proteins (Fig. S2) [24].

Most functional studies in trypanosomatids are based in *T. brucei* as a model organism because it is susceptible to RNA interference whereas *Leishmania* and *T. cruzi* are not. Therefore, the majority of studies of the cytoskeleton have been done in *T. brucei*. However, our findings emphasize that there are important differences between the cytoskeletons of *T. brucei* and *T. cruzi* that need to be addressed studying each species individually. We demonstrate that TcAct1 and TcAct2 have different cellular distributions which suggest that they are involved in non-redundant physiological processes. In the absence of a complex repertoire of ABPs, actin post-translational modifications are probably involved in their regulation. Elucidation of TcAct2 biological role is needed to further understand the complexity of the actin system in *T. cruzi* and stercoarian trypanosomatids.

## Acknowledgments

We thank Dr. Ricardo Mondragón-Flores and Dr. Daniel Alejandro Fernández-Velasco for fruitful discussions, Dr. Silvia Ivonne-Mora for performing isoelectrofocusing experiments, MSc. Juliana Herrera for general technical assistance, QFB Claudia Márquez-Dueñas for performing *T. cruzi* cell infections. We also thank Patricia de la Torre for sequencing of the construction plasmids and Jorge García-Rebollar for his help in production of immune sera. This work was supported by PAPIIT grant awarded to Ana María Cevallos (IN207112), Roberto Hernández (IN206519) and CONACYT (No. 240086) awarded to Rebeca G. Manning-Cela. Andrea Vizcaíno-Castillo thanks CONACYT (CVU: 130460), and Posgrado en Ciencias Bioquímicas (UNAM) for funding and facilities to perform PhD studies. This article is a partial fulfilment to obtain her PhD degree.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.007>.

## Transparency document

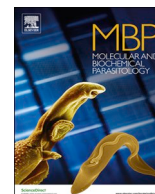
Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.007>.

## References

- [1] L. Kohl, K. Gull, Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton, Mol.



- Biochem. Parasitol. 93 (1998) 1–9, [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00014-0).
- [2] M. Berriman, E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, et al., The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, *Science* 309 (2005) 416–422, <https://doi.org/10.1126/science.1112642>.
- [3] G. Hild, B. Bugyi, M. Nyitrai, Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function, *Cytoskeleton* 67 (2010) 609–629, <https://doi.org/10.1002/cm.20473>.
- [4] K. Skruber, T.-A. Read, E.A. Vitriol, Reconsidering an active role for G-actin in cytoskeletal regulation, *J. Cell Sci.* 131 (2018), jcs203760, <https://doi.org/10.1242/jcs.203760>.
- [5] T.D. Pollard, *Actin and actin-binding proteins*, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. (2016) 1–18.
- [6] L. Zhu, Y. Zhang, Y. Hu, et al., Dynamic actin gene family evolution in primates, *BioMed Res. Int.* (2013), <https://doi.org/10.1155/2013/630803>.
- [7] J.A. García-Salcedo, D. Pérez-Morga, P. Gijón, et al., A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*, *EMBO J.* 23 (2004) 780–789, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600094>.
- [8] A.M. Cevallos, Y.X. Segura-Kato, H. Merchant-Larios, et al., *Trypanosoma cruzi*: multiple actin isoforms are observed along different developmental stages, *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 249–259, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.003>.
- [9] L.D.B. De Melo, C. Sant'anna, S.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, <https://doi.org/10.1017/S0031182008004496>.
- [10] L.C. Kalb Souza, R.E.G. Gonçalves Pinho, C.V. de Paula Lima, et al., Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108 (2013) 631–636, <https://doi.org/10.1590/0074-0276108052013015>.
- [11] J.F. Osorio-Méndez, A. Vizcaíno-Castillo, R. Manning-Cela, et al., Expression of profilin in *Trypanosoma cruzi* and identification of some of its ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480 (2016), <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.044>.
- [12] M. Källberg, H. Wang, S. Wang, et al., Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server, *Nat. Protoc.* (2012), <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>.
- [13] J. Ma, J. Peng, S. Wang, J. Xu, A conditional neural fields model for protein threading, *Bioinformatics* (2012), <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts213>.
- [14] J. Ma, S. Wang, F. Zhao, J. Xu, Protein threading using context-specific alignment potential, *Bioinformatics* (2013), <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt210>.
- [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.* (2004), <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [16] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, et al., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* (2011), <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- [17] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* (2016), <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [18] V.L. Alonso, G.V. Villanova, C. Ritagliati, et al., *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 3 binds acetylated  $\alpha$ -tubulin and concentrates in the flagellum during metacyclogenesis, *Eukaryot. Cell* 13 (2014) 822–831, <https://doi.org/10.1128/EC.00341-13>.
- [19] M. Ramsby, G. Makowski, Differential detergent fractionation of eukaryotic cells, *Cold Spring Harb. Protoc.* 6 (2011) 337–348, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5592>.
- [20] B. Zingales, M.A. Miles, D.A. Campbell, et al., The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infect. Genet. Evol.* 12 (2012) 240–253, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.
- [21] B.J. Perrin, J.M. Ervasti, The actin gene family: function follows isoform, *Cytoskeleton* 67 (2010) 630–634, <https://doi.org/10.1002/cm.20475>.
- [22] J.R. Terman, A. Kashina, Post-translational modification and regulation of actin, *Curr. Opin. Cell Biol.* 25 (2013) 30–38, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.009>.
- [23] A.P. Jackson, T.D. Otto, M. Aslett, et al., Kinetoplastid phylogenomics reveals the evolutionary innovations associated with the origins of parasitism, *Curr. Biol.* 26 (2016) 161–172, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.055>.
- [24] D.A.S. De Souza, D.P. Pavoni, M.A. Krieger, A. Ludwig, Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18865-y>.



## Review

## The complexity and diversity of the actin cytoskeleton of trypanosomatids

Andrea Vizcaíno-Castillo<sup>a</sup>, Juan Felipe Osorio-Méndez<sup>a,b</sup>, Javier R. Ambrosio<sup>c</sup>,  
Roberto Hernández<sup>a</sup>, Ana María Cevallos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, Programa de Medicina, Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt, Armenia, Colombia

<sup>c</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal, 4510, D.F., Mexico



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Actin  
Cytoskeleton  
Actin-related protein  
Actin-like protein  
Actin-binding protein  
Myosin  
Trypanosomatid  
Kinetoplastid  
*Trypanosoma*  
*Leishmania*

## ABSTRACT

Trypanosomatids are a monophyletic group of parasitic flagellated protists belonging to the order Kinetoplastida. Their cytoskeleton is primarily made up of microtubules in which no actin microfilaments have been detected. Although all these parasites contain actin, it is widely thought that their actin cytoskeleton is reduced when compared to most eukaryotic organisms. However, there is increasing evidence that it is more complex than previously thought. As in other eukaryotic organisms, trypanosomatids encode for a conventional actin that is expected to form microfilament-like structures, and for members of three conserved actin-related proteins probably involved in microfilament nucleation (ARP2, ARP3) and in gene expression regulation (ARP6). In addition to these canonical proteins, also encode for an expanded set of actins and actin-like proteins that seem to be restricted to kinetoplastids. Analysis of their amino acid sequences demonstrated that, although very diverse in primary sequence when compared to actins of model organisms, modelling of their tertiary structure predicted the presence of the actin fold in all of them. Experimental characterization has been done for only a few of the trypanosomatid actins and actin-binding proteins. The most studied is the conventional actin of *Leishmania donovani* (LdAct), which unusually requires both ATP and Mg<sup>2+</sup> for polymerization, unlike other conventional actins that do not require ATP. Additionally, polymerized LdAct tends to assemble in bundles rather than in single filaments. Regulation of actin polymerization depends on their interaction with actin-binding proteins. In trypanosomatids, there is a reduced but sufficient core of actin-binding proteins to promote microfilament nucleation, turnover and stabilization. There are also genes encoding for members of two families of myosin motor proteins, including one lineage-specific. Homologues to all identified actin-family proteins and actin-binding proteins of trypanosomatids are also present in *Paratrypanosoma confusum* (an early branching trypanosomatid) and in *Bodo saltans* (a closely related free-living organism belonging to the trypanosomatid sister order of Bodonida) suggesting they were all present in their common ancestor. Secondary losses of these genes may have occurred during speciation within the trypanosomatids, with salivarian trypanosomes having lost many of them and stercorarian trypanosomes retaining most.

## 1. Introduction

Actins are globular proteins that polymerize forming microfilaments. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments provide the structural scaffold and mechanical force required for most biological processes occurring in eukaryotic cells. These filaments are interlinked, giving rise to a dynamic network known as the cytoskeleton. Each type of filament is capable of rapid growth or disassembly dependent on the cell's requirements. These processes are regulated by numerous factors including nucleators, motors, severing proteins,

crosslinkers, polymerases and depolymerases. The number and type of regulators present in a particular species largely depend on their taxonomic clade.

Trypanosomatids are protozoan parasites of the class Kinetoplastida that infect invertebrate hosts. Some of them are also pathogenic to humans, animals and plants, with the invertebrate host serving as the vector that facilitates their transmission. Ultrastructural observations of the trypanosomatid cytoskeleton showed that it is mainly composed by an elaborated network of microtubules underlying the plasma membrane (i.e. subpellicular corset) and a single flagellum with a typical

\* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111278>

Received 31 October 2019; Received in revised form 24 March 2020; Accepted 7 April 2020

Available online 28 April 2020

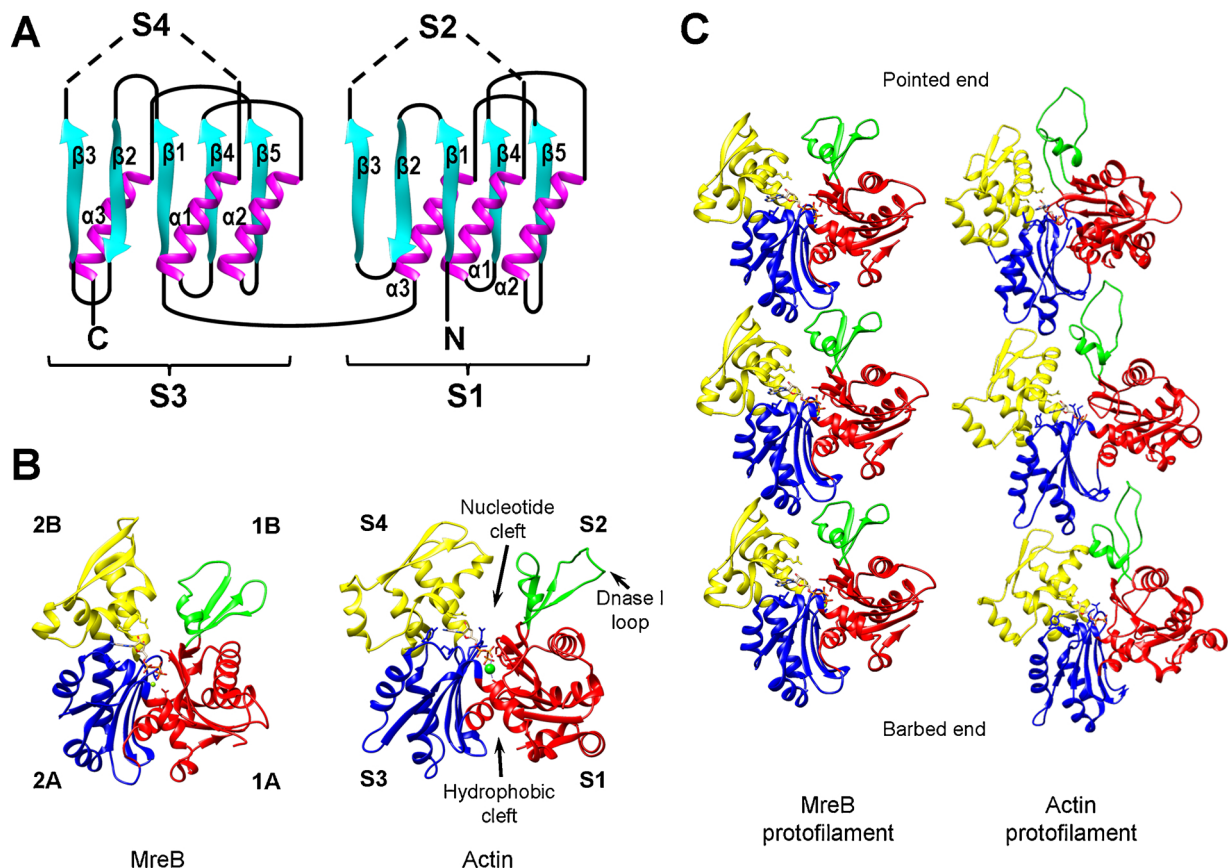
0166-6851/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

axoneme. Therefore, it has been suggested that the trypanosomatid cytoskeleton is predominantly based on tubulin (reviewed in [1]). The role of actin has received little attention because, although the protein is present in all trypanosomatids examined, it has not been possible to detect microfilaments either by electron microscopy or phalloidin staining [2]. However, a genomic analysis of the components of the actin cytoskeleton in the three trypanosomatids of medical importance, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*, identified genes encoding for a small and sufficient number of actin-binding proteins (ABPs) necessary to regulate actin dynamics [3]. Further studies not only confirmed the presence of conventional actin and of the ARP2/3 complex but also identified five trypanosome specific actin-like proteins (ALPs) and the presence of ARP6, suggesting that the trypanosomatid actin cytoskeleton was not as simple as previously thought [4, 5]. Comparisons between the genomes of different trypanosomatid species have shown that the actin cytoskeleton in *T. cruzi* is more complex, containing not only more actins but also an expanded set of actin-binding proteins [3–6]. The presence of a diverse family of actins and actin-like proteins with a small repertoire of actin-binding proteins in trypanosomatids, in the absence of detectable microfilaments, suggest the presence of novel functions and regulation of their actin-cytoskeleton that deserve further study.

## 2. Actins, actin-related proteins and actin-like proteins

Actins are defined by a conserved ATPase domain with ATP-binding capacity in the presence of  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ , known as the actin fold. The

common core consists of two  $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  regions related to each other by approximate dyad symmetry (Fig. 1A). The tertiary structure of actins is characterized by two main domains known as the large and the small domains, that are separated by the ATP-binding cleft on one side and a hydrophobic cleft at the opposite side (Fig. 1B). Each of these domains consist of two subdomains and, therefore, a four-subdomain nomenclature has been adopted for both eukaryotic and bacterial actins [7, 8]. In addition to the actin fold, a common feature that unifies actins is their ability to assemble into protofilaments. Protofilaments of eukaryotes and bacteria have the same orientation with the intermonomer interface formed between subdomains 2/1B and 4/2B of the bottom monomer and subdomains 1/1A and 3/2A of the top monomer, respectively (Fig. 1C). Therefore, these protofilaments are polar structures whose two ends are classically referred to as the barbed end and the pointed end. Lateral contacts between protofilaments allow for the assembly of functional filaments. In bacteria, there are many different ways in which the protofilaments form filaments, acquiring different architectures that, presumably, are tailored to their different functions [9]. For example, monomers can be either staggered or found at the same level within the filament, protofilaments can assemble in parallel or antiparallel orientations, and acquire helical (with left or right-handed twist) or non-helical configurations [8–10]. The majority of bacterial filaments studied have two protofilaments, but filaments with four and 15 protofilaments have been described [11, 12]. In contrast, eukaryotic microfilaments are conserved and are usually described as two parallel protofilaments forming a right-handed helix staggered by half the length of an actin monomer [13]. These microfilaments have



**Fig. 1.** Structural characteristics of prokaryotic and eukaryotic actins. (A) The characteristic common core topology of proteins belonging to the actin superfamily located within subdomains 1 and 3 of actins, with beta sheets shown in cyan and alpha helices in magenta. Dotted lines indicate the place where the insertions of subdomains 2 and 4 occurred. (B) Tertiary structure of bacterial actin MreB (PDB:1JCG) and actin (PDB:2BTF). The four subdomains are coloured in red (1A/S1), green (1B/S2), blue (2A/S3) and yellow (2B/S4). Arrows point at nucleotide and hydrophobic clefts, and to the DNase I loop for eukaryotic actins. (C) Protofilaments of MreB (PDB:1JCG) and actin (PDB:3MFP) present the monomers in the same orientation, giving polarity to the filament and forming barbed and pointed ends. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

been structurally characterized in a few model organisms. Interestingly, in spores of *Dictyostelium discoideum* a novel actin structure, the actin tubule, has been described [14]. These actin tubules consist in three actin protofilaments bundled to form a tubular structure and then the tubules are further organized into rods. *Giardia lamblia*, although able to form conventional microfilaments, it can also form filaments with half of the diameter, which likely represent protofilaments [15]. Characterization of actin filaments in a wider range of species and with a larger number of actin variants is needed to identify other types of actin microfilaments in eukaryotes. Nevertheless, through interaction with actin-binding proteins, eukaryotic microfilaments can acquire higher levels of organization generating a variety of complex architectures including branched or crosslinked networks that are found in lamellipodia, parallel bundles found in filopodia, and antiparallel structures in contractile fibres.

During the early 1990s, genes encoding for proteins similar to actin were identified in *Saccharomyces* that were commonly referred to as actin-related proteins (ARPs). In 1997, a bioinformatic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome identified a total of ten actin-related proteins [16]. The authors ordered these sequences according to their relative identity and similarity to conventional actin sequences, where ARP1 was the most similar and ARP10 was the most dissimilar. An ARP11 protein was subsequently identified in humans [17]. All these ARPs are known to be part of one or more multisubunit complexes, many of which contain at least one actin molecule [18]. ARP1 is the only ARP known to polymerize *in vitro* and to form a short filament that is part of the dynactin complex (that functions in the transport of cargoes and organelles on microtubules) [19]. In 2005, an in-depth sequence and comparative genomic analysis of ~700 complete protein sequences homologous to actin, including 148 ARP sequences available at the time, was published [18]. The analysis of the regions aligned in all actin and ARP sequences, identified single discriminating residues and motifs for eight ARP subfamilies, whereas no specific residues or motifs were found for the ARP4, ARP10, and ARP11 subfamilies. Specific insertions and deletions were also identified that would help to the classification and annotation of ARPs from other organisms.

The rapid evolution of DNA sequencing technology has resulted in an explosion in the number of gene sequences available. Today, more than 4400 eukaryotic genomes have been integrated to the genome list at NCBI with various degrees of completion. Within these genomes, a substantial number of sequences have been annotated as encoding for actins, actin-related proteins or actin-like proteins. Annotation of these sequences is based on their similarity to other proteins by blast analyses. There are no reports of any eukaryotic organism that lacks a homologue of *Saccharomyces* actin. The homologues to *Saccharomyces* actin are highly conserved both in animals and plants and are increasingly refer to as “conventional actins”. In many organisms, multiple conventional actins are present, with six isoforms identified in humans (two cytosolic and four associated with muscle fibres). Also, most of the ARPs identified in *Saccharomyces* have readily identifiable homologues in a large number of eukaryotic species, with the exception of ARP7 and ARP9 that appear to be restricted to fungi. However, not all organisms encode for all these conserved ARPs. For example, *G. lamblia* does not encode for any of them [15] whereas apicomplexan parasites encode only for ARP1, ARP4 and ARP6 [20]. Bioinformatic analyses have also identified an increasing number of sequences encoding for proteins from the actin family that are not either conventional actins nor any of the widely distributed ARPs. Unfortunately, there is no convention on how to annotate these divergent genes and, therefore, they are labelled in an aleatory fashion as encoding for actin, actin-like or actin-related proteins. It has been shown that some of these divergent sequences are restricted to certain taxonomic groups as is the case for ARP7 and ARP 9 in fungi or the seven ALPs of Apicomplexa [18, 20]. Attempts to define the use of these terms for these sequences have been made with some authors suggesting the designation ALPs to refer to actins specific of a given group [20], while others suggest the

term of orphan actins [18]. To be useful, a term should have a precise meaning and reflect the distinctive biological properties of these proteins that can group them in some way. Therefore, renaming of these sequences should probably await the development of biological criteria to define them such as their ability or not to polymerize, their participation in a particular cellular process or their restriction to a specific biological group.

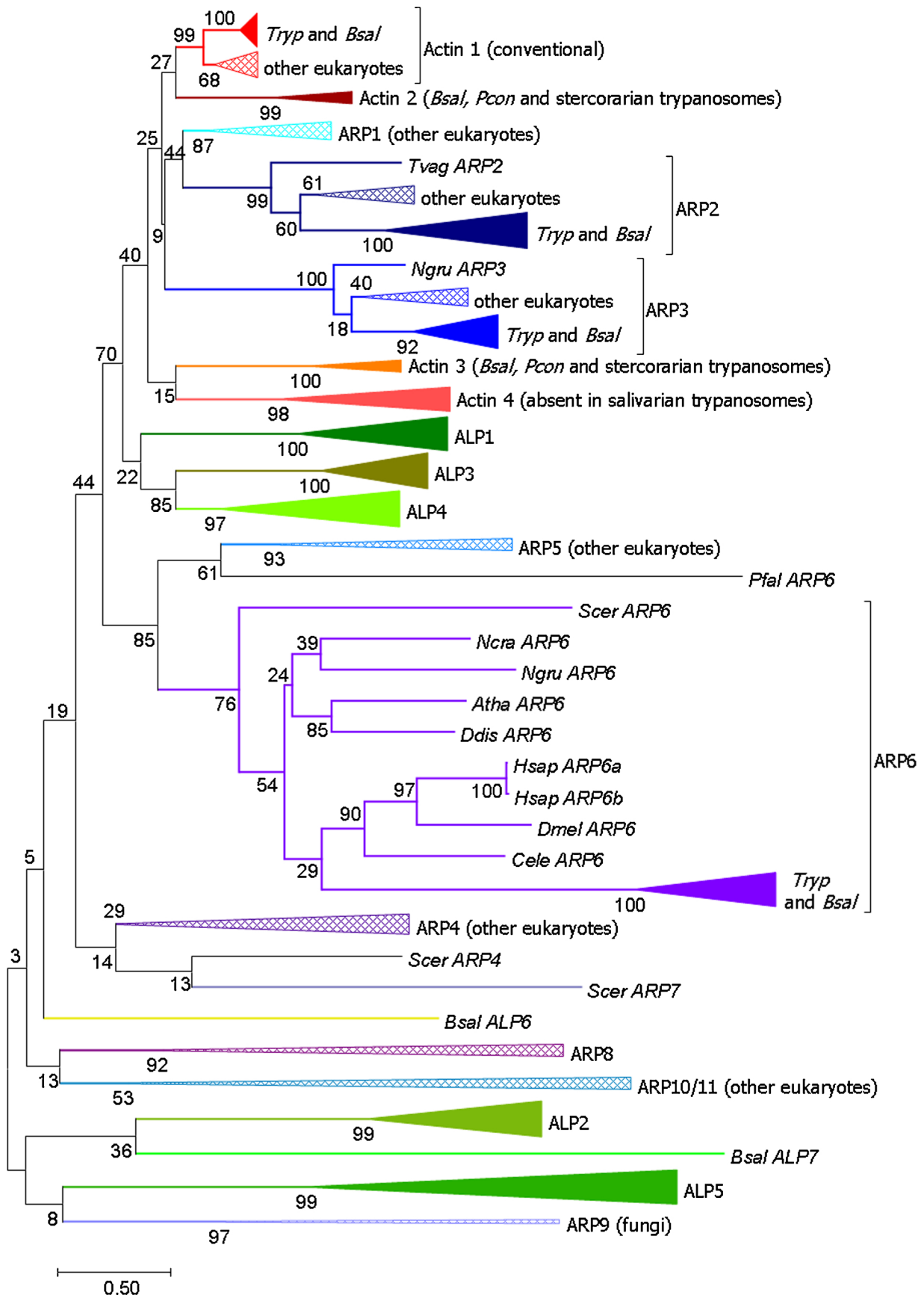
### 3. Actins, actin-related proteins and actin-like proteins in trypanosomatids

To date, there are many trypanosomatid genome sequences available at the TriTrypDB database (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). We have kept the nomenclature used in a previous publication where the ALPs numbers used corresponded to those already given to the *T. brucei* ALPs in the original genome database at the Wellcome Sanger Institute previous to the release of the first TriTrypDB [5]. The four loci annotated as encoding for putative actins in the *T. cruzi* genome database were numbered only to identified them [5]. The majority of trypanosomatids encode for, at least, one conventional actin, five ALPs and three actin-related proteins from the ARP2, ARP3 and ARP6 subfamilies (See Supplementary Table 1). In *T. rangeli* it is not possible to identify either ARP6 or ALP5. Also, in two other genomes, one of the actin family sequences has been lost (*Endotrypanum monterogeii* lacks ARP3 and *T. congolense* lacks ALP1). In *Crithidia fasciculata*, the gene annotated as encoding for ALP1 has four early stop codons and therefore would express a shorter protein of 325 amino acids instead of the 431 amino acids of the predicted sequence annotated in TriTrypDB. Additional actins are identified in some of these organisms. Actin 4 (Act4) is present in all trypanosomatids with the exception of the salivarian trypanosomes (*T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* and *T. evansi*) and Act2 and Act3 are present only in *Paratrypanosoma confusum* and in the stercorarian trypanosomes (*T. cruzi*, *T. theileri*, *T. grayi*, and *T. rangeli*) [21]. Homologues to all these sequences are identifiable in the draft version of the genome of *Bodo saltans*, a free-living organism belonging to the sister order Bodonida, that is considered as one of the closest groups to trypanosomatid parasites. These data suggest that all these genes were already present in the common ancestor of these organisms. In addition, *B. saltans* also encodes for another two ALPs that are not present in any trypanosomatid genomes available today. Blast analysis of Act2 to Act4 and of ALPs 1–7 failed to identify homologues outside these taxonomic clades.

Evolutionary analysis using actin family sequences from bona fide conventional actins, ARPs homologues, known protist ARPs, *B. saltans* and 17 trypanosomatid species confirms that Act1 is a homologue of conventional actins of metazoans (Supplementary Table 1, Fig. 2). It also shows that Act2 is a paralogue of Act1. As expected, trypanosomatid ARPs2, ARPs3 and ARPs6 grouped with members of these subfamilies from other eukaryotes. Acts3, Acts4, ALPs1, ALPs3 and ALPs4 were grouped in different clades within a larger Act1 clade. *B. saltans* ALP6 did not group with any of the ARPs. Trypanosomatid ALPs2, ALPs5 and *B. saltans* ALP7 do not show any significant grouping with the analysed actin subfamilies. As actins 3 and 4 do not group with the conventional actins they should probably be considered as actin-like proteins.

Comparison of the amino acid sequence of *T. cruzi*-Act1 (TcAct1) with the rest of the *T. cruzi* actin-family demonstrated that they were highly diverse with percentages of identity that varied from 22% (compared to ALP2 and ARP6) to 51% (compared to TcAct2) [5]. With the exception of TcALP2 (372 aa) and TcALP5 (327 aa), all the sequences were larger than that of TcAct1 (376 aa). Modelling of the tertiary structures of all the *T. cruzi* actin family proteins was performed using the I-TASSER suite [24]. Even when these proteins have significantly different primary sequences (compared to human and *Saccharomyces* actins), all the obtained structural models were compatible with the conservation of the actin fold (Fig. 3). The TcAct1 and TcARP3





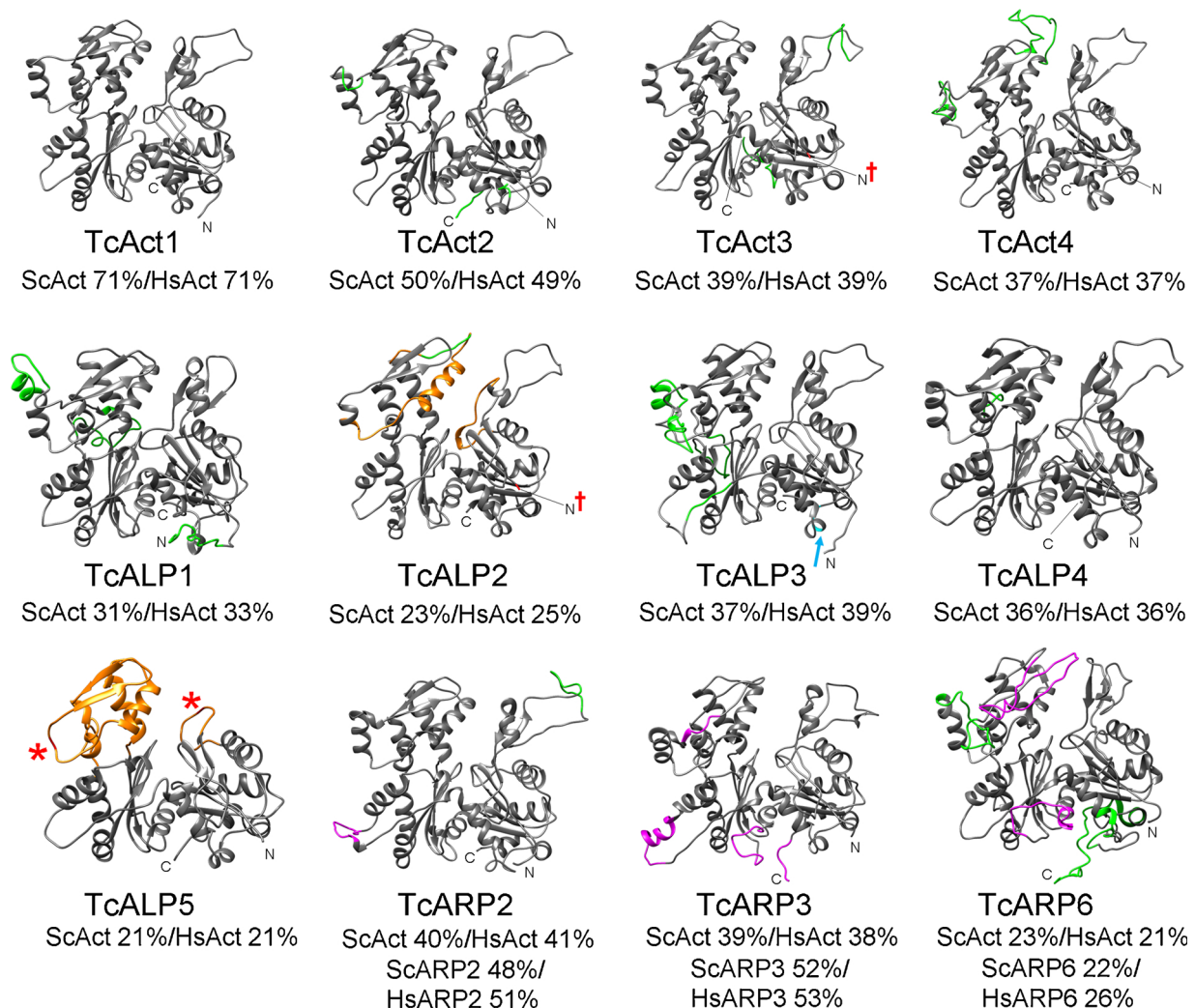
(caption on next page)

**Fig. 2.** Maximum likelihood tree of trypanosomatid actins, ARPs, and ALPs. The tree was inferred by using the Maximum likelihood method based on the Le\_Gascuel\_2008 model using MEGA7 [22,23]. The tree with the highest log likelihood (-105988.6824) is shown. Bootstrap values are shown below the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 267 amino acid sequences. Colours indicate if the sequences were annotated as actins (shades of red), as ALPs (shades of green) or as ARPs (shades of blue/purple). Solid colours indicate trypanosomatid sequences and hashed colours were used for other eukaryotic sequences. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

models were similar to the mammalian homologues, without insertions or deletions. Analyses of the rest of the models showed that in TcALP2 there is a small deletion of the amino-terminal end (marked with † in Fig. 3) and an insertion in subdomain 4 (shown in green) within a very divergent primary sequence (shown in gold) that is, nevertheless, partially conserved structurally. In TcALP5, two deletions (red asterisk) are present within highly divergent regions of the protein (shown in gold and located at subdomains 2 and 4). The three ARPs contained the insertions typical of these families of proteins (shown in magenta in Fig. 3). As expected for their larger size, many trypanosome specific insertions were identified in these *T. cruzi* proteins, including ARP3 and ARP6, most frequently within subdomain 4.

#### 4. Biological properties of trypanosomatid Act1

Act1 or conventional actin is the most studied trypanosomatid actin. It is ~70% identical to human  $\beta$ -actin or yeast actin (Fig. 3). Amino acid residues involved in the binding of ATP and cation, as well as binding to phalloidin and to toxins known to affect polymerization of the protein, are conserved [25]. Two of the three main amino acids involved in the interaction between actin and DNase I (Gly41, Val42 and Met43 of human  $\beta$ -actin) are replaced by Gln43, Ala44 and Met45 in trypanosomatid actins. These substitutions probably explain why the DNase I binding property of the majority of eukaryotic actins is not present in trypanosomatid actins [25,26]. This characteristic is not exclusive of trypanosomatid actins as the actins of *Entamoeba* and *Tetrahymena* do not bind DNase I either [27, 28].



**Fig. 3.** Theoretical 3D models of *Trypanosoma cruzi* actin family proteins. Differences between human  $\beta$ -actin and *T. cruzi* actins with insertions shown in green and the position of deletions indicated with red asterisks (minimum of 6 residues inside the molecule); † in red indicates N-terminal deletions (minimum of 6 residues). Highly divergent regions are depicted in gold. In TcALP3, the blue arrow points to the region that contains the flagellar localization sequence. In ARPs, conserved insertions with ARPs from *Homo sapiens* (Hs) or *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) are in magenta, specific insertions for *T. cruzi* are in green. Below each actin are indicated the percentages of identity with respect to actins from Sc and Hs and to the corresponding ARP from Sc and Hs. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

It has been shown that, in model organisms, polymerization of conventional actin is partly regulated by its ATPase activity and its binding to cations. In trypanosomatids, *in vitro* actin polymerization studies have only been performed with recombinant *L. donovani* Act1 (rLdAct1). Like other conventional actins, rLdAct1 optimal polymerization was obtained in the presence of  $Mg^{2+}$  and ATP. Unlike conventional actins, rLdAct1 failed to polymerize only in the presence of  $Mg^{2+}$  and its ATPase activity seemed to be faster (0.6  $\mu M$  Pi/min vs. 0.2  $\mu M$  Pi/min) than that of rabbit muscle actin (RbAct), suggesting an intrinsically high dynamic turnover of actin subunits in the polymers [25]. Furthermore, the critical concentration of monomeric actin (i.e. the concentration of actin above which polymerization occurs) of rLdAct1 was ~3–4-fold lower than that of conventional actins. The critical concentration of rLdAct1 in the presence of cytochalasin D, a toxin that decreases the polymerization at the barbed ends but still allows assembly at the pointed ends, was increased, suggesting that the mechanism underlying the assembly of actin filaments may be similar to that of conventional actins [25]. In contrast, the critical concentration of rLdAct1 in the presence of latrunculin B, a toxin that binds to actin monomers near the nucleotide binding cleft preventing polymerization, did not change suggesting that latrunculin B does not affect the polymerization of rLdAct1 under *in vitro* conditions [25]. Electron microscopy of rLdAct1 filaments assembled *in vitro* demonstrated that actin filaments predominantly assembled as bundles and not as classical microfilaments, suggesting that monomer-monomer interactions within and between protofilaments in LdAct1 may be different than conventional actins [25]. Interestingly, the tendency of LdAct1 to form bundles may result in the masking of the phalloidin binding sites preventing phalloidin staining of the filaments.

In all the trypanosomatids studied so far, Act1 is expressed constitutively [26, 29, 30]. The use of antibodies raised against the homologous recombinant versions of Act1 has allowed for the identification of differences in the subcellular distribution of the protein, not only in different species, but also in the various developmental stages of these parasites. In *T. cruzi* epimastigotes, actin is predominantly located at the base of the flagella, and as patches along the flagella; in trypomastigotes it is dispersed throughout the cytoplasm and, in amastigotes, the distribution is heterogeneous with increased concentrations near the parasite surface (Fig. 5) [5]. In *L. donovani* promastigotes and amastigotes, actin is present largely in a granular form [31]. Immunoelectron microscopy studies identify this protein in the flagellar pocket, flagellum, nucleus, kinetoplast, as well as associated with organelle membranes (nuclear, vacuolar and cytoplasmic) [31]. In *T. brucei*, Act1 appears homogeneously distributed throughout the cell body in the procyclic forms, but in the bloodstream forms it is found concentrated at the flagellar pocket [30], the site where all the parasite endocytic activity occurs.

Trypanosomatid Act1 participates in endocytosis as conventional actins do, but it is also involved in unique processes such as binding and nicking of DNA. In trypanosomatids, endocytosis occurs via different cellular structures. In *T. cruzi* epimastigotes this process occurs primarily through a specialized organelle known as the cytostome, whereas in *T. brucei* endocytosis occurs at the flagellar pocket. The endocytic activity also varies during the life cycle of these organisms. In *T. brucei*, bloodstream forms have high rates of endocytosis, whereas in procyclic forms appears to be absent or significantly reduced [30,32]. In *T. cruzi*, endocytic activity is high in epimastigotes whereas in trypomastigotes, a stage that does not have cytostome, is low [33, 34]. In *Leishmania mexicana*, endocytosis is downregulated in the promastigote stage when compared to both metacyclic promastigotes and amastigotes [35]. The actual role of actin in endocytosis has only been evaluated in *T. cruzi* and *T. brucei*. In *T. cruzi*, treatment of epimastigotes with cytochalasin B significantly decreased endocytosis [36, 37]. In *T. brucei*, latrunculin A, a more potent toxin than latrunculin B, is toxic to bloodstream forms but had no effect on procyclic cells [30]. The role of actin in mediating latrunculin toxicity was confirmed when depletion of

TbAct1 expression by RNA<sub>i</sub> resulted in the inhibition of transferrin uptake and produce an enlarged flagellar pocket specifically in the bloodstream forms. Besides participation of actin in endocytosis, an unusual property of actin has been described for LdAct1. Using *in vitro* assays, it was demonstrated that recombinant LdAct1 bound directly to kinetoplast DNA (mitochondrial DNA) and relaxed it, observation that lead to the proposal that it is involved in the kinetoplast remodelling during cell division [38]. Despite being the unique eukaryotic actin with a known DNA-binding activity, the possible role for this protein in the nucleus has not been addressed.

Among the factors known to affect actin polymerization is the addition of chemical covalent modifications of its amino acids. Today, more than 140 post-translational modifications have been described in eukaryotic actin residues that regulate the monomer-polymer equilibrium and organization of actin, and direct cellular processes [39, 40]. Some of these modifications are quantitative and reversible, whereas others are rare, affecting only a minority of the molecules present in the cellular actin pool [40]. Specific post-translational modifications of conventional actin have been identified on 94 different side chains which constitute about 45% of the residues that can be modified. The most studied modifications are the acetylation of its amino-end, arginylation of amino-end, and phosphorylation and oxidation of various residues. In trypanosomatids, high throughput proteomic studies have only identified the phosphorylation of Ser48 of LdAct1 [41], the phosphorylation of Ser234 and Ser236 of TbAct1 [42] and the acetylation of Ser2 and Lys19 of TcAct1. However, 2D immunoblotting of *T. cruzi* cellular lysates from epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes using a polyclonal antibody against TcAct1, detected five different protein species in each parasitic stage, that do not correspond to cross-reactivity with either TcAct2, TcAct3 and TcAct4 suggesting that the list of post-translational modifications of the protein will probably increase [5, 21]. Discerning the chemical nature and function of these protein species remains an important issue that needs to be addressed.

## 5. Characteristics of trypanosomatid ARPs

Phylogenetic analysis supports the presence of three of the major ARP subfamilies in trypanosomatids: ARP2, ARP3 and ARP6 (Fig. 2). When compared to Act1, the presence of characteristic insertions for each ARP subfamily in the trypanosomatid sequences support this classification (Fig. 3). ARP2 and ARP3 form heterodimers that interact with five proteins (ARPC1–5) to form the ARP2/3 complex, which nucleate actin to form branched networks of actin filaments. Sequence comparison of the putative ARP2/3 subunits, revealed that *Leishmania* has a divergent ARP2/3 [3]. *Trypanosoma* ARP2 and ARP3 are more similar with the orthologues from human cells and yeast than that encoded by *Leishmania*. This could be due to the loss of two of the canonical ARPC (ARPC2 and 3) from the *Leishmania* genomes, which may have led to variation in ARP2 and ARP3 to form a functional complex with ARPC-like, a protein that is encoded by a *Leishmania*-specific gene (TriTrypDB ID: LmjF.10.1000) [4]. Although the gene is not identifiable within the genus *Trypanosoma*, it is present in *C. fasciculata*, *Leptomonas pyrrocoris* and *Leptomonas seymouri*, trypanosomatids more closely related to *Leishmania* than to species of the genus *Trypanosoma* [43]. The ARP2/3 complex is unique in its ability to both nucleate microfilaments and organize them into branched networks [44]. By itself, the ARP2/3 complex is an inefficient nucleator, but its activity can be stimulated by specific proteins. In mammalian cells, the largest group of activators of actin nucleation are members of the WASP/WAVE superfamily. Apparently, in trypanosomatids, the only encoded member of these superfamily is WASH [45]. Mammalian WASH is found as a complex with four proteins, and participates in early endosome biogenesis through ARP2/3 activation and the subsequent actin polymerization [46]. Although WASH has not been studied in any trypanosomatid, given that Act1 is essential for endocytosis, a conserved role for this protein in this process is likely. Myosin 1 is an activator of

ARP2/3 in yeast and therefore it could potentially work as an activator in trypanosomatids [47]. Besides ARP2 and ARP3, ARP6 is the other ARP subfamily present in trypanosomatids. In eukaryotes, ARP6 is predominantly localized in the nucleus and it is an essential component of the SWR1/SRCAP chromatin remodelling complex, which deposits the histone variant H2A.Z into chromatin [48]. In the promastigote stage of *L. donovani*, an overexpressed version of LdARP6 localized in the nucleus and co-precipitated with chromatin in ChIP assays. Repeated attempts failed to detect actin in the chromatin that was immunoprecipitated with anti-LdARP6 antibodies, suggesting that actin may not be part of the SWR1 complex in this organism. It would be interesting to unravel the role of ARP6 in the nucleus, and to identify the protein complexes in which it participates given the unusual mechanisms for trypanosomatid gene expression regulation ([49] for a review).

## 6. Characteristics of trypanosomatid non-conventional actins

As mentioned before, up to eight genes encoding for actin family proteins that appear lineage-specific have been identified in these organisms (Act2–4 and ALP1–5). Some trypanosomatids lack some of these genes, the reasons for these secondary losses remains unknown. Understanding their function and regulation will require specific experimental evaluation.

Act2, a paralogue of Act1 (Fig. 2), is only present in trypanosome species members of the stercoaria group, in *P. confusum* and in the free-living common ancestor *B. saltans*, and hence it may represent a duplicated gene from the conventional actin with a subsequent functional diversification. TcAct2 is constitutively expressed as a cytosolic protein with a subcellular distribution that is different of that of TcAct1 (Fig. 4) [21]. 2DE-immunoblotting identified the presence of three isoforms with a more acidic pI than the TcAct1.

Besides Act1, ALP1, ALP3 and ALP4 have also been identified as part of the flagellar proteome in *T. brucei* and *L. mexicana* [50, 51]. Furthermore, fluorescent tagging of TbALP1, TbALP3 and TbALP4, performed within a genome wide effort to elucidate the location of all *T. brucei* proteins, demonstrated their incorporation into the flagellum (<http://tryptag.org/>; Fig. 5) [52, 53]. These results are in accordance with a previous study where an overexpressed and tagged version of TbALP3 showed a cytoplasmic and flagellar distribution [54]. Analysis of mutants of this protein identified three amino acids that were essential for the incorporation of the protein to the flagellum (His412, Leu413 and Ala414; see Fig. 3). These amino acids are conserved in salivarian trypanosomes but Ala414 is substituted by Thr or Val in the rest of trypanosomatids. In *L. donovani*, antibodies against LdALP3 demonstrated its presence in flagella but also colocalized with the mitochondrion [55]. Consistent with this cellular distribution, the depletion of its expression generated a decrease in the mitochondrial membrane potential and in the ATP content. LdALP3 is larger than its orthologue in *T. brucei* (483 vs. 433 amino acids), which is caused by insertions that possibly confers the distinctive properties to the protein. A similar specie-specific functional diversification for the other ALPs is likely.

## 7. Is the repertoire of trypanosomatid actin-binding proteins reduced or incomplete?

The structure, dynamics and function of conventional eukaryotic actins is regulated by a variable set of actin-binding proteins. The activities of these proteins include: nucleation of actin polymerization; capping, depolymerizing and severing of actin filaments; promoting the turnover of actin subunits in the actin filaments; and promoting the formation of actin-based networks or bundles and stabilizing these structures ([56] for a review]). Phylogenetic evidence suggests that,

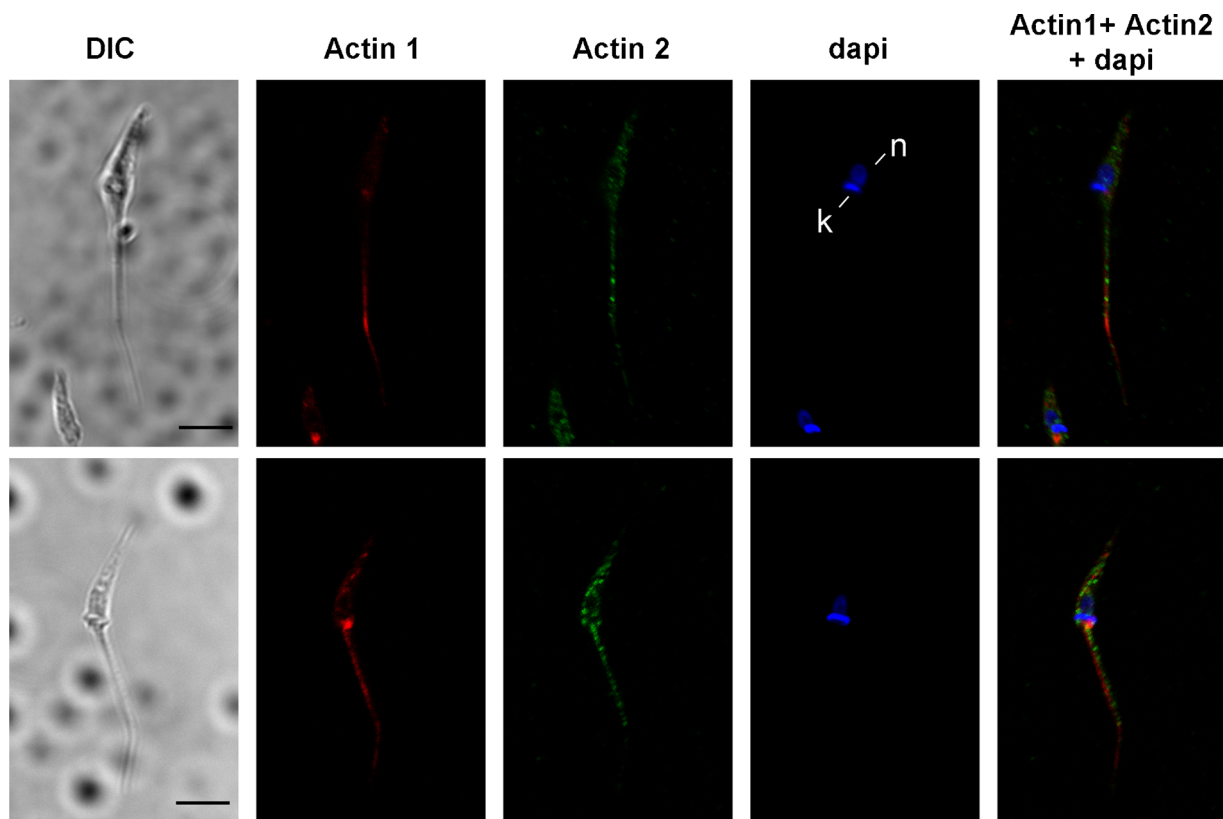


Fig. 4. Differential localization of actins 1 and 2 of *Trypanosoma cruzi* in epimastigotes. Specific antibodies against actin 1 (red) [5] and actin 2 (green) [21] of *T. cruzi* show differential distribution and no co-localization between these actins, by confocal microscopy. n = nucleus, k = kinetoplast. Scale bar = 5  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).



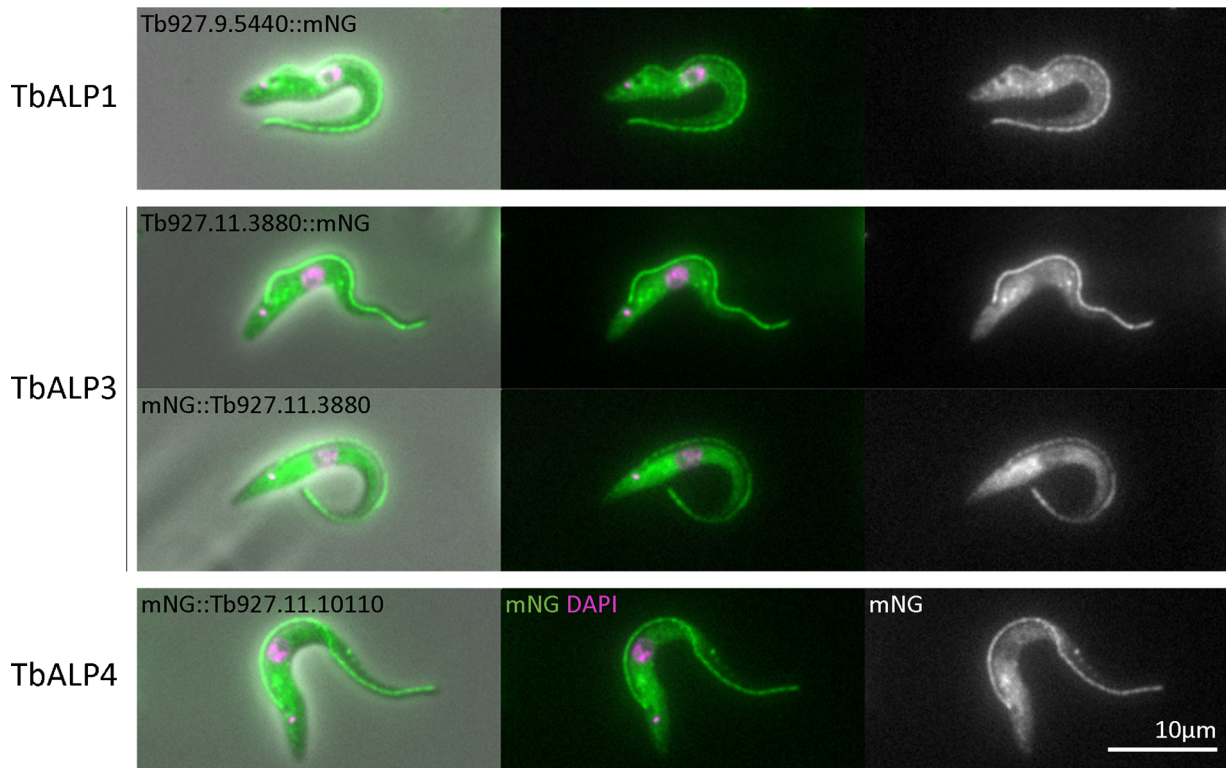


Fig. 5. Distribution of some ALPs of *Trypanosoma brucei*. GFP fusion proteins to TbALP1, TbALP3 and TbALP4 demonstrated their localization in the cytoplasm, with enhanced paraflagellar (TbALP1) or axonemal (TbALP3 and 4) distribution, as indicated in TrypTag website. Scale bar = 10 µm. Images courtesy of Richard J. Wheeler at TrypTag.

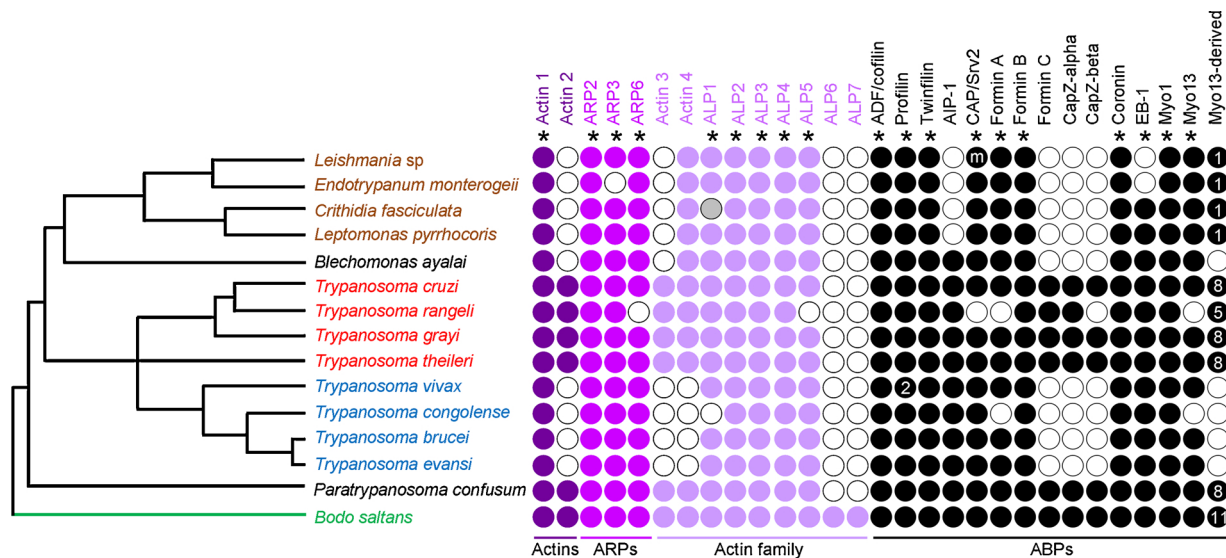


Fig. 6. Phylogenetic representation of trypanosomatids and its relationship with the presence (solid circles) or absence (clear circles) of proteins that constitute the actin cytoskeleton in these organisms. Dark purple circles indicate conventional actins, light purple indicates ARPs and lilac circles indicate actin-family proteins. Asterisk indicate core proteins, that is, those that are widely distributed among all major trypanosomatid lineages. Numbers inside black circles indicate the number of myosin-13 derived myosins, and the presence of 2 profilins in *T. vivax*. The gray circle indicates presence of a gene with premature stop codons. The “m” indicates that the gene is absent in *L. mexicana*. The free-living kinetoplast of the *Bodo* genus (outgroup) is shown in green line and in green letters. Species of the Trypanosomatidae family are shown in black lines. Species of the Leishmaniinae subfamily are written with brown letters. Stercorarian trypanosome species are written with red letters whereas salivarian trypanosome species are written with blue letters. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

beside the conventional eukaryotic actin, a set of ABPs were most likely present in the genome of the last common eukaryotic ancestor including profilin, formins, the ARP2/3 complex and several classes of myosin motors [57]. It has been proposed that this early co-evolution of ABPs ‘locked in’ actin’s amino acid sequence and structure during

eukaryogenesis. However, during evolution, the number of ABPs continue to rise and more than 150 proteins with ABP domains can be found in model organisms [58]. In the genome of the majority of trypanosomatids, a reduced core of 10 canonical ABPs were identified: four proteins that promote actin turnover, two actin nucleating proteins

from the formin family, two myosins and two proteins that promote the formation of bundles and networks of microfilaments and that also interact with microtubules (Fig. 6; Supplementary Table 2). The presence of an increased number of ABPs in *T. cruzi* including a third formin, CapZ (formed by two subunits) and several myosins, has been reported [4, 59]. With the availability of a large number of other trypanosome genomes at TriTrypDB, it was possible to determine the distribution of both actin-family proteins and ABPs in other species. *P. confusum* and stercorarian trypanosomes also encode for the third formin, eight more myosins (except *T. rangeli* that has only five extra myosins), and CapZ [4, 6] (Supplementary Table 2). Species of the Leishmaniinae subfamily encode for only one extra myosin. All species with the exception of those of the Leishmaniinae subfamily, encode for an Actin-Interacting protein 1 (AIP-1). EB-1 (a protein that crosslinks actin and tubulin cytoskeletons) is not present in *Leishmania* [3] and *Endotrypanum* genera (Fig. 6). Homologues to all these proteins are also identified in *B. saltans*, suggesting that they were present in their common ancestor and that the absence of some genes in specific lineages represent a secondary loss.

The possibility that these canonical ABPs interact only with Act1, or if they can interact with one or more of the remaining sets of the actin family proteins, needs to be evaluated experimentally. It is likely that Act2, Act3 and Act4 interact with either CapZ or any of the eight trypanosomatid specific myosins as they have the same distribution within the different taxonomic clades and are probably involved in cellular processes that differentiated during the speciation of these species. To date, only a few of ABPs have been characterized in trypanosomatids, including ADF/cofilin family members, coronin, profilin and two of the myosins.

Among the ABPs that can initiate the formation of new actin filaments in trypanosomatids are the formins. Formins regulate actin assembly by nucleating and directing the elongation of unbranched actin filaments. They promote the formation of a variety of actin structures including stress fibers, filopodia, and lamellipodia. They can also modulate the stability and organization of microtubules. This dual activity allows them to coordinate the activity of these two cytoskeletal networks and thereby modulate various cellular processes including Golgi assembly, centrosome assembly, centriole duplication, and centrosome positioning [60, 61]. The majority of trypanosomatids encode for two formins, with stercorarian trypanosomes and *P. confusum* encoding for a third. None of these proteins has been studied.

All trypanosomatids examined today encode for four proteins involved in actin turnover: profilin, ADF/cofilin, twinfilin and CAP/Srv2. With the exception of species within the Leishmaniinae subfamily, all trypanosomatids also encode for an AIP-1. There is little information about their role in the regulation of the actin cytoskeleton in these organisms. Profilins participate in actin dynamics by inhibiting spontaneous polymerization of dimers and by favoring monomers addition to barbed ends. Profilins have < 25% identity among different kingdoms, but the 3D structure is highly conserved and *T. cruzi* profilin (TcPROF) is not the exception. TcPROF is expressed in different developmental stages of the parasite and several potential ligands have been detected, suggesting that TcPROF is capable to interact with actin and with classical and novel ABPs, as some of the proteins identified were specific of *T. cruzi* [62]. Expression of profilin in *T. brucei* has also been demonstrated at mRNA level, and the gene encoding for this protein can complement a yeast mutant lacking profilin [63].

Members of the ADF/cofilin family severs actin filaments creating free ends for depolymerization. ADF/cofilin from *L. donovani* (LdCOF) conserves the canonical depolymerizing activity *in vitro* and *in vivo*, despite being only 26–30% identical with respect to orthologues from yeast or human cells [64]. Reverse genetic approaches have shown that the actin regulation by this protein is required for important cellular processes. Both, the deletion of the two LdCOF alleles by targeted gene replacement and overexpression of a negative mutant of the protein cause defects in flagellar structure and movement [64, 65]. Cells

depleted of the LdCOF expression also grow slowly due to a delay in the cell cycle, which is correlated with defects in early stages of mitosis and in endocytic activity [66]. In *T. brucei*, the solution structure of ADF/cofilin (TbCOF) was determined and demonstrated its interaction with actin as well as its capacity to sever filaments. TbCOF distribution was observed throughout the cytoplasm, similar to actin, suggesting conservation of canonical functions [67]. More recently, another member of the ADF/cofilin family, twinfilin (which binds to monomeric actin but do not sever F-actin) was demonstrated to be enriched at the nucleolus and basal body in *Leishmania*, instead of the cortical regions like in yeast. During cell division, this protein is redistributed to the mitotic spindle, suggesting that *Leishmania* twinfilin (LdTWTF) participates in DNA synthesis and in mitotic spindle elongation, thus contributing to karyokinesis in *Leishmania*. Although all twinfilins characterized so far have been shown to interact with actin, *in vitro* studies using purified *Leishmania* proteins failed to demonstrate the interaction of LdTWTF with monomeric or filamentous actin, suggesting that its function in nucleus might be actin independent [68].

Of the two ABPs known to promote the formation of bundles and networks of microfilaments in trypanosomatids, only coronin has been studied. *L. donovani* coronin (LdCOR) has conserved functional properties but low sequence identity (26–33%) with respect to the yeast and human homologues. Typically, this protein binds to actin filaments and microtubules, and promotes ARP2/3-dependent actin polymerization [69]. LdCOR colocalizes with filament-like structures of LdAct1, which increased in number when LdCOR is overexpressed [70]. In dividing cells, LdCOR colocalized with a marker for newly synthesized microtubules (tyrosinated  $\alpha$ -tubulin), a motor protein of the kinesin family, and only partially with LdAct1. A decrease in the expression of this protein produces cells with alterations in the organization of the sub-pellicular corset of microtubules during cell division [71]. Although a contribution of LdAct1 in this phenotype was not found, it is possible that coronin represents a link between the actin and tubulin-based cytoskeletons in trypanosomatids.

Myosins are molecular motor proteins which function is regulated by hydrolysis of ATP and that bind to actin filaments. They belong to a very large family with > 30 different classes. Trypanosomatids, in general, encode for two myosins: myosin 1 (Myo1), representative of class I that is found in almost all organisms, and a kinetoplastid-specific class. The kinetoplastid myosin was initially named as trypanosomatid specific class XXI, but after a phylogenetic study of myosins, it was reclassified as class 13 but remained being specific of kinetoplastids [72]. *T. congolense* encodes only for Myo1 probably due to secondary loss [6]. *P. confusum* and the stercorarian trypanosomes, with the exception of *T. rangeli*, also encode for eight paralogues of Myo13 (Myo A–H). *C. fasciculata*, *Leptomonas* and all species within the *Leishmania* genus encode, besides Myo1 and Myo13, for a divergent paralogue of myosin G (MyoG<sub>d</sub>). All these myosins are also present in *B. saltans*, which has four additional myosin genes, not present in trypanosomatids [6].

In model eukaryotes, myosin 1 participates in exocytosis, endocytosis, intracellular membrane trafficking [73]. In trypanosomatids, only *T. brucei* Myo1 (TbMyo1) has been studied successfully [74]. Similar to the localization of actin in *T. brucei*, TbMyo1 is expressed differentially along its life cycle: in bloodstream forms, spots between the nucleus and the kinetoplast were detected (using specific antibodies against TbMyo1), that associated with vesicle traffic; in procyclic forms, a weak and uniform signal was detected throughout the cellular body. Impairment of the actin cytoskeleton with latrunculin A or by RNAi to actin, also impaired TbMyo1 distribution in bloodstream forms [74]. Use of RNAi against TbMyo1 showed that this myosin was essential for the endocytic traffic and survival in bloodstream forms, but no for the procyclic forms. In bloodstream forms, TbMyo1 knock down induced altered morphologies with enlarged flagellar pockets (indicating reduced endocytic activity), the cellular division stopped and, eventually, the cells died [74].

Myo13 has been mainly studied in *Leishmania* (LdMyo13). Sequence analysis recognized the presence of an N-terminal motor domain, a neck region with several IQ calmodulin binding motives and a C-terminus. At the end of the motor domain, a coiled-coil region with a strong propensity to dimerize was detected (aa 730–810 aa). Partially overlapping with this coiled-coil region, a PX domain, known to bind phosphatidylinositol 3-phosphates, was also identified (aa 705–753). Following the PX domain, and contained within the coiled-coil region, an IQ calmodulin binding site (aa 754–769) was also recognized [75]. Depending on the presence/binding of calmodulin, *in vitro* studies demonstrated that LdMyo13 can adopt two states, monomeric and dimeric. Binding of LdMyo13 to a single calmodulin produced a monomeric state with the ability to move actin filaments. In the absence of calmodulin, non-motile dimers that crosslinked actin filaments were formed [75]. The monomeric, but not the dimeric state, was able to bind lipids suggesting that calmodulin-binding monomers might transport lipid cargo in the parasite. Electron microscopy studies suggested that this myosin binds along the length of actin filaments but tends to accumulate at the filament ends. Using a gliding filament assay, it was demonstrated that calmodulin binding is necessary for the translocation of actin filaments and that the sliding velocity is insensitive to salt and free calcium [76].

LdMyo13 appears to participate in flagellum assembly and cell survival. LdMyo13 is expressed in both promastigotes and amastigotes stages of *L. donovani*, with a reduced expression (~20-fold less) in amastigotes compared to promastigotes [77]. Its expression varied during growth of promastigotes with a greater expression at stationary phase compared to the early log-phase [78]. Detergent-treatment of promastigotes showed that LdMyo13 is present in the insoluble fraction, associated to the flagellar cytoskeleton, but also in a detergent-soluble fraction [77]. Analysis of the subcellular distribution in promastigotes by immunofluorescence showed that LdMyo13 is concentrated at the base of the flagellum, colocalizing with the proximal region of the paraflagellar rod. This flagellar localization seemed to be independent of actin but dependent of the myosin tail domain [77]. Association of actin with the head domain of LdMyo13 was demonstrated by coimmunoprecipitation assays [78]. Attempts to obtain null mutants resulted in changes in ploidy that allowed the parasite to retain alleles of the wild-type locus, as well as drug resistance markers, an event frequently described for *Leishmania* essential genes [78, 79]. Heterozygous mutants (LdMyo13<sup>+/-</sup>) presented aberrant morphologies (short and stumpy cells) with reduced flagella, lack of the paraflagellar rod, enlargement of the flagellar pocket and impairment of flagellum assembly and intracellular transport (indicating defective endocytosis). Episomal complementation restored the cells to normality [78].

## 8. Conclusions and perspectives

In eukaryotes, regulation of the actin cytoskeleton depends on the actin variants involved, on the post-translational modifications of their sequences and on their interaction with ABPs. Conventional actins are able to polymerize but the homologues of the *Saccharomyces* ARPs (with the exception of ARP1), do not polymerize. The specific functions of both actins and ARPs proteins are conserved along the different taxonomic clades. Trypanosomatid Act1, as demonstrated in *Leishmania*, does polymerize but the architecture of the microfilaments is unconventional as it tends to form bundles rather than classic filaments. Act1 participates in the process of endocytosis as it is expected of conventional actins, but does not appear to participate in other well-known functions of this protein such as cytokinesis. Trypanosomatid genomes encode for actin-related proteins involved in microfilament nucleation (ARP2 and ARP3) and in gene expression regulation (ARP6). They also encode for a large number of atypical actins that are conserved in structure but are highly divergent in sequence. Many appear to be lineage specific such as ARP7 and ARP9 of *Saccharomyces* and the

ALPs of Apicomplexa [18, 20, 80]. Therefore, it is not possible to infer function based on their sequences and they need to be experimentally evaluated.

The common ancestor of *B. saltans* and trypanosomatids encoded for multiple actins and ALPs, and the regulation of the actin cytoskeleton appears to have been coordinated by a limited set of ABPs. However, the nucleation of new actin filaments is probably complex as three formins are present. The interaction of microfilaments with a large variety of motor myosins (Myo1, Myo13 and twelve Myo13-derived), potentially contributes to generate diversity of function and regulation of the actin cytoskeleton. *B. saltans* has two ALPs and four myosins that are not identifiable in any of the trypanosomatids analysed. The sequences of other kinetoplastids and eubodonids is needed to determine if these genes are paralogues that appeared after the divergence of trypanosomatids or if they were already present in the common ancestor. It appears that secondary losses of actins and ABPs occurred during speciation and evolution of parasitism in trypanosomatids. Differences in the type and number of specific losses are identified between the major trypanosomatid lineages. These differences should reflect divergence in the function and regulation of their actin cytoskeleton that would need to be evaluated in each case. The complexity of the trypanosomatid actin cytoskeleton is probably underestimated as novel actin-binding proteins that interact with both conventional actins and non-conventional actins will more likely be identified as more data becomes available and the functions of the large number of hypothetical proteins present in these organisms become known.

## Data accessibility

This article has no additional data.

## Funding

AMC has received funding for the study of *T. cruzi* actins by PAPIIT (IN207112) and for the study of profilin by CONACyT (grant 239715). Andrea Vizcaíno-Castillo is a doctoral student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a scholarship from CONACyT (CVU: 130460). Juan Felipe Osorio-Méndez obtained his PhD at the Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a scholarship from CONACyT (CVU: 3696173).

## Acknowledgements

We thank Dr. Richard Wheeler for kindly providing the images from TrypTag database.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111278>.

## References

- [1] J.C. Vidal, W. De Souza, Morphological and functional aspects of cytoskeleton of trypanosomatids, *Cytoskelet. Struct. Dyn. Funct. Dis.* (2017) 55–71, <https://doi.org/10.5772/66859>.
- [2] K. Gull, The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites, *Annu. Rev. Microbiol.* 53 (1999) 629–655, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.629>.
- [3] M. Berriman, E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renault, D.C. Bartholomeu, N.J. Lennard, E. Caler, N.E. Hamlin, B. Haas, U. Böhme, L. Hannick, M.A. Aslett, J. Shallom, L. Marcello, L. Hou, B. Wickstead, U.C.M. Alsmark, C. Arrowsmith, R.J. Atkin, A.J. Barron, F. Bringaud, K. Brooks, M. Carrington, I. Cherevach, T.J. Chillingworth, C. Churcher, L.N. Clark, C.H. Corton, A. Cronin, R.M. Davies, J. Doggett, A. Djikeng, T. Feldblyum, M.C. Field, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance, D. Harper, B.R. Harris, H. Hauser,



- J. Hostetter, A. Ivens, K. Jagels, D. Johnson, J. Johnson, K. Jones, A.X. Kerhornou, H. Koo, N. Larke, S. Landfear, C. Larkin, V. Leech, A. Line, A. Lord, A. MacLeod, P.J. Mooney, S. Moule, D.M.A. Martin, G.W. Morgan, K. Mungall, H. Norbertczak, D. Ormond, G. Pai, C.S. Peacock, J. Peterson, M.A. Quail, E. Rabinowitz, M.A. Rajandream, C. Reitter, S.L. Salzberg, M. Sanders, S. Schobel, S. Sharp, M. Simmonds, A.J. Simpson, L. Tallon, C.M.R. Turner, A. Tait, A.R. Tivey, S. Van Aken, D. Walker, D. Wanless, S. Wang, B. White, O. White, S. Whitehead, J. Woodward, J. Wortman, M.D. Adams, T.M. Embley, K. Gull, E. Ullu, J.D. Barry, A.H. Fairlamb, F. Opperdoes, B.G. Barrell, J.E. Donelson, N. Hall, C.M. Fraser, S.E. Melville, N.M. El-Sayed, The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, *Science*. 309 (2005) 416–422, <https://doi.org/10.1126/science.1112642>.
- [4] L.D.B. De Melo, C. Sant'anna, S.A. Reis, D. Lourenço, W.D. De Souza, U.G. Lopes, N.L. Cunha-E-Silva, Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue, *Parasitology*. 135 (2008) 955–965, <https://doi.org/10.1017/S0031182008004496>.
- [5] A.M. Cevallos, Y.X. Segura-Kato, H. Merchant-Larios, R. Manning-Cela, L. Alberto Hernández-Osorio, C. Márquez-Dueñas, J.R. Ambrosio, O. Reynoso-Ducoing, R. Hernández, *Trypanosoma cruzi*: multiple actin isoforms are observed along different developmental stages, *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 249–259, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.003>.
- [6] D.A.S. De Souza, D.P. Pavoni, M.A. Krieger, A. Ludwig, Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1376–1387, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18865-y>.
- [7] J.H. Hurley, The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25 (1996) 137–162, <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.25.060196.001033>.
- [8] P. Gayathri, Bacterial actins and their interactors, in: mannherz H actin cytoskeleton, *Bact. Infect. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2016) 221–242, [https://doi.org/10.1007/82\\_2016.31](https://doi.org/10.1007/82_2016.31).
- [9] E. Ozyamak, J.M. Kollman, A. Komeili, Bacterial actins and their diversity, *Biochemistry*. 52 (2013) 6928–6939, <https://doi.org/10.1021/bi4010792>.
- [10] P.R. Stoddard, T.A. Williams, E. Garner, B. Baum, Evolution of polymer formation within the actin superfamily, *Mol. Biol. Cell* 28 (2017) 2461–2469, <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-11-0778>.
- [11] D. Popp, A. Narita, L.J. Lee, U. Ghoshdastider, B. Xue, R. Srinivasan, M.K. Balasubramanian, T. Tanaka, R.C. Robinson, Novel actin-like filament structure from *Clostridium tetani*, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 21121–21129, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341016>.
- [12] F. Koh, A. Narita, L.J. Lee, K. Tanaka, Y.Z. Tan, V.P. Dandey, D. Popp, R.C. Robinson, The structure of a 15-stranded actin-like filament from *Clostridium botulinum*, *Nat. Commun.* 10 (2019) 2856, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10779-9>.
- [13] T.D. Pollard, Actin and actin-binding proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8 (2016) a018226, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>.
- [14] M. Sameshima, Y. Kishi, M. Osumi, D. Mahadeo, D.A. Cotter, Novel actin cytoskeleton: actin tubules, *Cell Struct. Funct.* 25 (2000) 291–295, <https://doi.org/10.1247/csf.25.291>.
- [15] A.R. Paredez, Z.J. Assaf, D. Sept, L. Timofejeva, S.C. Dawson, C.J.R. Wang, W.R. Candé, An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108 (2011) 6151–6156, <https://doi.org/10.1073/pnas.1018593108>.
- [16] O. Poch, B. Winsor, Who's who among the *Saccharomyces cerevisiae* actin-related proteins? A classification and nomenclature proposal for a large family, *Yeast*. 13 (1997) 1053–1058, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970915\)13:11<1053::AID-YEA164>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970915)13:11<1053::AID-YEA164>3.0.CO;2-4).
- [17] D.M. Eckley, S.R. Gill, K.A. Melkonian, J.B. Bingham, H.V. Goodson, J.E. Heuser, T.A. Schroer, Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the Arp1 minifilament pointed end, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 307–320, <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.307>.
- [18] J. Muller, Y. Oma, L. Vallar, E. Friederich, O. Poch, B. Winsor, Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 5736–5748, <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0508>.
- [19] J.B. Bingham, T.A. Schroer, Self-regulated polymerization of the actin-related protein Arp1, *Curr. Biol.* 9 (1999) 223–226, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80095-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80095-5).
- [20] J.L. Gordon, L.D. Sibley, Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites, *BMC Genomics* 6 (2005) 179–191, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-179>.
- [21] A. Vizcaíno-Castillo, J.F. Osorio-Méndez, M. Rubio-Ortiz, R.G. Manning-Cela, R. Hernández, A.M. Cevallos, *Trypanosoma cruzi* actins: expression analysis of actin 2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513 (2019) 347–353, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.007>.
- [22] S.Q. Le, O. Gascuel, An improved general amino acid replacement matrix, *Mol. Biol. Evol.* 25 (2008) 1307–1320, <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>.
- [23] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [24] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER suite: protein structure and function prediction, *Nat. Methods* 12 (2015) 7–8, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- [25] P. Kapoor, A.A. Sahasrabudhe, A. Kumar, K. Mitra, M.I. Siddiqi, C.M. Gupta, An unconventional form of actin in protozoan hemoflagellate, *Leishmania*, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 22760–22773, <https://doi.org/10.1074/jbc.M800213200>.
- [26] R.A. Mortara, Studies on trypanosomatid actin I. Immunological and biochemical identification, *J. Protozool.* 36 (1989) 8–13, <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb02666.x>.
- [27] I. Meza, M. Sabanero, F. Cazares, J. Bryan, Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 3936–3941.
- [28] M. Hirono, Y. Kumagai, O. Numata, Y. Watanabe, Purification of *Tetrahymena* actin reveals some unusual properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 (1989) 75–79, <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.75>.
- [29] L.C.K. Souza, R.E.G. Gonçalves Pinho, C.V. de Paula Lima, S. Perdigão Frago, M.J. Soares, Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: kinetoplastea), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108 (2013) 631–636, <https://doi.org/10.1590/0074-0276108052013015>.
- [30] J.A. García-Salcedo, D. Pérez-Morga, P. Gijón, V. Dilbeck, E. Pays, D.P. Nolan, A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*, *EMBO J.* 23 (2004) 780–789, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600094>.
- [31] A.A. Sahasrabudhe, V.K. Bajpai, C.M. Gupta, A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterisation, subcellular localisation and association with sub-pellicular microtubules, *Mol. Biochem. Parasitol.* 134 (2004) 105–114, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.11.008>.
- [32] G.W. Morgan, B.S. Hall, P.W. Denny, M. Carrington, M.C. Field, The kinetoplastid endocytic apparatus. Part I: A dynamic system for nutrition and evasion of host defences, *Trends Parasitol.* 18 (2002) 491–496, [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02391-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02391-7).
- [33] M.J. Soares, W. de Souza, Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*, *Parasitol. Res.* 77 (1991) 461–468, <https://doi.org/10.1007/BF00928410>.
- [34] R.C.B.Q. Figueiredo, D.S. Rosa, Y.M. Gomes, M. Nakasawa, M.J. Soares, Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation, *Parasitology*. 129 (2004) 431–438, <https://doi.org/10.1017/S0031182004005797>.
- [35] H.Z. Ali, C.R. Harding, P.W. Denny, Endocytosis and sphingolipid scavenging in *Leishmania mexicana* amastigotes, *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 691363, <https://doi.org/10.1155/2012/691363>.
- [36] B.J. Bogitsh, R. Ribeiro-Rodrigues, C.E. Carter, In vitro effects of mannan and cytochalasin B on the uptake of horseradish peroxidase and [<sup>14</sup>C] sucrose by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *J. Parasitol.* 81 (1995) 144–148, <https://doi.org/10.2307/3283912>.
- [37] J.R. Corrêa, G.C. Atella, M.M. Batista, M.J. Soares, 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 (2008) 58–66, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.010>.
- [38] P. Kapoor, A. Kumar, R. Naik, M. Ganguli, M.I. Siddiqi, A.A. Sahasrabudhe, C.M. Gupta, *Leishmania* actin binds and nicks kDNA as well as inhibits decatenation activity of type II topoisomerase, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 3308–3317, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq051>.
- [39] J.R. Terman, A. Kashina, Post-translational modification and regulation of actin, *Curr. Opin. Cell Biol.* 25 (2013) 30–38, <https://doi.org/10.1016/j.cob.2012.10.009>.
- [40] S. Varland, J. Vandekerckhove, A. Drazic, Actin post-translational modifications: the Cinderella of cytoskeletal control, *Trends Biochem. Sci.* 44 (2019) 502–516, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.11.010>.
- [41] P. Tsigankov, P.F. Gherardini, M. Helmer-Citterich, G.F. Späth, D. Zilberstein, Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 3405–3412, <https://doi.org/10.1021/pr4002492>.
- [42] I.R.E. Nett, D.M.A. Martin, D. Miranda-Saavedra, D. Lamont, J.D. Barber, A. Mehler, M.A.J. Ferguson, The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness, *Mol. Cell Proteomics* 8 (2009) 1527–1538, <https://doi.org/10.1074/mcp.M800556-MCP200>.
- [43] P. Flegontov, A. Butenko, S. Firsov, N. Kraeva, M. Eliáš, M.C. Field, D. Filatov, O. Flegontova, E.S. Gerasimov, J. Hlaváčková, A. Ishemgulova, A.P. Jackson, S. Kelly, A.Y. Kostygov, M.D. Logacheva, D.A. Maslov, F.R. Opperdoes, A. O'Reilly, J. Sádlová, T. Ševčíková, D. Venkatesh, Č. Vlček, P. Volf, J. Votýpka, K. Záhonová, V. Yurchenko, J. Lukeš, Genome of *Leptomonas pyrrhocoris*: a high-quality reference for monoxenous trypanosomatids and new insights into evolution of *Leishmania*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 23704, <https://doi.org/10.1038/srep23704>.
- [44] K.G. Campellone, M.D. Welch, A nucleator arms race: cellular control of actin assembly, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 237–251, <https://doi.org/10.1038/nrm2867>.
- [45] M. Kollmar, D. Lbik, S. Enge, 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 (2012) 88, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-88>.
- [46] K. Rottner, J. Hänisch, K.G. Campellone, WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond, *Trends Cell Biol.* 20 (2010) 650–661, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.014>.
- [47] W.L. Lee, M. Bezanilla, T.D. Pollard, Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASP, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 789–800, <https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.789>.
- [48] E.O. Maruyama, T. Hori, H. Tanabe, H. Kitamura, R. Matsuda, S. Tone, P. Hozak, F.A. Habermann, J. von Hase, C. Cremer, T. Fukagawa, M. Harata, The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei, *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 3739–3743, <https://doi.org/10.1242/jcs.103903>.
- [49] C.E. Clayton, Gene expression in Kinetoplastids, *Curr. Opin. Microbiol.* 32 (2016) 46–51, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.018>.
- [50] R. Broadhead, H.R. Dawe, H. Farr, S. Griffiths, S.R. Hart, M.K. Shaw,

- M.L. Ginger, S.J. Gaskell, P.G. McKean, K. Gull, Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome, *Nature*. 440 (2006) 224–227, <https://doi.org/10.1038/nature04541>.
- [51] T. Beneke, F. Demay, E. Hookway, N. Ashman, H. Jeffery, J. Smith, J. Valli, T. Becvar, J. Myskova, T. Lestinova, S. Shafiq, J. Sadlova, P. Volf, R.J. Wheeler, E. Gluenz, Genetic dissection of a *Leishmania* flagellar proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections, *PLoS Pathog.* 15 (2019) e1007828, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007828>.
- [52] S. Dean, J.D. Sunter, R.J. Wheeler, TrypTag.org: a trypanosome genome-wide protein localisation resource, *Trends Parasitol.* 33 (2017) 80–82, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.009>.
- [53] C. Halliday, K. Billington, Z. Wang, R. Madden, S. Dean, J.D. Sunter, R.J. Wheeler, Cellular landmarks of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 230 (2019) 24–36, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.12.003>.
- [54] K. Ersfeld, K. Gull, Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*, *J. Cell. Sci.* 114 (2001) 141–148.
- [55] K. Singh, N.K. Veluru, V. Trivedi, C.M. Gupta, A.A. Sahasrabudde, 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 (2014) 562–578, <https://doi.org/10.1111/mmi.12477>.
- [56] C.G. Dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, N.J. Nosworthy, Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 433–473, <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>.
- [57] K.B. Velle, L.K. Fritz-Laylin, Diversity and evolution of actin-dependent phenotypes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 59 (2019) 40–48, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.07.016>.
- [58] D.A. Fletcher, R.D. Mullins, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature*. 463 (2010) 485–492, <https://doi.org/10.1038/nature08908>.
- [59] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Worthey, A.L. Delcher, G. Blandin, S.J. Westenberger, E. Caler, G.C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Åslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D.A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J.F. Da Silveira, P. De Jong, K. Edwards, P.T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A.C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M.J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C.R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J.C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J.L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S.L. Salzberg, D.O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A.J. Simpson, E. Sisk, M.T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P.N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C.M. Fraser, K.D. Stuart, B. Andersson, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science*. 309 (2005) 409–415, <https://doi.org/10.1126/science.1112631>.
- [60] J. Copeland, Formins, golgi, and the centriole, in: Kloc M. Golgi Appar (Ed.), Centriole. Results Probl. Cell Differ. 2019, pp. 27–48, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6_3).
- [61] D. Breitsprecher, B.L. Goode, Formins at a glance, *J. Cell. Sci.* 126 (2013) 1–7, <https://doi.org/10.1242/jcs.107250>.
- [62] J.F. Osorio-Méndez, A. Vizcaíno-Castillo, R. Manning-Cela, R. Hernández, A.M. Cevallos, Expression of profilin in *Trypanosoma cruzi* and identification of some of its ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480 (2016) 709–714, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.044>.
- [63] W. Wilson, T. Seebeck, Identification of a profilin homologue in *Trypanosoma brucei* by complementation screening, *Gene*. 187 (1997) 201–209, [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00749-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00749-4).
- [64] T.V.S. Tammana, A.A. Sahasrabudde, K. Mitra, V.K. Bajpai, C.M. Gupta, Actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin, is essentially required in assembly of *Leishmania* flagellum, *Mol. Microbiol.* 70 (2008) 837–852, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06448.x>.
- [65] G. Kumar, R. Srivastava, K. Mitra, A.A. Sahasrabudde, C.M. Gupta, Overexpression of S4D mutant of *Leishmania donovani* ADF/cofilin impairs flagellum assembly by affecting actin dynamics, *Eukaryot. Cell* 11 (2012) 752–760, <https://doi.org/10.1128/EC.00013-12>.
- [66] T.V.S. Tammana, A.A. Sahasrabudde, V.K. Bajpai, C.M. Gupta, ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of *Leishmania* cell division, *J. Cell. Sci.* 123 (2010) 1894–1901, <https://doi.org/10.1242/jcs.068494>.
- [67] K. Dai, S. Liao, J. Zhang, X. Zhang, X. Tu, Structural and functional insight into ADF/cofilin from *Trypanosoma brucei*, *PLoS One* 8 (2013) e53639, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053639>.
- [68] G. Kumar, L.P. Kajuluri, C.M. Gupta, A.A. Sahasrabudde, A twinfilin-like protein coordinates karyokinesis by influencing mitotic spindle elongation and DNA replication in *Leishmania*, *Mol. Microbiol.* 100 (2016) 173–187, <https://doi.org/10.1111/mmi.13310>.
- [69] A.C. Uetrecht, J.E. Bear, Coronins: the return of the crown, *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 421–426, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.06.002>.
- [70] R.C. Nayak, A.A. Sahasrabudde, V.K. Bajpai, C.M. Gupta, A novel homologue of coronin colocalizes with actin in filament-like structures in *Leishmania*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 143 (2005) 152–164, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.06.001>.
- [71] A.A. Sahasrabudde, R.C. Nayak, C.M. Gupta, Ancient *Leishmania* coronin (CRN12) is involved in microtubule remodeling during cytokinesis, *J. Cell. Sci.* 122 (2009) 1691–1699, <https://doi.org/10.1242/jcs.044651>.
- [72] F. Odronitz, M. Kollmar, Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species, *Genome Biol.* 8 (2007) R196, <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r196>.
- [73] B.B. McIntosh, E.M. Ostap, Myosin-imolecular motors at a glance, *J. Cell. Sci.* 129 (2016) 2689–2695, <https://doi.org/10.1242/jcs.186403>.
- [74] D. Spitznagel, J.F. O'Rourke, N. Leddy, O. Hanrahan, D.P. Nolan, Identification and characterization of an unusual class I myosin involved in vesicle traffic in *Trypanosoma brucei*, *PLoS One* 5 (2010) e12282, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012282>.
- [75] C. Batters, H. Ellrich, C. Helbig, K.A. Woodall, C. Hundschell, D. Brack, C. Veigel, Calmodulin regulates dimerization, motility, and lipid binding of *Leishmania* myosin XXI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E227–236, <https://doi.org/10.1073/pnas.1319285110>.
- [76] C. Batters, K.A. Woodall, C.P. Toseland, C. Hundschell, C. Veigel, Cloning, expression, and characterization of a novel molecular motor, *Leishmania* myosin-XXI, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 27556–27566, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381301>.
- [77] S.S. Katta, A.A. Sahasrabudde, C.M. Gupta, Flagellar localization of a novel isoform of myosin, myosin XXI, in *Leishmania*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 164 (2009) 105–110, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.002>.
- [78] S.S. Katta, T.V.S. Tammana, A.A. Sahasrabudde, V.K. Bajpai, C.M. Gupta, Trafficking activity of myosin XXI is required in assembly of *Leishmania* flagellum, *J. Cell. Sci.* 123 (2010) 2035–2044, <https://doi.org/10.1242/jcs.064725>.
- [79] N.G. Jones, C.M.C. Catta-Preta, A.P.C.A. Lima, J.C. Mottram, Genetically validated drug targets in *Leishmania*: current knowledge and future prospects, *ACS Infect. Dis.* 4 (2018) 467–477, <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00244>.
- [80] C.M. Gupta, S. Thiyagarajan, A.A. Sahasrabudde, Unconventional actins and actin-binding proteins in human protozoan parasites, *Int. J. Parasitol.* 45 (2015) 435–447, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.01.011>.