



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**“Caracterización de la proteína PbMSI-1 y su expresión en
Plasmodium berghei”**

TESIS

Que presenta:

VERÓNICA DEL SOCORRO ARANDA CHAN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de Tesis: Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

México, D.F.

Octubre, 2015.

Dedicatoria

A mis padres, gracias por su apoyo y ejemplo.

A mi abuelita Lilia, que desde el cielo me miras.

A toda mi familia.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado con la beca 558707/298974 (CVU/Becario) para poder realizar esta tesis de Maestría.

Agradecimientos.

Al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados de IPN (CINVESTAV) por darme la oportunidad y las enseñanzas para poder realizar estudios de posgrado.

Al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, a sus Profesores, estudiantes y a todo el personal, por su trato amable y su buena disposición a compartir sus conocimientos; por abrir sus puertas a tantos estudiantes que buscan oportunidades, pero más que nada por la calidad de Investigación que realizan, pues permiten aprender y también dan la oportunidad de presentar nuevas ideas.

Al Laboratorio 12 de Entomología Molecular por permitirme realizar esta tesis.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por darme la oportunidad y la guía, para aprender y permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Febe Elena Cázares Raga por su apoyo y confianza en este proyecto.

A la Bióloga Leticia Cortés Martínez, por su guía en este proyecto, por su apoyo, pero sobre todo por su amistad y comprensión.

Al Dr. Job Alí Díaz Hernández, Biól. Lidia Baylón Pacheco y al Dr. Aarón Martínez por su guía y disposición a ayudarme en diferentes aspectos de este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio 12 de Entomología Molecular que en algún momento me brindaron una mano.

A los laboratorios 11 y 13 del DIPM y a sus integrantes por todo su apoyo.

A mi Familia, no puedo nombrarlos a todos porque en realidad son demasiados los que me apoyaron en todos los aspectos, no pude pedir mejor familia Aranda-Chan.

A todos mis amigos, en especial los del CINVESTAV, Pau, Nadia, Alex, Ino, Aby, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis compañeros de generación de la Maestría, Fer, Mariana, Christian, Héctor, Anita, Mosso, Manuel, Martín, Memo. De todos ustedes aprendí algo.

GRACIAS A DIOS Y GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales de la epidemiología de la malaria	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	3
1.2.1 Ciclo intraeritrocítico o sanguíneo	5
II. ANTECEDENTES	6
2.1 Regulación génica en <i>Plasmodium</i>	6
2.2 Modificaciones post-traduccionales: Fosforilación en proteínas de <i>Plasmodium</i>	8
2.3 Proteína MSI-1	9
2.4 MSI-1 en eucariontes y sus interacciones en complejos	11
2.5 Funciones asociadas a MSI-1	16
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general	21
5.1.1 Objetivos Particulares	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Análisis <i>in silico</i> de MSI-1	23
6.2 Material biológico	23
6.2.1 Modelo murino de <i>P. berghei</i>	23
6.2.2 Producción y enriquecimiento de formas asexuales (Anillos, trofozoítos, esquizontes)	24
6.3 Análisis de la expresión de MSI-1 en fases asexuales	24
6.3.1 Extracción de RNA total	25
6.3.2 Tratamiento del RNA y retrotranscripción	25
6.3.3 Diseño de oligos	26
6.3.4 PCR punto final	27
6.3.5 qPCR	28
6.4 Análisis de la fosforilación de MSI-1 en fases asexuales de <i>P. berghei</i>	28
6.4.1 Extracción de proteínas para 2-D	28
6.4.2 Electroforesis bidimensional (2-D)	29
6.4.3 Western Blot	29

VII. RESULTADOS	30
7.1 Análisis <i>in silico</i> de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	30
7.1.1 Homólogos de MSI-1 en apicomplexa y otros eucariontes	30
7.1.2 Dominios conservados de PbMSI-1	31
7.1.3 Modelado 3-D de la estructura de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	33
7.1.4 Predicción de sitios de fosforilación de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	34
7.1.5 Predicción de las interacciones de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	36
7.2 Obtención de fases asexuales enriquecidas	38
7.3 Presencia del gen de MSI-1 en <i>P. berghei</i>	40
7.4 Análisis de la expresión génica de MSI-1 en fases asexuales	40
7.4.1 RT-PCR semicuantitativa	40
7.4.2 Análisis de la expresión génica de MSI-1 por PCR cuantitativa (qPCR)	42
7.4.2.1 Estandarización de la qPCR	45
7.4.2.2 Expresión génica de MSI-1 en fases asexuales	45
7.5 Análisis de la fosforilación de PbMSI-1 en fases asexuales (Trofozoítos, esquizontes)	45
7.5.1 Posible fosforilación de MSI-1 en trofozoítos de <i>P. berghei</i>	46
7.5.2 Análisis de fosforilación de MSI-1 en esquizontes de <i>P. berghei</i>	48
VIII. DISCUSIÓN	50
IX. CONCLUSIONES	56
X. PERSPECTIVAS	57
XI. BIBLIOGRAFÍA	58

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución de las zonas de malaria	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	4
Figura 3. Proteína RbAp46 (MSI-1 humana) anclada con H4	10
Figura 4. Estrategia experimental planteada para el análisis de MSI-1	22
Figura 5. Análisis por Maximum Likelihood (ML) de homólogos de la proteína MSI-1 en diversos eucariontes	31
Figura 6. Dominios de PbMSI-1	32
Figura 7. Modelo 3-D de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	34
Figura 8. Posibles sitios de fosforilación en MSI-1 de <i>P. berghei</i>	35
Figura 9. Interactoma de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	36
Figura 10. Preparaciones enriquecidas de fases asexuales de <i>P. berghei</i>	39
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de PCR punto final de MSI-1 de <i>P. berghei</i>	40
Figura 12. Análisis de la expresión génica por PCR semicuantitativa	41
Figura 13. Curvas de temperaturas de los primers de PbMSI-1 por PCR tiempo real	42
Figura 14. Curva de amplificación de PCR tiempo real	44
Figura 15. Expresión normalizada del gen PbMSI-1/18S en fases asexuales	45
Figura 16. Análisis de fosforilación de PbMSI-1 en trofozoitos de <i>P. berghei</i>	47
Figura 17. Análisis de fosforilación de PbMSI-1 en trofozoítos de <i>P. berghei</i>	49

Lista de Tablas

Tabla 1. Proteína MSI-1 conservada en eucariontes	12
Tabla 2. Listado de primers elegidos para la PCR tiempo real y para la PCR punto final	26
Tabla 3. Predicción de proteínas que interactúan con MSI-1 y sus homólogos en <i>S. cerevisiae</i>	37

RESUMEN

La malaria o paludismo es la más importante de las enfermedades parasitarias en los seres humanos, pues existe transmisión en 97 países alrededor del mundo y hay 3.2 mil millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2014). Parte de la dificultad para eliminar la enfermedad por completo se debe a características intrínsecas del agente causal de la malaria, *Plasmodium spp.*, incluyendo su complejo ciclo de vida, que dificultan encontrar blancos adecuados para su tratamiento; ya que por ejemplo, en este parásito existe una regulación de la expresión génica específica de estadio, la cual es necesaria para la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular, así como la variación antigénica (Volz, 2010). En eucariontes multicelulares, la expresión génica está a menudo mediada por factores de transcripción; sin embargo, en *Plasmodium*, se han identificado muy pocos factores de transcripción (Ay *et. al.*, 2015) y, en contraste, se ha predicho un gran número de genes que codifican para proteínas involucradas en la estructura de la cromatina, como modificadores de histonas, remodeladoras de nucleosomas y co-activadores transcripcionales, que impactan en la actividad génica (Zollner *et. al.*, 2015; Nalepa, 2015). El presente trabajo se enfocó a la proteína MSI-1 (supresor multicopia de ira 1) perteneciente al grupo de proteínas co-activadoras transcripcionales y que están altamente conservadas en eucariontes. Estas proteínas forman parte de complejos que controlan la dinámica de la cromatina, aunque por si mismas no muestran actividad catalítica (Hennig *et. al.*, 2003). Un homólogo de esta proteína fue identificada por espectrometría de masas en el parásito murino *Plasmodium berghei* y se encontró que, junto con otras proteínas, es fosforilada de forma diferencial en las fases sexuales del parásito (Alonso- Morales *et. al.*, 2015). Dada su posible importancia, se decidió caracterizar la expresión de MSI-1 de *P. berghei* y su fosforilación en las fases sanguíneas asexuales del parásito. Los resultados fueron que la proteína PbMSI-1 presenta, a pesar de sus diferencias en la secuencia de aminoácidos con la proteína MSI-1 humana, una estructura similar con siete repetidos WD40. Además, PbMSI-1 se encuentra altamente conservada en las especies del género *Plasmodium*, y diverge de otros organismos incluyendo humanos, insectos y

plantas. La expresión génica en el ciclo intraeritrocítico es similar entre las fases de anillo, trofozoíto y esquizonte. Además, los análisis de fosforilación por 2-D inmunoblot mostraron que es probable que PbMSI-1 se encuentre fosforilada por lo menos en la fase de trofozoítos. Estos resultados indicaron que en las fases asexuales la proteína PbMSI-1 podría regularse a nivel post-traducciona l y no a nivel de mensajero y plantea la necesidad de estudiar los efectos de la fosforilación en las funciones y asociaciones de la PbMSI-1.

ABSTRACT

Malaria is the most important parasitic disease in humans, because of its transmitted in 97 countries around the world with 3.2 billion people at risk of having the disease. Part of the difficulty in eliminating the disease completely is due to intrinsic characteristics of the causative agent of malaria, *Plasmodium spp.*, because it possess a complex life cycle, that make difficult to find suitable targets for treatment; for example, as it passes through different phases, an stage-specific gene regulation is necessary for regulating cell cycle progression, cell differentiation and antigenic variation (Volx, 2010). In multicellular eukaryotes gene expression is often mediated by transcription factors; however, in *Plasmodium*, very few transcription factors have been identified (Ay et. al., 2015) and, in contrast, many genes encoding proteins involved in chromatin structure were predicted, like histone modifiers, nucleosome remodelers and transcriptional co-activators, which have an impact on gene expression (Zollner et. al., 2015; Nalepa, 2015). This work focus on the protein MSI-1 (Multicopy suppressor of ira 1) which belongs to the group of transcriptional co-activators and are highly conserved in eukaryota. This proteins is found in different complexes that regulates chromatin dynamics, but do not possess intrinsic catalytic activity (Hennig et. al., 2003). A protein homologue of MSI-1 was identified by mass spectrometry in the murine malaria parasite *Plasmodium berghei*, along with other proteins, is differentially phosphorylated in the sexual parasite stages (Alonso- Morales et. al., 2015). Due to its biological importance, we decided to characterize the gene expression and phosphorylation of MSI-1 of *P. berghei* in asexual stages, as it may also participate in intracellular parasite development. Our results indicate PbMSI-1 shows a similar structure with human MSI-1 and It has seven WD40 repeats, besides differences in the amino acid sequence. In addition, MSI Pb-1 is highly conserved in the genus *Plasmodium*, but different to the MSI-1 of other species, including humans, insects and plants. The analysis of gene expression in the asexual stages of intraerythrocytic cycle, showed that PbMSI-1 has a similar messenger expression in rings, trophozoites and schizonts. Further analysis of 2-D phosphorylation by immunoblot showed that PbMSI-1 is probably phosphorylated in trophozoites.

These combined results suggest that the PbMSI-1 might be regulated in a post-translational level and not at the messenger expression level in the asexual stages, and opens the question of whether PbMSI-1 phosphorylation may have an effect on its association with other parasite proteins

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la epidemiología de la Malaria.

En 2013, se reportaron 198 millones de casos de malaria alrededor del mundo, de los cuales 584, 000 fueron fatales, afectando de forma importante a la población infantil (WHO, 2014). Hasta 2010, 109 países estaban libres de malaria, 67 en vías de controlar la malaria endémica y 32 en vías de eliminación de la malaria; sin embargo la situación de cada país, dependiendo de sus métodos de control, puede cambiar (Feachem, 2010) (Figura 1). En el continente americano, la malaria es endémica en 21 países que incluyen la región de Mesoamérica, la cual comprende nueve estados del sur-sureste de México, además de todos los países centroamericanos. La población en riesgo de malaria en Mesoamérica se estima en 49 480 000 personas, lo que representa el 32.45% de la población total de la región (Rodríguez *et. al.*, 2011).

Parte del hecho de que aún no se haya podido erradicar la enfermedad se debe a características intrínsecas del agente causal de la malaria. En los seres humanos la malaria es causada por cinco especies del género *Plasmodium*, a saber, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*. Esta variedad de especies, junto con el incremento de la resistencia a los fármacos usados, dificultan su tratamiento y hacen que sea necesaria una búsqueda continua de nuevos blancos terapéuticos (Rout, 2015). La distribución de las especies de *Plasmodium* es diferente de acuerdo a la región; así, *P. falciparum* y *P. vivax* tienen prevalencias equivalentes en Asia y América central y del sur, lugares donde la transmisión es baja y estacional. Por el contrario en regiones como el África subsahariana, los riesgos de transmisión son muy elevados y predomina la especie *P. falciparum* (Gething, 2010). Además, el parásito posee un complejo ciclo de vida que incluye su paso por un hospedero vertebrado y el mosquito vector del género *Anopheles*. El ciclo sexual se presenta dentro del vector. (Sinka, 2012).

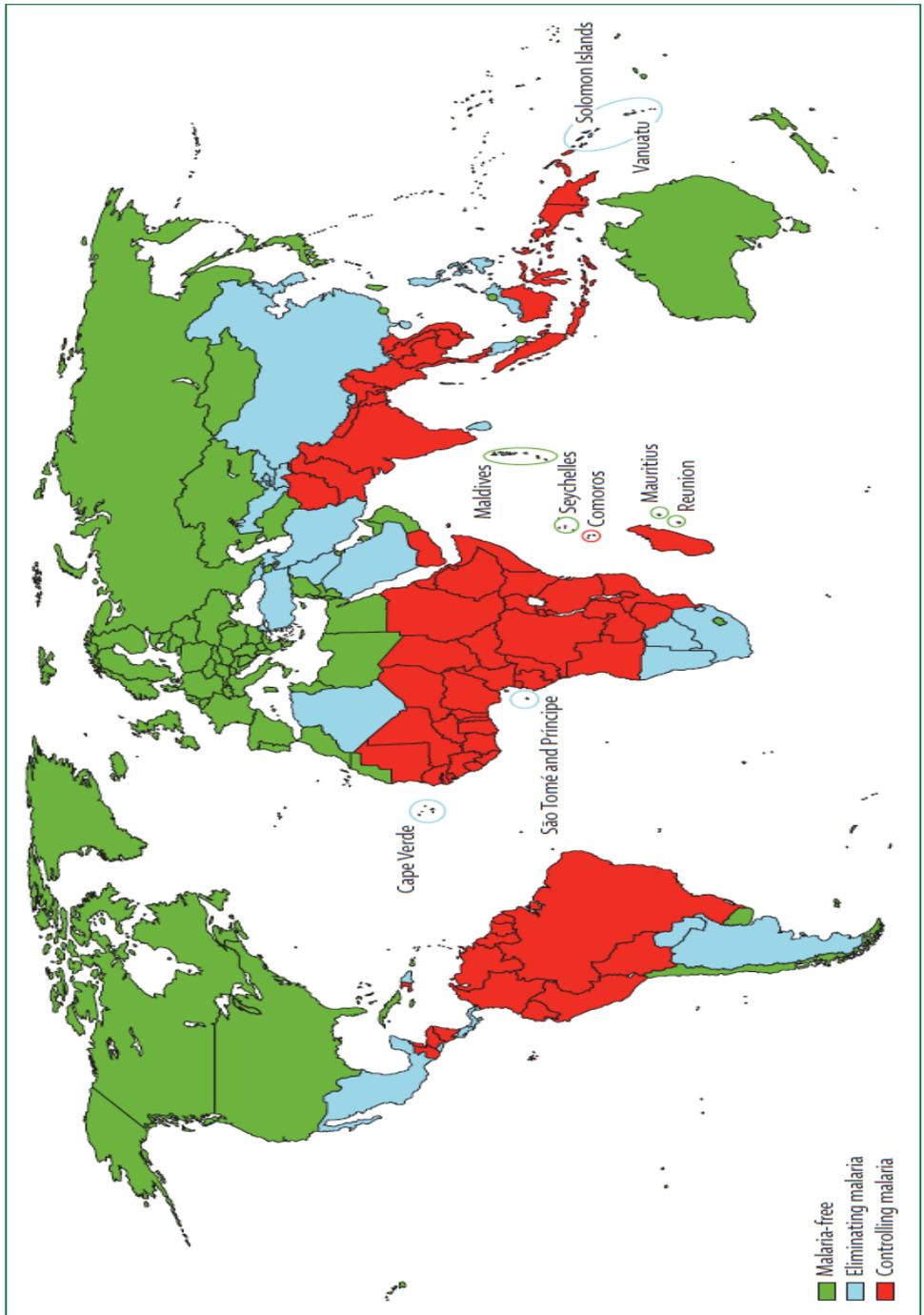


Figura 1. Distribución de las zonas de malaria. La distribución de la malaria en los países se clasifica en tres categorías de acuerdo a su frecuencia: libre de malaria (en color verde), en vías de erradicación (azul) y con control de malaria (rojo). (Feachem *et. al.*, 2010).

1.2 Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

El ciclo de vida de *Plasmodium* es complejo, incluye múltiples estadios en dos hospederos diferentes: el humano y el mosquito vector del género *Anopheles*. La infección en el humano comienza con la picadura de una hembra *Anopheles* infectada con el parásito, lo que resulta en la transferencia de esporozoítos, formas móviles del parásito, que migran rápidamente hacia las células hepáticas en donde los esporozoítos se multiplican ampliamente durante un periodo de aproximadamente dos semanas, etapa conocida como ciclo hepático o extraeritrocítico, durante la cual no hay síntomas de la enfermedad; posteriormente son liberados al torrente sanguíneo cientos de merozoítos los cuales son capaces de invadir los eritrocitos (Cowman, *et. al.*, 2012; Siciliano y Alano, 2015).

Durante el ciclo sanguíneo o intraeritrocítico, las formas asexuales del parásito entran en ciclos repetidos de multiplicación en los eritrocitos por medio de un proceso de división celular llamado esquizogonia, que resulta en la división del parásito multinucleado en 16-32 merozoitos hijos, que son liberados al torrente sanguíneo después de la ruptura de la célula hospedera e invaden nuevos eritrocitos (Ay *et. al.*, 2015). Durante el ciclo asexual, algunos de los parásitos se diferencian hacia las fases sexuales y se producen los gametocitos macho y hembra. Cuando el mosquito se alimenta de este paciente infectado ingiere los gametocitos maduros los cuales completan en el intestino del mosquito el desarrollo del ciclo sexual, que incluye la formación de gametos machos y hembras, la fertilización, formación del cigoto, el desarrollo a oocinetos móviles, los cuales atraviesan la pared intestinal y se transforman en ooquistes. En el ooquiste el parásito entra en múltiples rondas de división para formar un sincitio o esporoblasto con cientos de núcleos en su interior y en un evento de citocinesis masiva, se producirán miles de esporozoítos haploides (Baker, 2010; Gerald *et. al.*, 2011). El ciclo de vida se completa cuando los esporozoitos rompen el ooquiste y migran hacia las glándulas salivales, lo que permite que sean inoculados al hospedero humano cuando el mosquito se alimente (Siciliano *et. al.*, 2015).

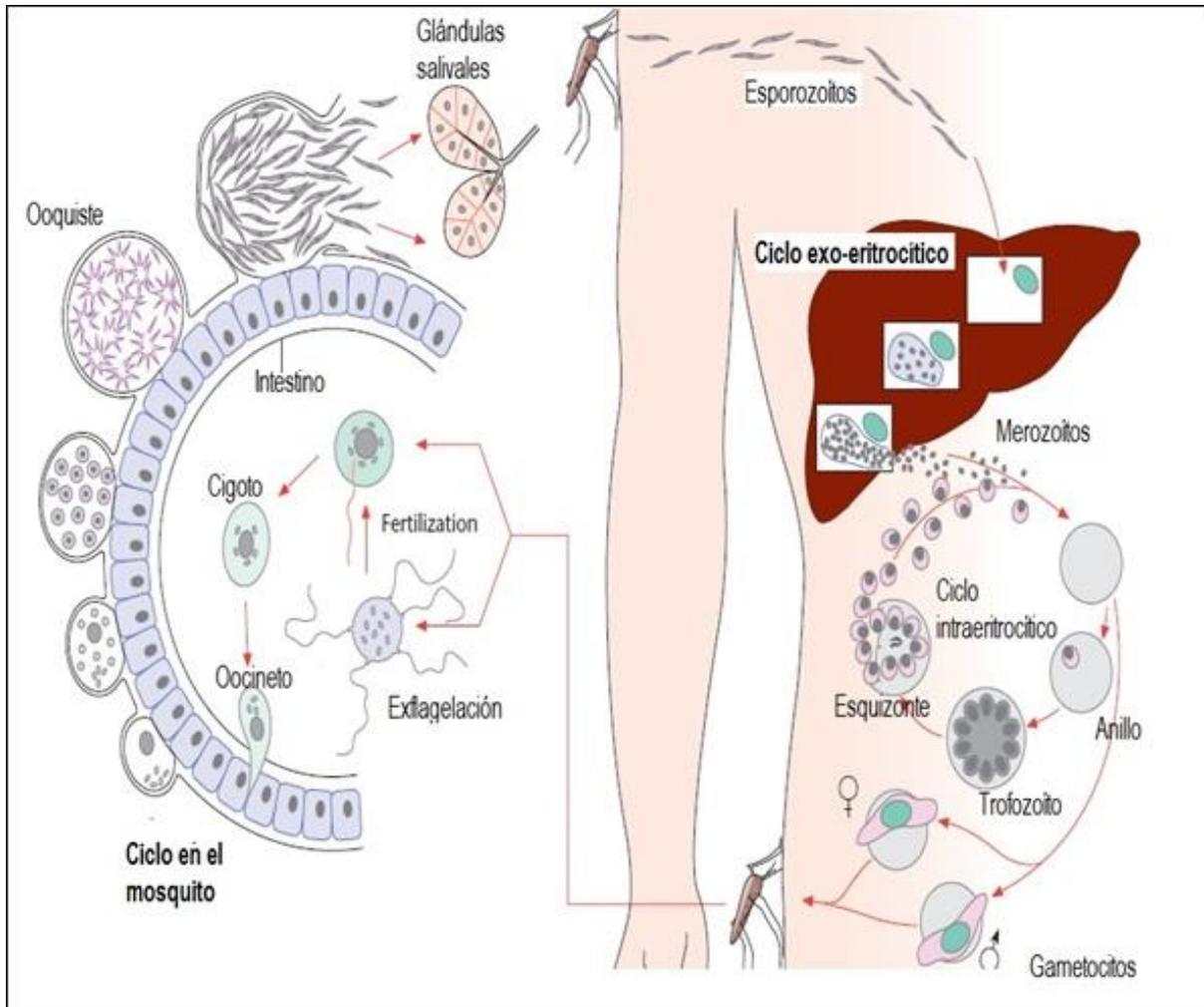


Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*. El ciclo de *P. falciparum* involucra dos hospederos. Comienza cuando un mosquito *Anopheles* hembra infectado inocula esporozoítos al hospedero humano, los cuales viajan e infectan células hepáticas, donde se da el desarrollo exo-eritrocítico. Después los parásitos entrarán en ciclos de multiplicación asexual en los eritrocitos durante el ciclo intra-eritrocítico. Algunos se diferenciarán a las fases sexuales, gametocitos, los cuales pueden infectar nuevamente al mosquito durante una picadura. En el vector se dan la fecundación y el ciclo esporogónico, que incluyen la formación del cigoto, el desarrollo a oocineto móvil, la formación del ooquiste y la liberación de los esporozoítos, los cuales pueden infectar nuevamente al hospedero vertebrado (Bannister, 2009).

1.1.2.1 Ciclo intraeritrocítico o sanguíneo.

Las fases asexuales del ciclo sanguíneo del parásito presentan características particulares que se describen brevemente a continuación:

Anillo. Después de entrar al eritrocito, el merozoíto pierde sus organelos invasores y adopta la forma de un disco con un centro muy delgado, dando la apariencia de un anillo. En este punto el parásito comienza a alimentarse de hemoglobina y a sintetizar moléculas específicas que pueden ser exportadas al eritrocito, modificando su membrana (Goldberg, 2005).

Trofozoíto. Después de las primeras 12 horas de la invasión y después de una etapa de crecimiento, el trofozoíto se alimentará, crecerá y modificará aún más al eritrocito, produciendo moléculas como PfEMP1, STEVOR y RIFIN que se sitúan en la superficie del eritrocito infectado y que son conocidas por su variación antigénica y consideradas factores de virulencia. Conforme la alimentación continúa, se formarán los cristales del pigmento llamado hemozoína que llenan la vacuola alimenticia (Haldar *et. al.*, 2007; Egan, 2008).

Esquizonte. En la esquizogonia sanguínea, el parásito realiza tres rondas de síntesis de DNA, mitosis y división nuclear, además de una intensa síntesis y ensamble de proteínas. En general se producen esquizontes con 16-22 núcleos que generarán merozoítos individuales haploides en la periferia del esquizonte, los cuales se liberan por lisis de la vacuola y la membrana del eritrocito, en un proceso que incluye la desestabilización del citoesqueleto con ayuda de proteasas. Los ciclos esquizogónicos pueden ocurrir a intervalos regulares, con ciclos de 48 horas en el caso de *P. vivax* y *P. ovale* y *P. falciparum* (en este último pueden durar poco menos de 48 horas) y de 72 horas en el caso de *P. malariae*; esta destrucción sincrónica de los eritrocitos causa las fiebres intermitentes características de la malaria, conocidos como paroxismos maláricos (Gerald *et. al.*, 2011; Lehman *et. al.*, 2014).

Gametocitos. El gametocito es una forma de transición en el ciclo de vida del parásito, que se forma en el ambiente del vertebrado y se desarrolla en el insecto

vector. En el huésped vertebrado el parásito en su forma asexual entra en un proceso de maduración, llamado gametocitogénesis, donde produce gametocitos (pre-gametos) machos y hembras (Talman *et al.*, 2014). Los estímulos que inducen la progresión del cambio de fase asexual a gametocitos sexuales han sido difíciles de deducir puesto que el parásito permanece dentro del eritrocito cuando cambia de fase y no afronta cambios drásticos en el ambiente. Se sabe que los parásitos no llevan cromosomas sexuales y que todas las formas asexuales llevan la información para comprometerse a las fases sexuales (Ankarklev *et al.*, 2014).

II. ANTECEDENTES

2.1 Regulación génica en *Plasmodium*

Para regular el desarrollo intracelular a través de los diferentes estadios del complejo ciclo de vida de *Plasmodium*, este parásito desarrolló estrategias moleculares poco comunes para la regulación transcripcional (Callebaut *et al.*, 2005).

En estudios con microarreglos de DNA se midieron los niveles de transcripción durante el desarrollo intraeritrocítico, y destaca que en *Plasmodium* se da una cascada altamente ordenada de expresión génica: primero, hay un pico de mRNAs para proteínas involucradas en la síntesis de proteínas, seguido de los asociados al metabolismo, luego los que transcriben para proteínas asociadas a invasión y adhesión y por último los que transcriben para proteínas cinasas (Bozdech *et al.* 2003; Le Roch *et al.* 2003; Callebaut *et al.*, 2005). La expresión ordenada de transcritos se ha encontrado también en otras fases del parásito (Siau *et al.*, 2008; Tarun *et al.*, 2008; Otto *et al.*, 2010). La falta de suficientes factores de transcripción para esta expresión estadio-específica, junto con hechos como la falta de un promotor canónico para genes que parecen ser transcritos de forma monocistrónica, sugieren que el control a nivel post-transcripcional puede ser el principal mecanismo de regulación de la expresión génica en *Plasmodium*. Los procesos a nivel post-transcripcional incluirían procesos como el

silenciamiento de genes y el remodelado de la cromatina (Deitsch *et. al.*, 2007; Coulson *et. al.*, 2004).

Las modificaciones a la cromatina juegan un rol importante en diferentes procesos durante el desarrollo de muchos organismos. Estas modificaciones incluyen alteraciones de las histonas, modificaciones al DNA o cambios en proteínas específicas que se asocian al DNA (Eichten *et. al.*, 2014). *Plasmodium*, tiene una organización de la cromatina similar a otros eucariontes, sus genes codifican para las histonas H2A, H2B y H3 y las proteínas muestran gran homología con las histonas de otros eucariontes (Horrocks *et. al.*, 2009). Sin embargo, también posee características que lo hacen diferente con otros eucariontes, como la ausencia del conector de histona H1, la ausencia de la vía clásica de RNA interferente, pues carece de genes asociados a las proteínas Dicer y Argonauta (Mueller *et. al.*, 2014), la presencia de citosina metiltransferasas pero con la aparente ausencia de metilación del DNA; así como la presencia de variantes de histonas con modificaciones únicas. Además, a diferencia de la mayoría de los eucariontes, la cromatina está predominantemente en forma de eucromatina; sin embargo, la regulación de la estructura de la cromatina si afecta los estados de transcripción del parásito, observándose diferencias muy específicas en la regulación en los diferentes estadios (Gupta *et. al.*, 2013).

Entre las proteínas que regulan la estructura de la cromatina en eucariontes se encuentran los co-activadores transcripcionales, que se definen como proteínas que incrementan esta actividad, lo hacen mediando el anclaje de factores de transcripción y sirven de andamiaje para otras proteínas que tienen actividad enzimática. Éstos co-activadores son reclutados generalmente por los factores de transcripción que marcan un gen para su activación o represión (Reyes *et. al.*, 2002). Los co-activadores transcripcionales tienen una diversidad de funciones, como la alteración de la estructura de la cromatina, la cual pueden llevar a cabo de diferentes maneras: por la modificación de histonas, como por ejemplo las acetil transferasas, para permitir el acceso de otras proteínas al DNA. Otros tipos de co-activadores forman parte de complejos que se unen a factores de transcripción,

reclutando la RNA Pol II e interactuando con el aparato de transcripción. También están los complejos proteicos dependientes de ATP para desenrollamiento del DNA para una transcripción eficiente (Spiegelman y Heinrich, 2004). Por otro lado, también se encuentran los co-represores los cuales cambian la estructura de la cromatina haciéndola inaccesible a los factores de transcripción; esto lo logran, por ejemplo, asociándose en complejos con histonas desacetilasas (Hermanson *et. al.*, 2002).

2.2 Modificaciones Post-traduccionales: Fosforilación en *Plasmodium*.

Las modificaciones post-traduccionales son alteraciones covalentes de residuos específicos en un polipéptido muchas de las cuales son reversibles; ejemplos de estas son la fosforilación, ubiquitinación, acetilación, metilación, etc. (Mann, 2003). La fosforilación y de-fosforilación de proteínas son modificaciones post-traduccionales reversibles que juegan roles importantes en varios procesos celulares como el plegamiento de proteínas, localización subcelular, potencial de unión, actividad enzimática o estabilidad, procesos que son esenciales para la supervivencia celular (Kraatz, H & Martic, S, 2015).

Los genes que codifican para cinasas en el genoma de mamíferos son cerca del 2% (Manning *et. al.*, 2002). En el caso de *Plasmodium*, se ha identificado que del 1.1% de 89 y el 1.6% de 99 genes codifican para proteínas cinasas (Anamika *et. al.*, 2005; Ward *et. al.*, 2004). Además se han identificado 1177 sitios de fosforilación en 650 proteínas del parásito, involucradas en síntesis de DNA, transcripción y metabolismo (Solyakov *et. al.*, 2011). Varias cinasas de *Plasmodium* pueden ser catalogadas dentro de grupos de cinasas eucariontes ya conocidas como AGC, CK1, CMGC, CamK y tirosina cinasa “like” (TKL); aunque el parásito también presenta grandes diferencias con otros organismos eucariotes, pues numerosas proteínas cinasas de mamíferos se encuentran aparentemente ausentes en el parásito, como es el caso del grupo de las tirosina cinasas (Kraatz, H & Martic, S, 2015); a pesar de lo cual se ha encontrado que cerca del 1% de las

proteínas totales de *Plasmodium* están fosforiladas en tirosina; estos son casos probables de autofosforilación, pues se han encontrado en *Plasmodium* cinasas de la familia DYRK (Ser/Thr cinasas) que tienen la capacidad de catalizar la autofosforilación en residuos de tirosina (Lochhead, 2009).

Además, se ha visto la influencia de la fosforilación en diversos procesos en el parásito. En las fases sexuales, procesos como gametocitemia (Alonso-Morales *et. al.*, 2015), replicación de material genético en los gametos (Tewari *et. al.*, 2010; Rangarajan *et. al.*, 2005), diferenciación de cigotos a oocinetos (Jebiwott *et. al.*, 2013); en las fases asexuales se involucran a proteínas cinasas en procesos como invasión de las células hepáticas por parte de los esporozoítos (Coppi *et. al.*, 2007) en el control de la invasión y egreso de merozoítos al eritrocito (Green *et. al.*, 2008; Dvorin, 2010), y también se ha visto que la fosforilación juega roles importantes durante el proceso de la esquizogonia en el eritrocito (Lasonder *et. al.*, 2015). Además de ello, se ha demostrado que *P. falciparum* y *P. berghei* son susceptibles de inhibidores de proteínas cinasas humanas, lo que indica que estos parásitos también dependen de vías de señalización del eritrocito hospedero, sugiriendo que las otras especies podrían actuar de la misma forma (Sicard *et. al.*, 2011).

2.3 Proteína MSI-1.

Las proteínas similares al supresor multicopia de ira 1 (MSI-1) de levaduras, y al grupo de proteínas asociadas al retinoblastoma (RbAp46/48) en mamíferos, son proteínas con repetidos WD40 codificadas por familias multigénicas pequeñas en la mayoría de los eucariontes. Las proteínas MSI-1 son componentes de varios complejos que participan en la transcripción y son consideradas co-activadores transcripcionales (Hennig *et. al.*, 2003). El primer miembro de esta familia de proteínas fue hallado en levaduras, en donde se buscaban genes supresores de la actividad del gen ira 1 (Regulador inhibitorio de la vía de RAS-AMPC), se encontró

un grupo de genes que cumplen esta función, y al gen se le nombró como supresor multicopia de *ira1* (MSI-1) (Ruggieri *et. al.* 1989).

La mayoría de las proteínas MSI-1 como es el caso de la proteína RbAp46 (proteína MSI-1 humana), cuya estructura se reveló por análisis de cristalografía, poseen tres regiones distintas: Una hélice α N-terminal sobresaliente, que se apoya al borde del β -plegado siete; siete estructuras β -plegadas llamados dominios WD-40 y una corta hélice α en el extremo C-terminal. Además posee una estructura de lazo que está cargada negativamente (PP-loop), la cual junto con la hélice α N-terminal forma una invaginación, donde interactúa la histona H4 (Schuetz *et. al.*, 2006; Murzina *et. al.*, 2008) (Fig. 3).

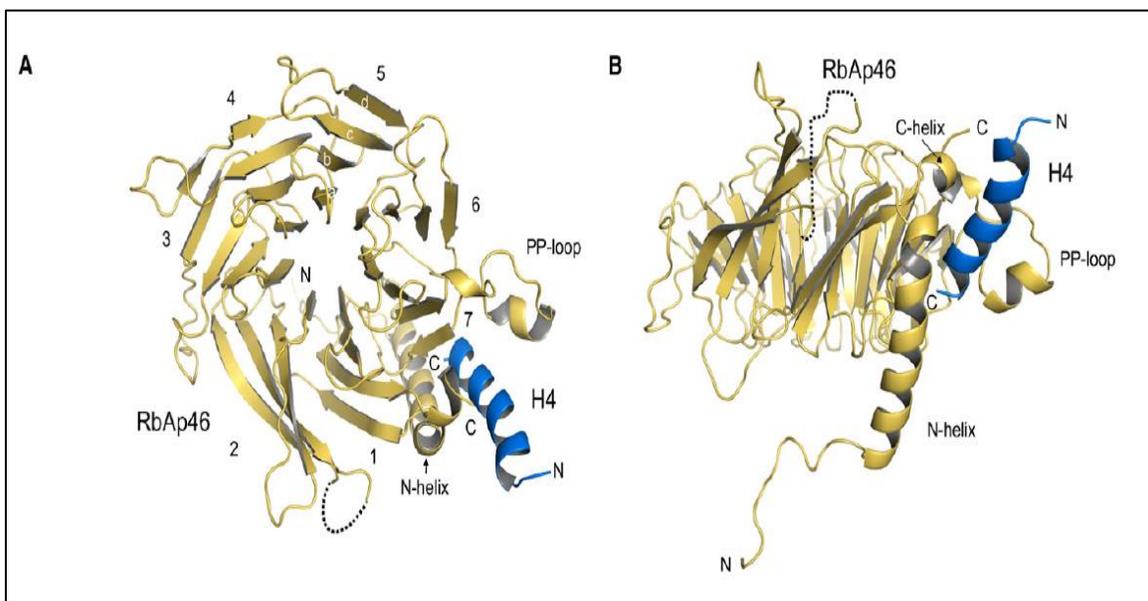


Figura 3. Proteína RbAp46 (MSI-1 humana) anclada con H4. En la estructura de la proteína RbAp46 (color amarillo) unida a la histona H4 (en azul) resuelta por cristalografía se observan las 7 estructuras β -plegadas (1-7) y las hélices α N- y C- terminales, el PP loop indica un región de la proteína cargada negativamente (Murzina *et. al.*, 2008).

2.4 MSI-1 en eucariontes y sus interacciones en complejos.

Las proteínas MSI-1 se encuentran altamente conservadas en eucariontes y aparentemente están ausentes de procariontes. Éstas se encuentran asociadas a complejos, principalmente en el núcleo; sin embargo, existen reportes que la señalan en complejos en el citoplasma, asociada a acetiltransferasas de histonas. La mayoría de las especies estudiadas tienen múltiples genes MSI-1, aunque insectos como *Anopheles* poseen una sola copia (Hennig *et. al.*, 2005).

En diferentes organismos eucariontes, MSI-1 se encuentra asociada a varias proteínas:

- MSI-1 puede unirse directa o indirectamente a las histonas. Las proteínas MSI-1 pueden unirse directamente a las histonas, como es el caso de p55 de *Drosophila*, la cual forma complejos uniéndose directamente con la histona H4 (Furuyama *et. al.*, 2006). También se ha visto que las proteínas tipo MSI-1 tienen mayor afinidad por las histonas cuando forman complejos con otras proteínas, como es el caso de la proteína RbAp46/48 (MSI-1) de humano que forma complejos que incrementan la actividad de histonas acetil transferasas; así como de metil transferasas (Benson *et. al.*, 2006). Esta misma RbAp46/48 se asocia con la proteína pRB o proteína supresora tumoral de retinoblastoma, la cual reprime la transcripción de los genes necesarios para entrar en la fase S, y además de participar en la proliferación también participa en el proceso de diferenciación (Murzina *et. al.*, 2008; Austin, 2004).

Organismo	N. común	Especie	Nombre	Alias
Plantas	Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMSI1- AtMSI5	MEDICIS
	Jitomate	<i>Lycopersicon sculentum</i>	IEmsi	
	Maíz	<i>Zea mays</i>	ZmRBAP1-ZmRBAP3	ZmCAF-C
	Arroz	<i>Oriza sativa</i>	OsRBAP1	OsRBAP1/ Os1 g2763
Hongos	Levaduras	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SpMSI16	SPCC1672.10
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScMSI1/ ScHAT2	CAC3/HAT2B
		<i>Candida glabrata</i>	CgMSI1	
Alveolados	Parásito de la malaria	<i>Plasmodium falciparum</i>	PfMSI1	CAF-1
Nematodos	Gusanos	<i>Caenorhabditis elegans</i>	CeLIN-53	RBA2
Insectos	Mosca de la fruta	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dmp55	dCAF-1/ NURF-55
	Mosquito de la malaria	<i>Anopheles gambiae</i>	Agp55	
Vertebrados	Humano	<i>Homo sapiens</i>	HsRbAp48/	CAF-1/RBB4
			HsRbAp46	HAT2B/RBB7
	Ratón	<i>Mus musculus</i>	MmRbAp48/	RBB4/
			MmRbAp46	RBB7
	Gallina	<i>Gallus gallus</i>	GgRbAp48/	RBB4/
			GgRbAp46	RBB7
	Rana africana	<i>Xenopus laevis</i>	XIRbAp48/	RBB4/
			XIRbAp46	RBB7

Tabla 1. Homólogos de la proteína MSI-1 en eucariontes (Modificada de Hennig *et. al.*, 2005).

- Desacetilasas de histonas e histonas acetil transferasas (HDAC y HAT), en ensamble de cromatina. La proteína RbAp48 se asocia también con la subunidad catalítica de la histona desacetilasa 1 (HDAC), y se sugiere que facilita la desacetilación de H4 recién sintetizada una vez que se ha depositado en el nucleosoma (Volk y Crispino, 2015). Por el contrario, en levaduras, la proteína Hat2p (tipo MSI) es una subunidad de la Acetil transferasa tipo B de histonas, las 8cuales se encuentran principalmente en el citoplasma y llevan a cabo la acetilación de K5 y K12 de la H4 recién sintetizada. Estos grupos acetilos son removidos después de la unión de la histona en el nucleosoma durante el proceso de maduración de la cromatina (Parthun, 1996; Ai y Parthun, 2004). En este complejo heterodimérico la proteína Hat1p es la que lleva a cabo la actividad catalítica de acetilación, mientras que la Hat2p ayuda a facilitar el contacto con las histonas. Este proceso sería importante para el proceso de ensamble de la cromatina (Hennig *et. al.*, 2005). En el caso de *Plasmodium* y, en contraste con lo que ocurre en otros eucariontes multicelulares, una gran porción de su genoma esta constitutivamente acetilado, y la inhibición de histonas acetil- transferasas y desacetilasas influye en la los niveles de expresión de la mayoría de los genes e interfiere con el crecimiento del parasito (Chaal *et. al.*, 2010).
- Factor de ensamble de cromatina (CAF-1), ensamble de nucleosomas. En células HeLa humanas se ha encontrado que la RbAp48 forma parte también del complejo llamado factor de ensamble de la cromatina 1 (CAF-1) (Tagami *et. al.*, 2004). En el humano, CAF-1 está compuesto de tres subunidades nombradas de acuerdo a su peso molecular: subunidad 150 kDa (CHAF1a), subunidad de 60 kDa (CHAF1b) y la subunidad de 48 kDa (RbAp48 ó p48) (Volk y Crispino, 2015). En *Drosophila* se identificó un complejo equivalente compuesto de las tres subunidades, p180, p105/75 y la proteína homóloga a p48 llamada p55 (Kamakaka, 1996). La CAF-1 se considera específica para la histona H3.1, ayudando a que sea depositada

en el momento de la síntesis de DNA (Tagami, 2004). CAF-1 es reclutada a los sitios de reparación a través de su unión directa con la proteína PCNA (Antígeno nuclear de células en proliferación) co-factor de la DNA Pol δ ; promoviendo el ensamble de cromatina y actuando de forma sinérgica con otra chaperona de histonas conocida como el factor anti-silenciamiento 1 (ASF1) (Polo, 2015). En el caso de las células humanas, CAF-1 es reclutada en la cromatina dañada por UV en estudios *in vitro* y es un factor clave para restaurar la integridad de la estructura de la cromatina por medio de la incorporación *de novo* de las histonas H3.1. Este complejo también se ha encontrado como una chaperona de la variante de histonas H3.2 (Latreille, 2014). No se ha reportado aún la presencia y funciones de este complejo para *P. berghei*.

- Polycomb, represión de la transcripción. En el caso de la asociación a complejos metil-transferasas represores, la proteína tipo MSI-1 de *Drosophila*, p55, puede asociarse para formar al Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2). Este complejo está conservado en plantas como *Arabidopsis*, en insectos como *Drosophila* y hasta en el humano (Hsieh, 2003; Nowak, 2011). En este complejo, la proteína p55 también llamada Nurf55 (tipo MSI-1) se asocia con extra-sexcombs (ESC), Supresor of Zeste 12 [SU(Z)] y Enhancer of Zeste [E(Z)]. Este complejo fue primeramente caracterizado participando en el silenciamiento de los genes *Hox*, que son genes asociados a reguladores del desarrollo (Bello *et. al.*, 1998; Schuettengruber *et. al.*, 2007). Se ha encontrado que la proteína p55 participa como parte del complejo CAF-1, el cual interactúa con el complejo PRC2, y que p55 ayudaría a PRC2 a realizar la marca en H3K27me3. Esta marca es necesaria para la represión del gen *senseless* que es necesario para la formación del ojo en el embrión y para la regulación de los genes *hox*; por lo que errores en la función del complejo PcG2 provocaría errores en la formación del embrión (Anderson *et. al.*, 2011).

- Complejo desacetilasa y remodelador del nucleosoma (NURD), Remodelación de la cromatina. El complejo NURD, también conocido como Mi-2, tiene un tamaño aproximado de 2MDa y tiene una amplia distribución en tejidos y células de mamíferos. Este complejo está compuesto por al menos siete proteínas, entre las que se encuentran la RbAp46/RbAp48 y las histonas desacetilasas HDAC1 y HDAC2; posee actividad remodeladora de nucleosomas dependiente de ATPasa, siendo una característica importante de este complejo, acoplar ambas funciones, las actividades desacetilasa y remodeladora. Hasta ahora se predice que este complejo reprime la transcripción (Bowen *et. al.*, 2004; Denslow *et. al.*, 2007).
- Factor de remodelación de la cromatina (NURF). El factor de remodelación de la cromatina, se encuentra en *Drosophila* y funciona desplazando los nucleosomas de manera dependiente de ATP, esto provoca que se abra la cromatina permitiendo la expresión génica. El complejo contiene tres subunidades: BPTF la subunidad mayor, SNFL2 con actividad ATPasa y la subunidad RbAp48 (Qiu *et. al.*, 2015). El complejo es reclutado hacia el DNA por medio de la interacción con factores de transcripción y por las modificaciones a las histonas. Se ha visto que este complejo es importante para diversos procesos, incluyendo genes específicos asociados al destino celular, pues ayuda a mantener el fenotipo de las células madre (Mack, 2015).

2.5 Funciones asociadas a MSI-1

Proliferación, crecimiento y regeneración.

El primer reporte que asocia directamente RbAp48 con la proliferación celular se realizó en *Xenopus laevis*, en donde la proteína recombinante se inyectó en oocitos, lo que provocó que no se expresara el receptor de la hormona tiroidea (TR β A) molécula importante en todos los tejidos durante la metamorfosis. El gen de TR β A es silenciado debido a que RbAp48 interactúa con complejos RPD3, con actividad desacetilasa, y con SIN-3 un regulador transcripcional; en conjunto RbAp48/RPD3/SIN-3 regulan la transcripción durante procesos de proliferación (Vermaak, 1999).

La proteína RbAp48 humana también se ha asociado con el control del crecimiento celular, pues un *knockdown* de esta proteína junto con su homóloga RbAp46 detiene el crecimiento de células HeLa, mientras que la disminución de cada una causa una disminución de la proliferación celular (Hayashi, 2004). Además, se ha reportado que RbAp48 aumenta su expresión en la leucemia y el carcinoma tiroideo, pero si se hace *knockdown* de RbAp48 en las células cancerosas, éstas disminuyen su ritmo de crecimiento y dejan de formar colonias (Pacífico, 2007).

Por otro lado, en el pez cebra (*Danio rerio*) se analizaron las funciones del complejo NuRD, que incluye la proteína rbb4 (análoga de MSI1); por medio de un *knockdown* de RBB4, se observó correlación entre la disminución de esta proteína y el porcentaje de los niveles de regeneración y de las células en proliferación en aletas dañadas, por lo que se concluye que ésta participa en el proceso regenerativo (Pfefferli *et. al.* 2014).

Desarrollo sexual.

Se ha visto que en *A. thaliana* las proteínas MSI-1 participan en procesos relacionados con el desarrollo sexual, como la floración y la formación de las semillas. El proceso de transición durante la floración es el aspecto más crítico

que se ve afectado por mutantes de MSI-1 (Reyes *et. al.*, 2002). Las mutantes atMSI-1 presentan una disminución en la progenie debido a que el desarrollo del primordio apical se arresta, las flores y por tanto los óvulos no se forman y esta generación es estéril (Hennig *et. al.* 2003). Posteriormente, se encontró que la actividad de AtMSI1 es requerida para la formación eficiente de la cromatina, lo que regula la expresión temporal de los genes órgano-específicos AGAMOUS y APETALA2. Es importante para este trabajo mencionar que en los parásitos Apicomplexa, *Toxoplasma*, *Theileria*, *Cryptosporidium* y *Plasmodium* se han identificado ortólogos del gen APETALA2 y que fueron nombrados como ApiAP2 (Ankarklev *et. al.*, 2014). Las ApiAP2 son proteínas de unión al DNA que están involucradas en la maduración de gametocitos pues la disrupción del gen que codifica para estos factores de transcripción o su disminución por knockdown evitan que se produzca la gametogénesis (Kafsack *et. al.*, 2014; Sinha *et. al.*, 2014); también influyen en el oocineto, pues regulan la expresión de un gran número de genes del oocineto involucrados en la invasión; además, un knockdown del gen de ApiAP2 de *P. berghei* hace inviable el desarrollo del ooquiste (Ankarklev, *et. al.*, 2014; Painter *et. al.*, 2010). Así, en *P. berghei* y *P. falciparum* los ApiAP2 se considera un regulador maestro esencial para la diferenciación sexual, estos factores de transcripción además pudieran estar regulados de forma epigenética, pues su represión parece estar asociada con marcas epigenéticas como la tri-metilación de la H3 (Alano, 2014).

Por otro lado, MSI-1 de *Arabidopsis* se asocia en el complejo CLR4 (ligasas E3 basadas en cullina) que incluye a CUL-4 y DDB1A, que realiza la ubiquitinación de proteínas. En este caso, MSI-1 forma parte del sustrato de este complejo y se sabe que MSI-1 está asociado a PRC-2, complejo Polycomb regulador de la actividad del gen MEDEA. Se observó que las mutantes de CUL-4 afectan las funciones del gen MEDEA, afectando de este modo el desarrollo de las semillas, por lo que se deduce que es probable que el complejo CUL-4 esté ubiquitinando el complejo PRC-2, por lo que la ubiquitinación estaría influyendo la expresión génica (Dumbliauskas, 2011).

En *C. elegans* la proteína homóloga de MSI-1, RBB4, está relacionada con el desarrollo de la vulva, mutantes con delección de RBB4 resultan en un fenotipo multivulva con participación de células que normalmente no formarían esta estructura. En este caso RBB4 se asocia a HDA1, LIN35 y otros componentes del complejo NuRD para regular negativamente la expresión de genes del desarrollo; estudios posteriores señalan que LIN-53 regula negativamente la actividad de *Lin-39 Hox*, antagonizando la actividad de Ras (Solari, 2000; Chen, 2001).

En mamíferos, además de regular la proliferación y reducir el fenotipo tumorigénico, las proteínas RbAp46/48 en general se expresan en forma constitutiva en niveles basales en los tejidos, excepto en el timo, útero, ovario y testículos. Dado que en estos tejidos se observa el doble de los niveles de expresión de RbAp46/48, se sugiere que este complejo también podría influir en la reproducción sexual (Qian, 1995).

Respuesta al daño al DNA.

Se ha reportado que el complejo CAF-1 de mamíferos, del cual forma parte RbAp48, participa en la restauración de la cromatina durante la reparación del DNA. Así, al co-inmunoprecipitar complejos asociados a las histonas H3.1 y H3.3 de células Hela, se observó que CAF-1 se une específicamente con la variante de histona H3.1 y promueve que sea depositada en el DNA en la replicación *in vitro* (Tagami, 2004)

Por otro lado, utilizando un marcaje *in vivo*, se siguió a las histonas recién sintetizadas *in vivo* en células HeLa, y se observó que CAF-1 co-localiza con los focos de replicación, momento en que también se deposita la histona H3.1, por lo que su participación estaría restringida a la fase S, aunque se desconoce el mecanismo (Ray-Gallet, 2012).

Fosforilación de MSI-1 en Plasmodium spp.

La gametogénesis es un proceso fundamental en el ciclo de vida de *Plasmodium*, es indispensable para que ocurra la infección del mosquito vector y como resultado se genera la variación biológica. Para que la gametogénesis ocurra, existen muchos procesos moleculares que deben regularse a tiempo y en la magnitud adecuada para la generación de gametos activos, pero los mecanismos de esta regulación aún son desconocidos. Entre estos mecanismos está la fosforilación por lo que en un trabajo realizado en el laboratorio, se analizaron las proteínas que cambiaron su fosforilación en el cambio de gametocitos a gametos por electroforesis 2-D e inmunoblot; utilizando anticuerpos α -pSer y α -pThr se observó una proteína de *Plasmodium berghei* de peso 50.72 y pI 4.92 que se fosforila de forma diferencial durante la gametogénesis y la molécula fue identificada como una proteína tipo MSI-1 (PBANKA_020300). En este mismo estudio, se identificaron por espectrometría de masas, los residuos fosforilados S3 y Thr18, siendo el primer reporte que señala a MSI-1 fosforilada (Alonso-Morales, *et al.*, 2015). La proteína MSI-1 no se ha caracterizado en *Plasmodium sp.*, pero dada la amplia gama de funciones de esta proteínas en diferentes sistemas, incluyendo la regulación de la expresión durante el desarrollo y estados sexuales es de interés estudiar esta molécula en *Plasmodium spp.*

III. JUSTIFICACIÓN

La malaria continúa siendo una amenaza para la salud a nivel global ya que no se ha podido erradicar definitivamente, debido, entre otras causas, a que existe resistencia a los medicamentos en *Plasmodium*, el agente causal; además dado el complejo ciclo de vida del parásito y sus características biológicas no hay una medida única que permita su eliminación y éstas también dificultan su estudio (varias especies causantes de malaria, gran cantidad de proteínas hipotéticas únicas del parásito, evasión del sistema inmune, etc.). Identificar moléculas exclusivas de *Plasmodium spp.* es un asunto de interés |dado el potencial que tendrían como blancos terapéuticos.

Previamente reportamos en *P. berghei* la expresión de un homólogo del supresor multicopia de ira 1 (MSI-1), el cual cambia su fosforilación durante la gametogénesis. Los homólogos de MSI-1 en otros organismos funcionan como co-activadores transcripcionales mediante la asociación a complejos reguladores de la cromatina, entre los que destacan complejos represores de la transcripción (NuRD, Polycomb), activadores (NURF) y en complejos que participan en el ensamble de nucleosomas durante la proliferación de las células (CAF-1). Estos diversos complejos regulan la expresión génica, por lo que la proteína MSI-1 es clave en procesos como la diferenciación, regeneración, crecimiento y reproducción. Así dado que ya se había detectado anteriormente PbMSI-1 en fases sexuales y dada la importancia que puede tener esta proteína en procesos asociados también en fases asexuales, aunado al hecho de que las fases asexuales son las formas más letales del parásito para su hospedero, se decidió estudiar esta molécula en las fases sanguíneas de *P. berghei*, modelo murino de malaria.

IV. HIPÓTESIS

PbMSI-1 presenta expresión y/o modificaciones post-traduccionales que cambian a lo largo del ciclo intraeritrocítico asexual de *P. berghei*, lo que podría asociarse con el desarrollo y proliferación de *Plasmodium berghei*.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar las características de estructura y filogenia de PbMSI-1 por análisis *in silico*, así como su expresión y su fosforilación en las fases asexuales.

5.1.1 Particulares

1. Analizar *in silico* la filogenia y la estructura de PbMSI-1.
2. Evaluar la expresión génica de PbMSI-1 en las diferentes fases del ciclo intraeritrocítico.
3. Determinar la fosforilación de PbMSI-1 en las fases sanguíneas de *P. berghei*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

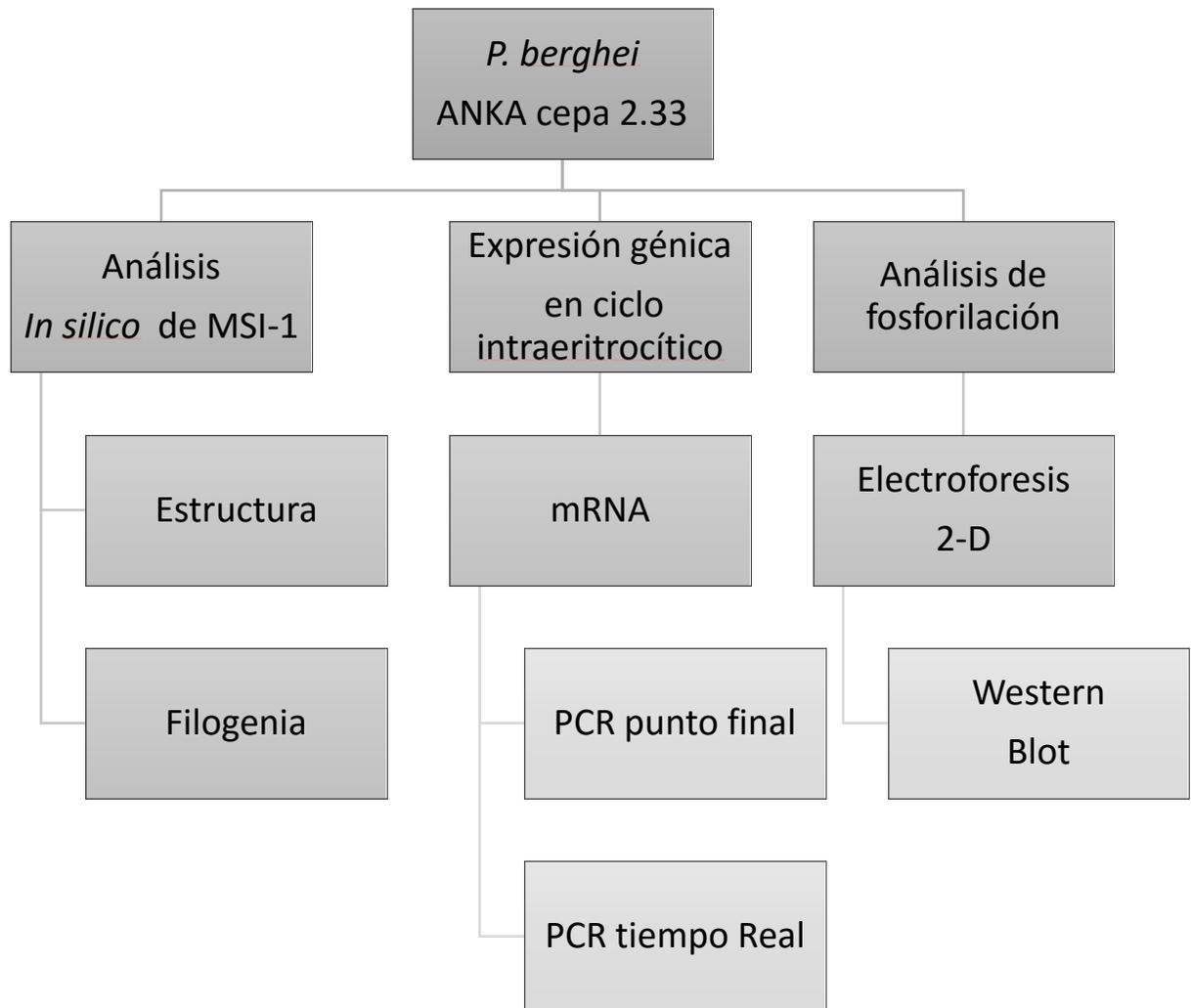


Figura 4. Estrategia experimental planteada para el análisis de PbMSI-1.

6.1 Análisis *in silico* de MSI-1.

Para el análisis de las secuencias genómica y de aminoácidos se utilizaron los programas BLAST, accesible en el sitio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y los programas ALIGN y CLUSTALW del sitio workbench.sdsc.edu.

Para el análisis de predicción de la estructura 3-D de la proteína se utilizó el programa I-TASSER, accesible en la dirección zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/; para la predicción de dominios estructurales se utilizó el programa SMART, accesible en smart.embl-heidelberg.de y también se utilizó el sitio [edu/wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp](http://edu.wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp) y para el análisis de los posibles sitios de fosforilación de PbMSI-1 de fases asexuales, se utilizó el programa NetPhos Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Para construir un cladograma de análisis filogenético, se utilizó la secuencia de aminoácidos de 17 proteínas MSI-1 de diferentes especies (*Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*, *Eimeria falciformis*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*) obtenidas de las bases de datos PlasmoDB, EupathDB y UniprotKB y se analizaron con el programa MEGA 6.0 (www.megasoftware.net).

6.2 Material biológico.

6.2.1 Modelo murino *P. berghei*

Para los experimentos, se utilizó *P. berghei* de la cepa Antwerpen Katanga (ANKA) clona 2.33 no productora de gametocitos (proporcionados por el Colegio Imperial de la Universidad de Londres, Inglaterra a la Dra. María del Carmen Rodríguez del INSP), las cuales se mantienen mediante pases cíclicos en ratones machos de la cepa BALB/c.

6.2.2 Producción y enriquecimiento de formas Asexuales (Anillos, Trofozoítos, Esquizontes).

Para la producción de parásitos en cantidad suficiente para los experimentos, se infectaron ratones BALBC/c de 6-8 semanas de edad, por vía intraperitoneal con 10^6 parásitos. Después de 4-5 días, se verificó que la parasitemia fuera $>50\%$ para proceder a la obtención de sangre por punción cardíaca, utilizando heparina (1000 UI/ml). La sangre se suspendió en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS: 8 g de NaCl; 0.2 g de KCl; 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4 a pH de 7.4) a temperatura ambiente. A continuación, la sangre se centrifugó ($200 \times g \times 3 \text{ min}$) y se descartó el sobrenadante; este procedimiento se repitió como lavado tres veces. Las células sanguíneas recuperadas se fraccionaron a través de una columna de celulosa (Sigma) para eliminar los glóbulos blancos y el filtrado obtenido se centrifugó y lavó, como se mencionó anteriormente; posteriormente, las células se suspendieron en PBS y se colocaron sobre un gradiente discontinuo de Percoll con fases al 60%, 70%, 80% y 90%, elaborado con Percoll iso-osmótico (Percoll GE Healthcare/ sacarosa 2.5 M; 9:1 v/v). El gradiente se centrifugó a $18000 \times g \times 30 \text{ minutos}$ a 4°C y los parásitos obtenidos de la separación se colocaron sobre un colchón de Percoll, el paquete de la parte superior (entre el 70-60%) se colocó sobre el gradiente de 45% para obtener trofozoítos y esquizontes; y el paquete obtenido de la parte inferior (entre el 90-80%) se colocó sobre un colchón al 66%, de donde se obtendrán anillos y células sin infectar; se centrifugaron a $2000 \text{ rpm} \times 30 \text{ min}$. Las fases enriquecidas en eritrocitos infectados (Anillos, Trofozoítos, Esquizontes) fueron lavadas con PBS y posteriormente los parásitos fueron liberados por tratamiento con saponina al 0.15% (en PBS) (Rodríguez *et. al.*, 2002) incubando durante 15-20 min a 37°C . La muestra fue lavada con PBS hasta eliminar los rastros de saponina. Al finalizar, se realizaron frotis teñidos con Giemsa al 20% para observarlas al microscopio y determinar la pureza de las muestras. En caso necesario, las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.3 Análisis de la expresión de MSI-1 en fases asexuales.

6.3.1 Extracción de RNA total.

Para la obtención del RNA, se utilizó el método de extracción con TRIzol (Life Technologies, E.U.A.), que es una solución monofásica que contiene fenol e isotiocianato de guanidina para facilitar la extracción de RNA y evitar la acción de RNAsas; para ello se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf).

Dependiendo de la cantidad de parásitos obtenida, a la pastilla se le agregaron 200µl- 1ml de TRIzol, homogenizando suavemente y se incubó de 5-30 minutos (4° C) para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Después de la homogenización se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugó a 12000 x g x 15 minutos (4°C). Se agregaron 500 µl de isopropanol frío a la fase acuosa y se incubó a -20°C toda la noche para precipitar el RNA, luego se centrifugó a 12000g x 10 minutos (4°C). El RNA se lavó con etanol al 75% (en agua DEPC 0.1%), centrifugando x 5 minutos, el sobrenadante se decantó, la pastilla se dejó secar y se suspendió en agua con Dietil pirocarbonato 0.1% (DEPC). La integridad de la muestra se verificó por electroforesis en gel de agarosa (1%) y también se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop para medir la absorbancia a 260 y 280nm, para así poder determinar la pureza del RNA y calcular la concentración, calculada con el cociente 260/280.

6.3.2 Tratamiento del RNA y Retrotranscripción (RT)

Para eliminar los restos de DNA genómico y evitar errores en los análisis de expresión del RNA, el material se trató con la enzima DNAsa I (Invitrogen). Para este fin se colocó 1 µg de RNA, se añadió 1 µl del amortiguador de reacción 10X (Invitrogen), 1 µl de DNAsa I (1 U/ml) y se añadió agua tratada con DEPC cbp. 10 µl. Para confirmar la eficacia del tratamiento con DNAsa, se realizó una PCR punto final amplificando un fragmento del gen constitutivo 18S, esperando no ver

amplificación en las muestras de RNA. Las reacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, siguiendo protocolos estándar (Ausubel, 2003: Current Protocols in Molecular Biology).

Para la síntesis de cDNA, a 800 ng de RNA se le añadió 1 µl del oligonucleotido adaptador (OligodT) (10 µM) (5'GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'), y 1 µl de dNTPs (10µM), además de agua destilada hasta 20 µl. La mezcla se llevó a 65 °C x 5 min y luego se colocó en hielo x 2 min. Se añadieron 4 µl del amortiguador First-Strand Buffer 5 x y 2 µl de DTT 0.1 M. Posteriormente, la mezcla se incubó 2 min a 42°C y se agregó 1 µl (200 U) de la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y se incubó a 42°C x 50 min; la reacción se inactivó a 70 °C x 15 min. El cDNA se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su utilización.

6.3.3 Diseño de oligos.

Se diseñaron oligos específicos para MSI-1 de *P. berghei* (Chromatin Assembly Factor 1 de *P. berghei*; plasmodb PBANKA_020300) y para el gen que codifica para el RNA ribosomal 18S (berg07_18S), este último para utilizar como control endógeno de integridad del RNA aislado. El diseño de los primers para los protocolos de PCR se realizó con ayuda del software PrimerBLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y Primer3 (idtdna.com y workbench.sdsc.edu); y para verificar que las secuencias amplificadas fueran específicas de *Plasmodium* se utilizó BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El producto obtenido fue secuenciado en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM, y se encontró coincidencia con la secuencia esperada del gen de *P. berghei*.

Así, para la PCR punto final y la qPCR se seleccionaron los siguientes pares de oligos:

18S.F	5'-TTGGCTCCGCCTCGATATC-3'	77 pb
18S.R	5'-GATAAATCATTGGGCTCTCAAAGG-3'	qPCR
MSI.F	5'-CTACAGAACCCGCTCAACAAG-3'	89 pb
MSI.R	5'-TCCAGATGCAAAATGTCCAG-3'	qPCR
18S2.F	5'-GGCTCCGCCTCGATATCTTC-3'	244 pb
18S2.R	5'-ATGCCCCCAAGCTACTCCTA-3'	
MSI2.F	5'-ACTACAGAACCCGCTCAACA-3'	144 pb
MSI2.R	5'-TGCATTGATGATATGTGCAGGC-3'	

Tabla 2. Listado de primers elegidos para la PCR tiempo real (marcados como qPCR) y para la PCR punto final. En la columna de la derecha se muestra el tamaño esperado de los fragmentos amplificados.

6.3.4 PCR punto final

Para cada reacción de PCR, se utilizó el Amortiguador proporcionado con la enzima GoTaq 1X, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM de dNTP's, 10 pmol de cada uno de los cebadores, 1 U de la enzima *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen) y agua MiliQ cbp 25 µl, además de 1 µl (100ng) de cDNA por cada muestra. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de PCR punto final Verity de 96 pozos (Applied Biosystems), utilizando las siguientes condiciones: 7 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45 seg a 60°C y 45s a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos amplificados se analizaron por una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% teñido con Bromuro de Etidio y se observaron en un fotodocumentador LAS4000 (GE Healthcare).

6.3.5 qPCR

El cDNA obtenido de la RT se utilizó como molde para la PCR cuantitativa para evaluar la expresión de los genes MSI-1 y 18S, para la cual se utilizó el equipo Step One Real Time PCR (Applied Biosystems), primers 200 nm (tabla 2) y el SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems) 1X, bajo las siguientes condiciones: 8 min de activación a 95°C y 40 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 60°C y 15s a 72°C. Además de analizar cada una de las fases por triplicados biológicos, cada una de las réplicas biológicas se corrió también por triplicado. Se obtuvieron los valores de Ct (Ciclo umbral) de cada una de las reacciones; con estos datos se calculó el Ct promedio de cada uno de los genes (MSI-1, 18S) y con estos datos se determinó el ΔCt ($Ct_{MSI} - Ct_{18S}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Con los valores obtenidos se realizó un gráfico y el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 6.01 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

6.4 Análisis de la fosforilación de MSI-1 en fases asexuales de *P. berghei* por western blot 2D.

6.4.1 Extracción de proteínas para 2D.

Para realizar el 2D- Western Blot se extrajeron las proteínas de *P. berghei* de la manera siguiente: A los parásitos purificados que fueron tratados previamente con saponina, se agregaron 60 μ l de buffer de muestra para isoelectroenfoque (urea 7 M, Tiourea 2 M, 4% CHAPS, buffer IPG 3-10 N-L), DTT 40 mM), 20 μ l de un coctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche EUA) y 20 μ l de un coctel de inhibidores de fosfatasas (PhosStop, Roche). Los parásitos se lisaron con tres ciclos de congelación/descongelación utilizando nitrógeno líquido, posteriormente las proteínas se precipitaron con ácido tricloro-acético al 77% (TCA); además las muestras también se trataron con el 2-D Clean-Up kit (Amersham Biosciences) de acuerdo a los protocolos del proveedor. Las muestras se resuspendieron en 100 μ l de buffer de hidratación para isoelectroenfoque (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%, buffer IPG 3-10, azul de bromofenol 0.002%). La concentración de proteínas

se determinó utilizando el kit comercial 2D Quant (Amersham Biosciences), y se utilizaron 200 ug de proteína diluidos en 140 ul de Buffer de hidratación.

6.4.2 Electroforesis bidimensional (2-D).

La separación de las proteínas se hizo en base a su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular por electroforesis bidimensional (2D). Para este fin, a tiras prefabricadas de 7 cm, pH 3-10 NL (GE Healthcare Bio-Sciences AB) se les colocaron 200 µg de proteína solubilizada en 120 µl de buffer de hidratación durante 16 h para una hidratación pasiva. Posteriormente, las proteínas se separaron en una dimensión por punto Isoeléctrico, utilizando el sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Bio-Sciences AB), en una corrida con cuatro etapas: la primera de 300 y 200 V/h, 100 y 300 V/h, 5000 y 4500 V/h y la cuarta de 5000 y 2000 V/h. Posteriormente las tiras se equilibraron en 100 mg DTT: 10ml buffer de equilibrio (urea 6 M, Tris-HCl, pH 8.8 75 mM, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%) se incubaron por 15 min con iodoacetamida (GE Healthcare, Suecia) disuelto igualmente en 10 ml de buffer de equilibrio. Después de este paso, las proteínas se separaron por peso molecular en geles SDS-PAGE al 10 % por 20 min a 80 V- 100 V hasta finalizar el corrimiento. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham Protran Premium 0.45 (GE Healthcare) en una cámara de transferencia Mini trans Blot Electroforetic Chamber Cell (Biorad) durante 2 h a .125 mA.

6.4.3 Western Blot

Las membranas de nitrocelulosa transferidas se bloquearon con albúmina sérica bovina al 5 % por 1 h, se lavaron una vez con TBS-T 0.1 % (Tris Buffered Saline-Tween 20) y se incubaron con anticuerpos α -fosfotreonina y α -fosfoserina (4°C). Al día siguiente la membrana de NC se lavó con TBS/T 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa (Pierce, Rockford USA) a una dilución 1:80000 durante 2 h. Por último, los sitios de unión del anticuerpo se revelaron por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) y la señal se observó en un Fotodocumentador Image Quant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences).

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* de MSI-1 de *P. berghei*.

7.1.1 Homólogos de MSI-1 en apicomplexa y otros eucariontes.

La proteína PBANKA_020300 fue encontrada previamente en fases sexuales y es una MSI-1 putativa de 50.7 kDa y 4.92 pI (Alonso-Morales *et. al.*, 2015). El gen de PBANKA_0203000 codifica para una proteína de 446 aa nombrada como Chromatin Assembly Factor 1 de *P. berghei*, y que además comparte un 97% de identidad con una proteína MSI-1 de *P. yoelii*; un 33% de identidad con la proteína MSI-1 humana (llamada RbAp48) y un 33% con la proteína MSI-1 de *A. thaliana*.

Las proteínas homólogas a MSI-1 de *P. berghei* en otros Apicomplexa se buscaron en las bases de datos disponibles, puesto que no existen estudios de esta proteína en otras especies de este filum. Con esta información se construyó un Filograma (Fig. 5) en el cual se observa que las proteínas MSI-1 de las especies del género *Plasmodium* se agrupan claramente en un mismo nodo, el cual posee un soporte Bootstrap del 100%, lo que indica que se encuentran altamente conservadas. Cabe señalar que en *P. yoelii* se encontraron tres genes que codifican para tres proteínas MSI-1 altamente idénticas entre sí; mientras que en *P. falciparum* hay dos proteínas MSI-1 idénticas. Por otro lado, las proteínas tipo MSI-1 de los Apicomplexa se encuentran agrupadas en otro clado diferente pero próximo al de *Plasmodium*. Finalmente, las proteínas MSI-1 de plantas, humano e insectos fueron las más lejanas a las proteínas PbMSI-1.

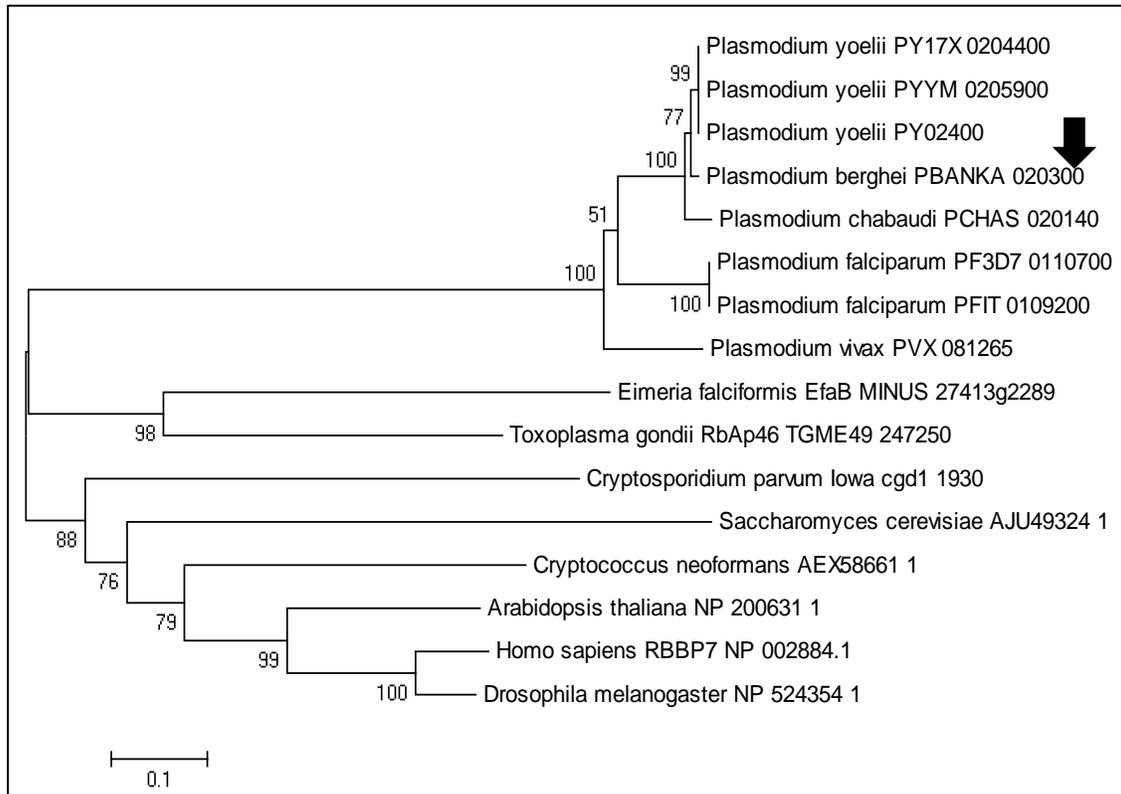


Figura 5. Análisis de los homólogos de la proteína MSI-1 en diversos eucariotes. La proteína PbMSI-1 se señala con una flecha negra. En los nodos se muestran los valores de Bootstrap con un soporte mayor a 50%. Las secuencias de MSI-1 se alinearon y analizaron con el software MEGA 6.0 por Maximum Likelihood (ML).

7.1.2 Dominios conservados de PbMSI-1.

El análisis bioinformático (SMART/ edu.wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp/) predice que la proteína MSI-1 de *P. berghei* posee dos dominios estructurales a saber: el dominio CAF1-H4bd o dominio de unión a histona 4 y un dominio con siete repetidos WD40 (Fig. 6). El dominio CAF1-H4bd predicho (FIG. 6-a) coincide con el dominio de la RbAp46, MSI-1 humana, es un dominio que posee una α -hélice que se encuentra justo antes de que inicien los repetidos WD40 y es entre el dominio CAF1-H4bd y el C-terminal que la RbAp46 es capaz de unirse a la histona 4 directamente en la invaginación que se forma entre la hélice- α N- terminal y el último β -plegado (REF). Este dominio parece ser exclusivo de las proteínas tipo MSI-1 puesto que no se encuentra en otras proteínas WD40 (Murzina *et. al.*, 2006).

Debido a que las secuencias de las proteínas de *Plasmodium* suelen variar con respecto a la de otros organismos, se realizó un alineamiento de los repetidos WD40 predichos para la proteína MSI-1 de *P. berghei* y los predichos para las MSI-1 más estudiadas, la de *A. thaliana* y la de *H. sapiens* (Fig. 4-b). A pesar de poseer una identidad del 30% con las otras proteínas, los repetidos WD40 de PbMSI-1 poseen aminoácidos altamente conservados si se comparan con las otras MSI-1; se identificó que las secuencias de repetidos WD40 de PbMSI-1 terminan en YD, WD, FD, y WQ que coinciden con secuencias altamente conservadas en mamíferos y *Arabidopsis*; además, otros aminoácidos, como G, A, H, S, E se conservan al inicio de los repetidos en los tres organismos. Dada la variabilidad en tamaño, composición, función y estructura de las proteínas que contienen repetidos WD40 ha sido difícil caracterizar secuencias consenso de los repetidos WD40; sin embargo se sabe que en los mamíferos, además del WD al final de los repetidos, se encuentran generalmente una G seguida de una H cercanas al inicio de los repetidos WD40 (Smith, 1999) lo que no parece ser el caso en *Plasmodium*; sin embargo, también se han reportado sustituciones de estas secuencias por otros aminoácidos en diversos organismos (Neer, 1994; haldane.bu.edu/projects/wdrepeat/).

7.1.3 Modelado 3-D de la estructura de MSI-1 de *P. berghei*.

Para proponer la posible estructura de la proteína MSI-1 de *P. berghei* se usó el programa I-Tasser y se encontró que tiene una estructura similar a la proteína RbAp48 humana, con siete estructuras β -plegadas, una hélice alfa N-terminal y un loop en el C-terminal; indicando que, aunque la secuencia de aminoácidos de PbMSI-1 es idéntica sólo en un 30 % a la secuencia MSI-1 de mamíferos (Fig. 1), la estructura total que adoptaría es similar a la que se presenta la proteína de mamíferos.

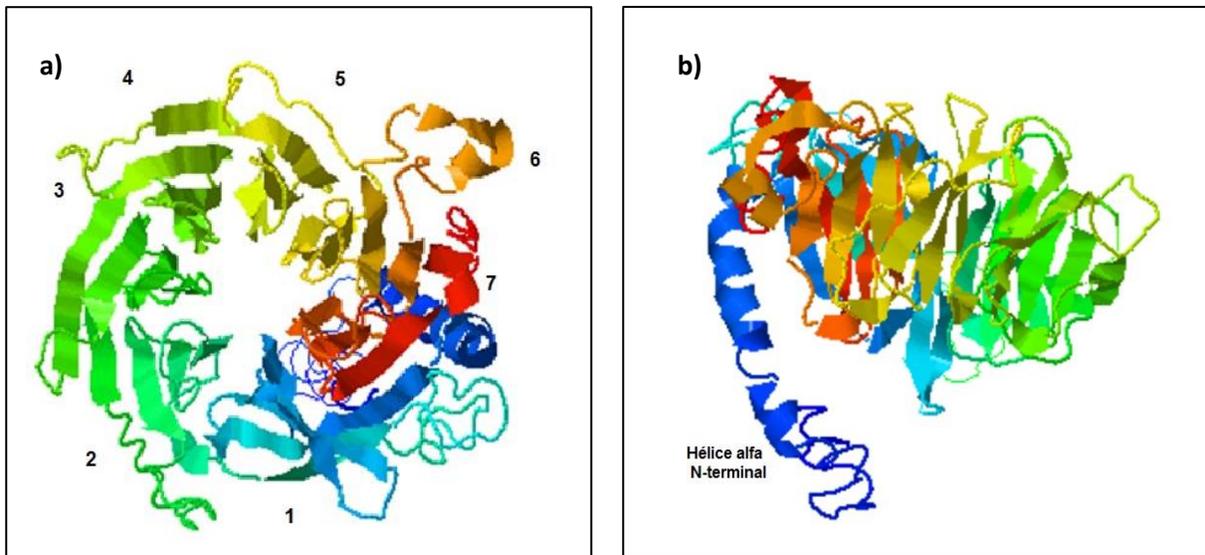


Figura 7. Modelo de la estructura tridimensional de PbMSI-1. Se utilizó el modelo con el más alto C-score (-0.6) cuyos valores oscilan entre -5 a 2 y un buen modelo es aquel con un valor mayor a -1.5. En a) los números señalan el número de estructuras β -plegadas presentes y en b) se señala la hélice alfa N-terminal (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

7.1.4 Predicción de sitios de fosforilación de MSI-1 de *P. berghei*.

Dado que PbMSI-1 se encontró fosforilada en las fases sexuales de *P. berghei*, se hicieron las predicciones de los sitios fosforilados utilizando el programa NetPhos 2.0 que utiliza una red tipo neuronal basada en motivos de secuencias que rodean los sitios de fosforilación obtenidos de una base de datos de proteínas fosforiladas, además de tomar en cuenta residuos fosfoaceptores ya identificados de proteínas cinasas y la estructura terciaria de los sitios fosforilables. Se encontró un gran número de aminoácidos como posibles sitios de fosforilación, de entre ellos, 17 serinas, 7 tirosinas y 2 treoninas mostraron los más altos scores, el score indica el grado de confianza de que el sitio predicho se encuentre fosforilado (en un rango de 0-1 donde 1 es el valor más alto, tomando en cuenta como significativos aquellos que se encuentren arriba del umbral 0.500) (figura 6). De éstas posiciones, las fosforilaciones en la serina 12 y treonina 27 fueron sitios confirmados anteriormente en el laboratorio por espectrometría de masas (Alonso-Morales, *et. al.* 2015).

Serine predictions			
Pos	Context	Score	Pred
v			
12	KRRKSNALD	0.856	*S*
23	CLELSEEPY	0.581	*S*
50	WKTNSGLLY	0.004	.
66	LEWPSLSMD	0.065	.
68	WPSLSMDFG	0.476	.
75	FGDYSDENI	0.951	*S*
95	GTHTSNNEP	0.009	.
126	KINESYEGF	0.978	*S*
143	ITIKSKIYH	0.417	.
183	INKHSIDDT	0.994	*S*
190	DTTNSDSRK	0.540	*S*
192	TNSDSRKMS	0.997	*S*
196	SRKMSPEIS	0.997	*S*
200	SPEISFIGN	0.051	.
206	IGNNSDGFG	0.166	.
215	LEFNLSLKKY	0.286	.
228	GNDGSINVY	0.004	.
238	YNDLSAKSL	0.663	*S*
241	LSAKSLNPF	0.214	.
247	NPFYSVKYK	0.070	.
252	VKYKSPIND	0.996	*S*
258	INDVSPTND	0.966	*S*
302	VNAISLNTF	0.007	.
312	GHFASGSDN	0.978	*S*
314	FASGSDNGK	0.004	.
347	RLNFSNDS	0.996	*S*
351	SPNDSSILA	0.246	.
352	PNDSILAS	0.072	.
356	SILASASNN	0.834	*S*
358	LASASNNRF	0.051	.
381	AIDLSDGPS	0.711	*S*
385	SDGPELIF	0.009	.
390	ELIFSHGGH	0.456	.
415	MFIGSTAED	0.055	.
439	ENTVSTNT	0.961	*S*
441	TVSTNTDV	0.964	*S*

Tyrosine predictions			
Pos	Context	Score	Pred
v			
54	SGLLYDFVC	0.574	*Y*
74	DFGDYSDEN	0.912	*Y*
101	NEPNLYLYVC	0.952	*Y*
103	PNVLYVCDV	0.340	.
121	DKCVYKINE	0.667	*Y*
127	INESYEGFD	0.850	*Y*
146	KSKIYHEGE	0.184	.
219	SLKKYALTC	0.223	.
232	SINVYDYND	0.303	.
234	NVYDYNDLS	0.281	.
246	LNPFSYVKY	0.204	.
250	YSVKYKSPI	0.708	*Y*
274	ADGGYILMY	0.973	*Y*
278	YILMYDLRI	0.005	.
366	FINVYDLNK	0.045	.

Threonine predictions			
Pos	Context	Score	Pred
v			
27	SEEPYNEEI	0.203	.
41	ENVETQFAN	0.092	.
48	ANWKTNSGL	0.019	.
92	VCVGHTSN	0.061	.
94	VGHTSNNE	0.137	.
140	KNKITIKSK	0.277	.
167	HIVVTKAID	0.055	.
187	SIDDTNSD	0.219	.
188	IDDTNSDS	0.194	.
222	KYALTCGND	0.130	.
260	DVSPTNDPN	0.064	.
284	LRIKTTEPA	0.911	*T*
285	RIKTTEPAQ	0.055	.
305	ISLNTFTGH	0.023	.
307	LNTFTGHFA	0.011	.
395	HGGHTQPIT	0.096	.
399	TQPITDFNW	0.006	.
416	FIGSTAEDN	0.059	.
421	AEDNTLQFW	0.010	.
429	WQLKTELLD	0.028	.
437	DEENTVSTS	0.509	*T*
440	NTVSTNTD	0.192	.
443	STSTNDVE-	0.390	.

Figura 8. Posibles sitios de fosforilación en MSI-1 de *P. berghei*. Los títulos en la parte superior de cada tabla se refieren a la posición del aminoácido, el contexto en el que se encuentran ubicados, el score (0-1) asignado por el programa, y la predicción del aminoácido fosforilado. (NetPhos 2.0).

7.1.5 Predicción de las interacciones de MSI-1 de *P. berghei*.

También se hicieron predicciones de las proteínas con las cuales es posible que MSI-1 interactúe en *P. berghei* para generar un interactoma mediante el sistema STRING que agrupa diversas bases de datos de datos experimentales y de publicaciones. Entre las proteínas asociadas a PbMSI-1 se encontraron proteínas que en otros organismos se asocian a complejos que participan en el remodelado de la cromatina, además de actinas y la proteína Asf1 que se ha visto actúa de forma sinérgica con MSI-1 en otros organismos; por lo que estas proteínas podrían ser objeto de estudios posteriores (Fig. 9; Tabla 3).

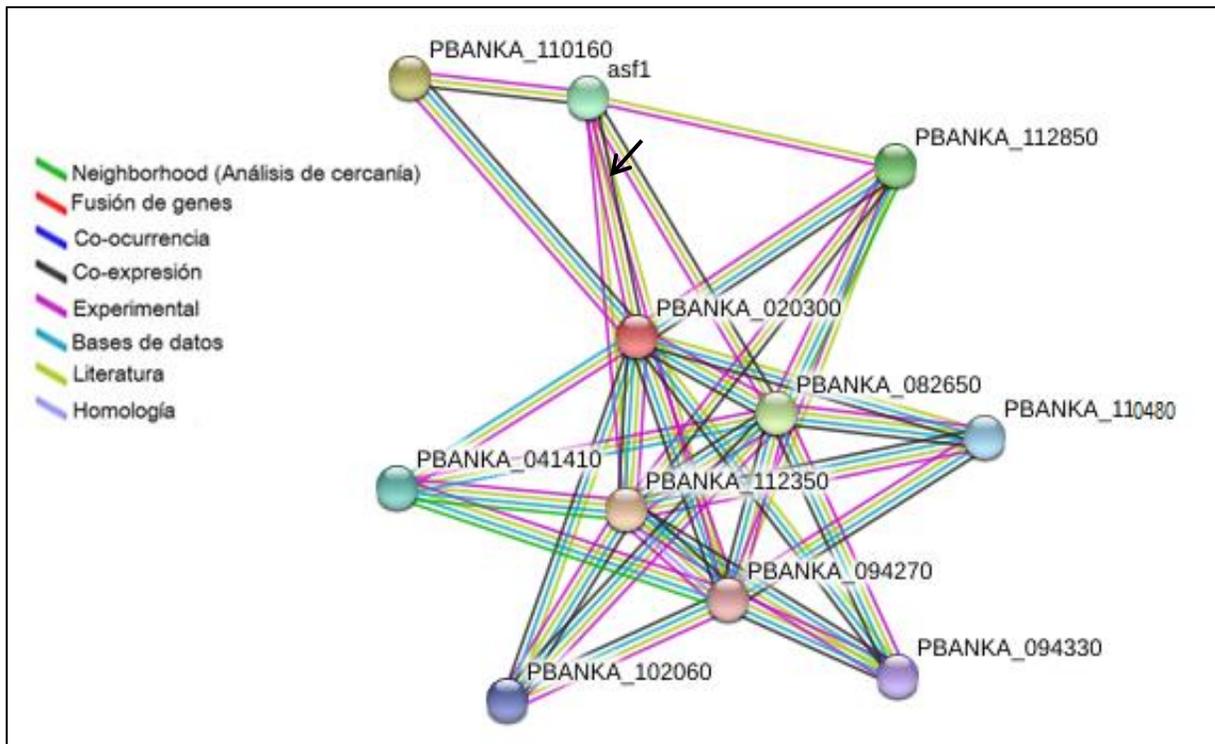


Figura 9. Interactoma de MSI-1 de *P. berghei*. Las interacciones predichas para la proteína MSI-1 de *P. berghei* (señalada con la flecha negra) se indican con líneas de conexión de colores que indican el tipo de datos que encuentra el programa para predecir la interacción (STRING 10.0).

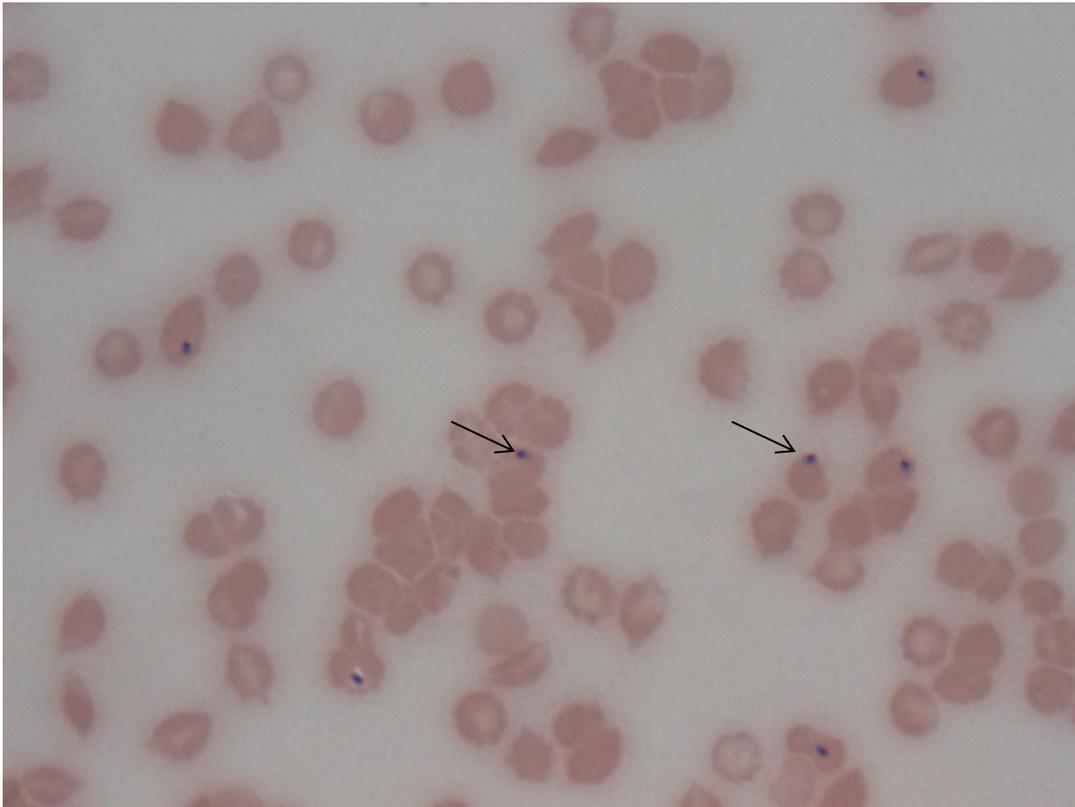
<i>P. berghei</i>	Homólogas en <i>S. cerevisiae</i>	Complejos asociados
PBANKA_110160. Proteína hipotética. Factor de ensamble de cromosoma 1.	CAC2	Subunidad del complejo CAF-1 (Meijsing, 2001).
PBANKA_082650. Histona desacetilasa putativa (HDA1).	RPD3 e HDA1	En complejos como el NURD en mamíferos y PRC2 en <i>Drosophila</i> (Denslow, 2007)
PBANKA_112350. Helicasa SNF2, putativa (ISWI).	ISW2/ISW1/SNF2	Las proteínas de este tipo se encuentran en complejos como el NURF (Langs, 2001).
PBANKA_112850. Proteína con dominio SET, putativa.	SET1	Complejo SET1 en Levaduras que metila H3K4 (Roguev, 2001). Homóloga de E(z) en <i>Drosophila</i> encontrada en polycomb PRC2 (Margueron, 2011).
asf1. Chaperona de histonas asf1 putativa.	asf1	Chaperona de H3/H4 que media el ensamble de cromatina (Adkins, 2004).
PBANKA_041410. Pirofosfatasa inorgánica putativa.	PPA2, IPP2.	Componente estructural del complejo NURF de <i>Drosophila</i> (Gdula, 1998).
Actinas: PBANKA_110480, PBANKA_102060, PBANKA_094330	ACT1/ARP1/ARP2/ARP3	Complejo INO80; complejo SWI/SNF, ambos remodeladores de cromatina (Zhao, 1998; Caims, 1998; Shen, 2000).
PBANKA_094270. Proteína remodeladora de cromatina putativa.	ISW2/ISW1/SNF2	Además de NURF se han encontrado en complejos del tipo thritorax como el SWI/SNF (Da Silva, 2014).

Tabla 3. Predicción de las proteínas que interactúan con MSI-1 y sus homólogos en *S. cerevisiae*.

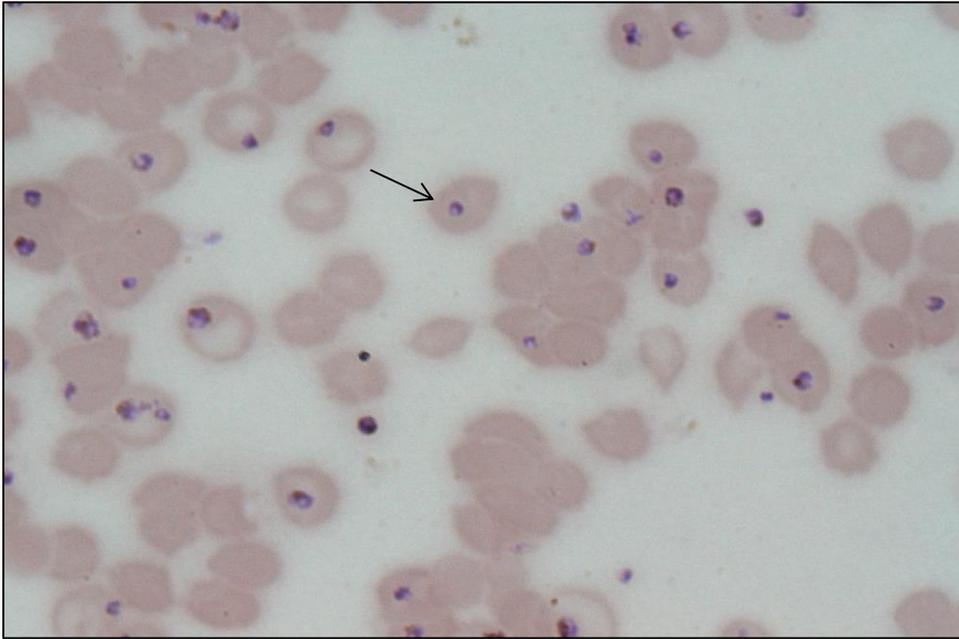
7.2 Obtención de fases asexuales enriquecidas.

Para el análisis de las moléculas en las fases asexuales de *P. berghei* se estableció el procedimiento de obtención parásitos enriquecidos por fases del ciclo de vida. Se observó una pureza mayor al 97.5 % en la fase de anillos y mayor al 90% en trofozoítos y esquizontes, con una contaminación por leucocitos < 0.1% (fig 7).

A)



B)



C)

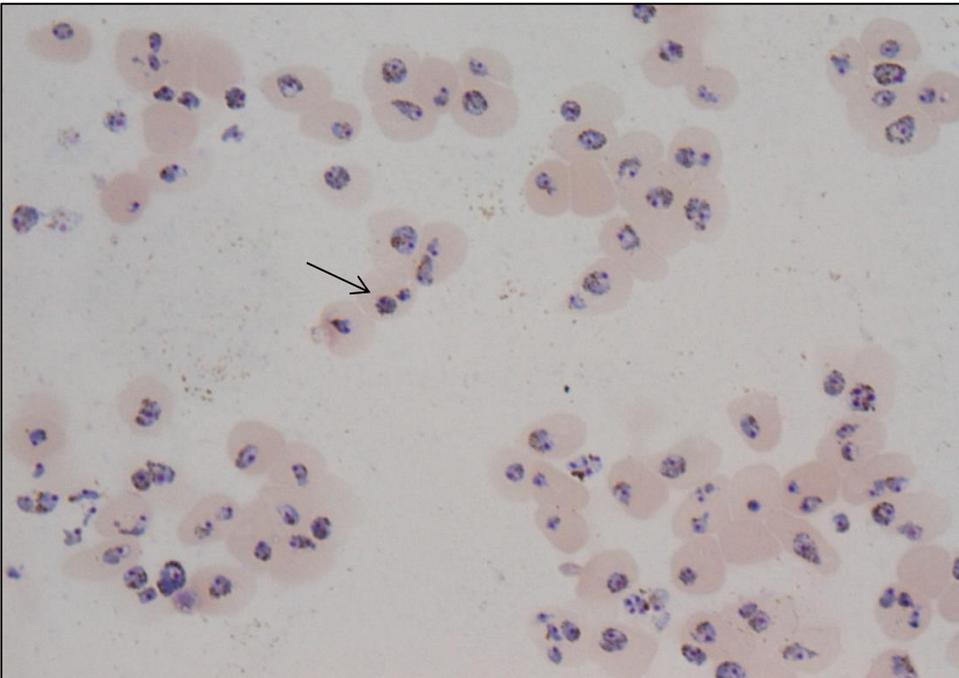


Figura 10. Preparaciones enriquecidas de fases asexuales de *P. berghei* por medio de purificación en gradiente de Percoll-Sacarosa antes de la liberación del parásito con saponina. A) Anillos, B) Trofozoítos, C) Esquizontes. Aumento 100X. Las flechas señalan ejemplos de parásitos de cada fase.

7.3 Presencia del gen de MSI-1 en DNA de *P. berghei*.

Para confirmar la presencia del gen MSI-1 se hizo la amplificación por PCR punto final del gen MSI-1 (Figura 11) y para verificar que la región de 89 pb amplificada por los primers fuera específica de este gen, el producto amplificado se secuenció y al hacer el análisis por BLAST se confirmó que la región correspondió en un 100% al gen MSI-1 de *P. berghei*.

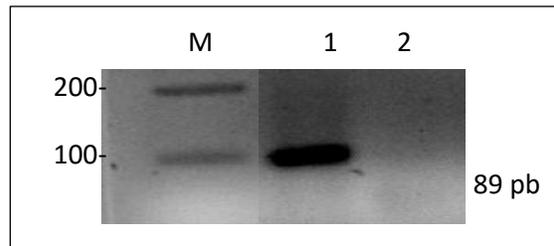


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de PCR punto final de MSI-1 de *P. berghei*. M=Marcador de pares de bases, Carril 1= DNA *P. berghei*, Carril 2= Control negativo mezcla de reacción sin DNA molde.

7.4. Análisis de la expresión génica de MSI-1 en fases asexuales.

Se procedió a analizar la expresión del gen de MSI-1 en las fases asexuales a partir de muestras de cDNA del parásito, utilizando tres réplicas biológicas por cada estadio; para ello se utilizaron dos procedimientos: RT-PCR punto final (semicuantitativa) y qPCR. Se utilizó como control endógeno el gen 18S de rRNA de *P. berghei*.

7.4.1 RT-PCR semicuantitativa.

Se encontró que la expresión del mRNA de MSI-1 en las fases asexuales del ciclo intraeritrocítico (Anillos, Trofozoítos, Esquizontes) se analizó por RT-PCR realizando tres replicados biológicos de cada una, se realizó el análisis densitométrico y se observó que la expresión es uniforme durante las tres fases (Fig. 12).

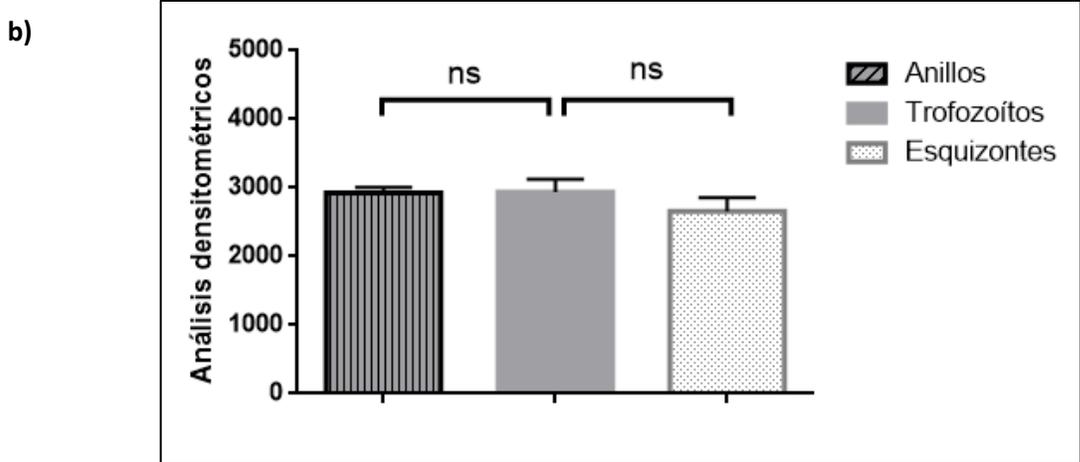
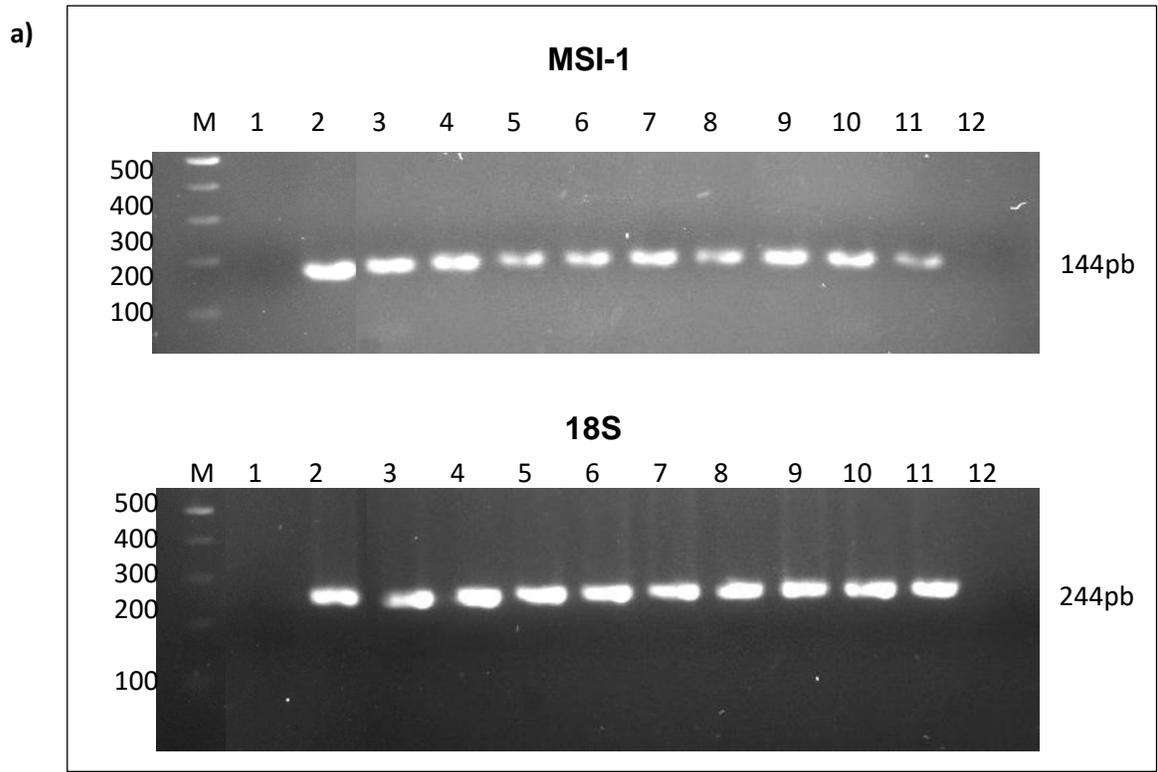


Figura 12. Análisis de la expresión génica por PCR semicuantitativa. **a)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de RT-PCR punto final (30 ciclos) de: MSI-1 (parte superior) y 18S (debajo). M= Marcador de 100pb, Carriles 1= Control negativo H₂O, 2=Control + DNA *P. berghei*; 3,4,5= cDNA Anillos; 6,7,8= cDNA Trofozoitos; 9,10, 11= cDNA esquizontes; 12= Control sangre total *M. musculus*. **b)** Gráfico de los análisis densitométricos de la expresión génica de MSI-1 en *P. berghei*. Los datos se normalizaron con los datos de la expresión del gen 18S (GraphPad Prism 6).

7.4.2 Análisis de la expresión génica de MSI-1 por PCR cuantitativa (qPCR).

Los datos observados en el análisis semi-cuantitativo, se confirmaron mediante PCR cuantitativa la cual es hasta 100 veces más sensible que la PCR punto final (Gal, 2006).

7.4.2.1 Estandarización de la qPCR

Antes de realizar el análisis de expresión relativa, se realizó la estandarización de la técnica por medio de curvas de amplificación de diluciones de las muestras (del gen 18S y MSI-1) para establecer las condiciones adecuadas de la reacción (Figura 14) para observar la temperatura óptima de amplificación y que los primers no generaran dímeros (Figura 13). La curva patrón generada a partir de estos datos tuvo un coeficiente de correlación $r=0.9$.

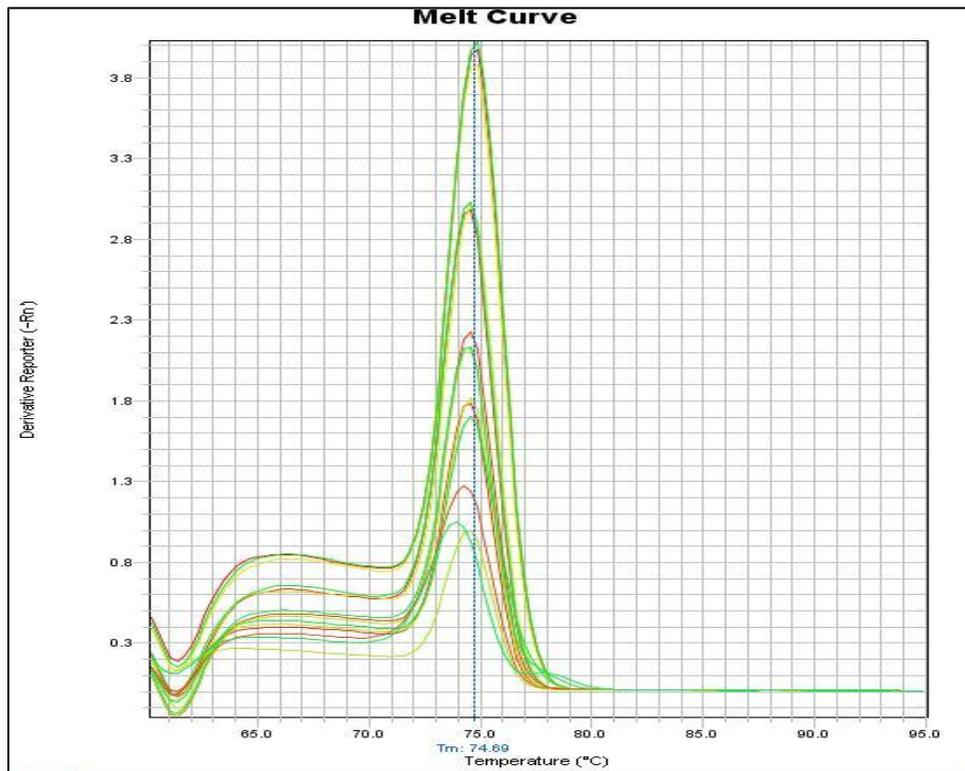
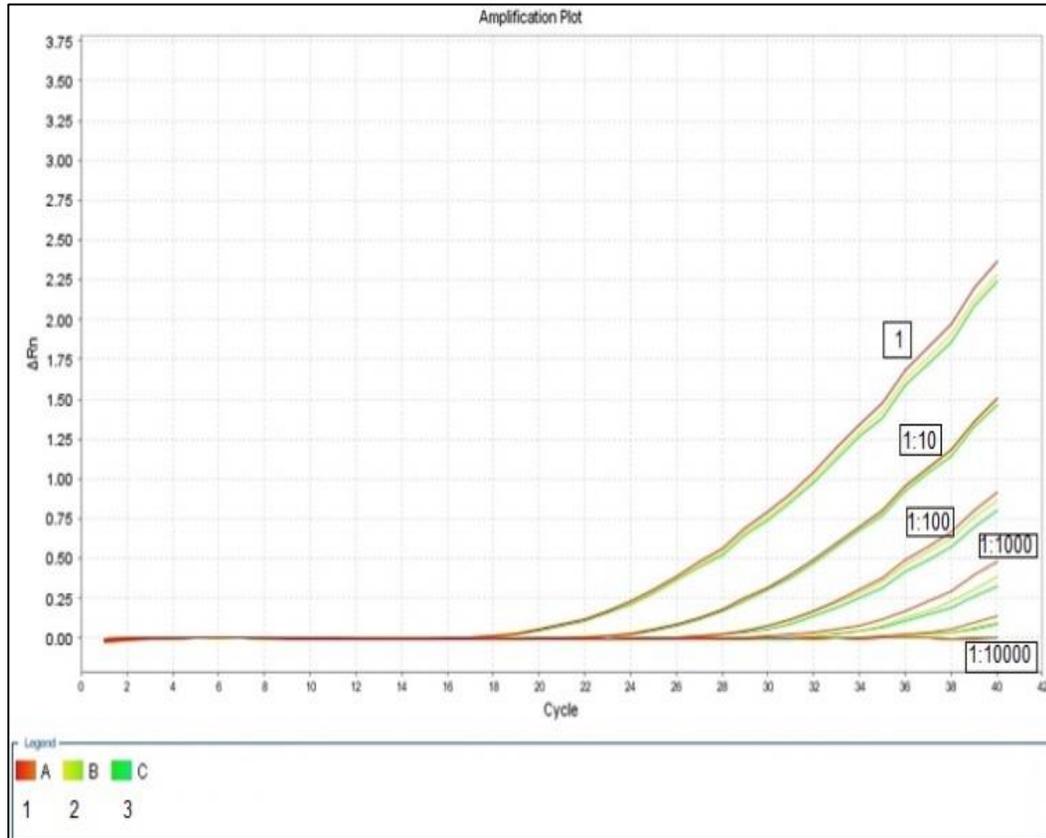


Figura 13. Curva de temperaturas de los primers de PbMSI-1 por PCR tiempo real. En el eje "Y" se muestra la cantidad de fluorescencia emitida con el incremento de cDNA y en el eje "X" la temperatura.

a)



b)

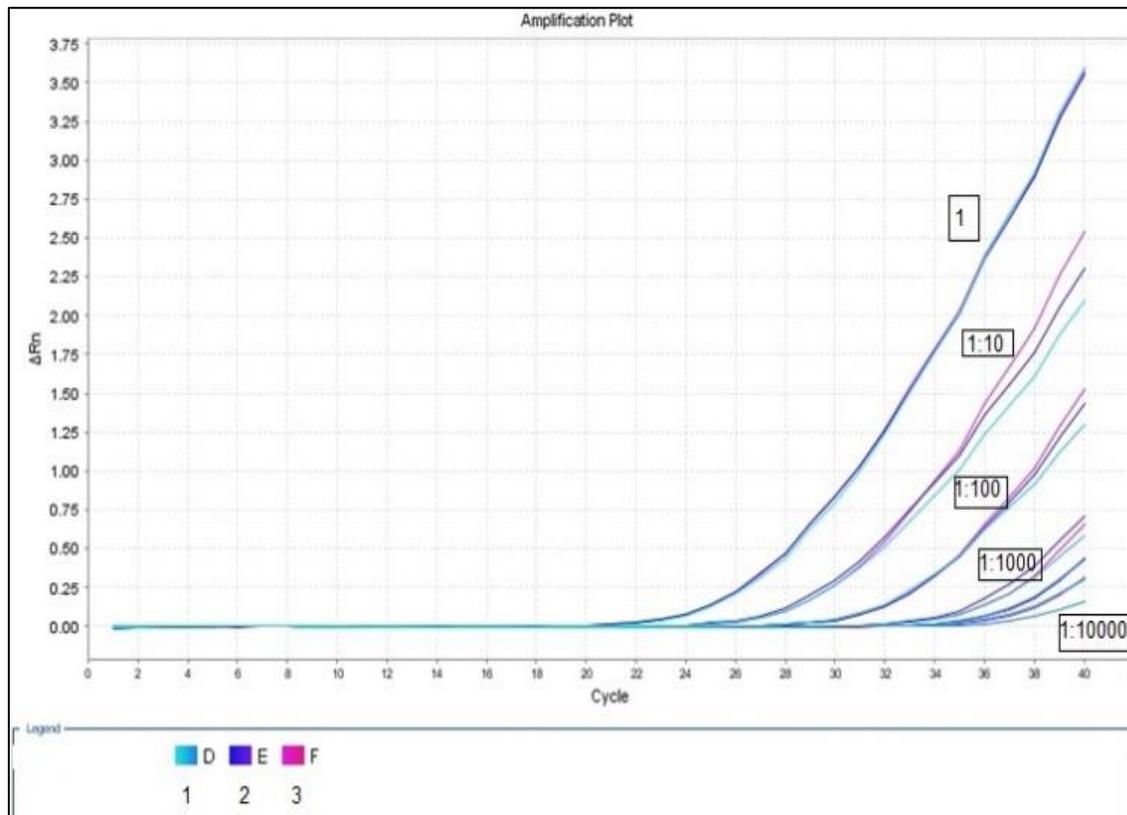


Figura 14. Curva de amplificación de PCR tiempo real de a) MSI-1 y b) 18S. Se indican las diluciones de muestras de cDNA molde de *P. berghei*: 1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia, que es proporcional al aumento de cDNA.

7.4.2.2 Expresión génica de PbMSI-1 en fases asexuales.

La expresión de MSI-1 no presentó diferencia significativa entre las fases asexuales de *P. berghei* (anillos, trofozoítos y esquizontes). Los valores se normalizaron con respecto a la expresión del gen 18S y la significancia de las diferencias en las réplicas experimentales se analizaron con la Prueba de Tukey (Figura 15).

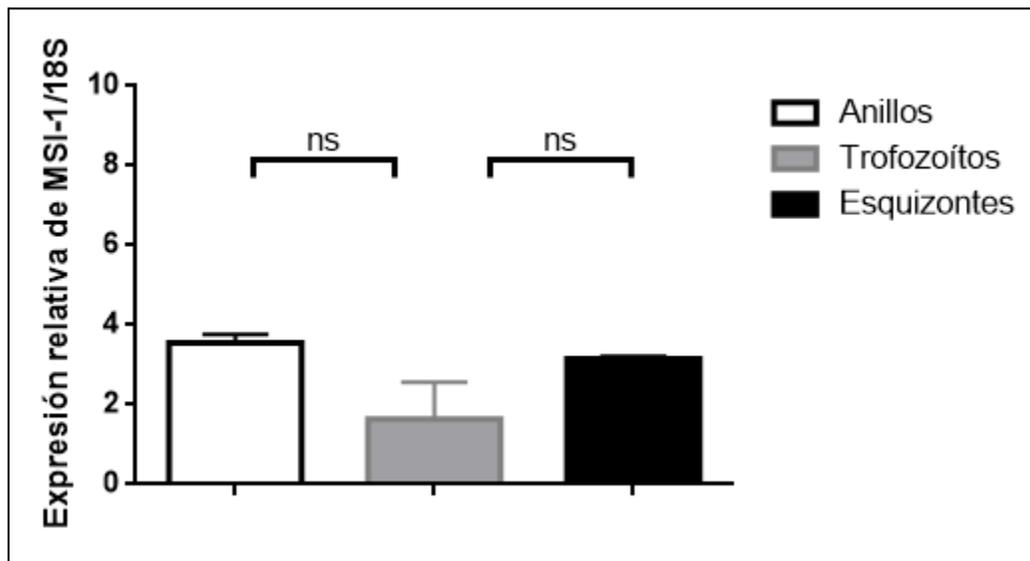


Figura 15. Expresión normalizada del gen MSI-1/18S en fases asexuales (Anillos, Trofozoítos y esquizontes) de *P. berghei*. No se observa diferencia estadísticamente significativa entre las tres fases.

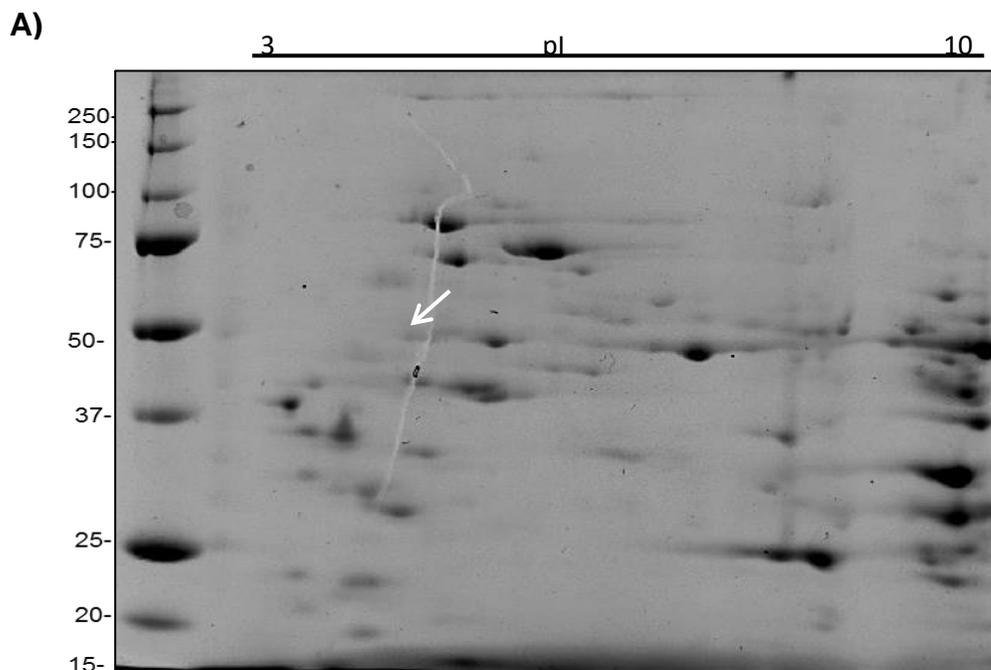
7.5 Análisis de la fosforilación de PbMSI-1 en fases asexuales (Trofozoítos, esquizontes).

Dado que se encontró que PbMSI-1 presenta cambios en la fosforilación en las fases sexuales, y dada la importancia de estas modificaciones postraduccionales en la regulación de las proteínas, en este trabajo se hizo un análisis preliminar de la fosforilación de PbMSI-1 en las fases asexuales. Dada la falta de un anticuerpo específico contra la MSI-1 de *P. berghei*, se procedió a ubicar la proteína de acuerdo a su tamaño (48 kDa) y punto Isoeléctrico (4.9) según lo observado en el

trabajo previo (Alonso-Morales, 2015) en geles en 2-D con los extractos proteicos totales de las fases asexuales de Trofozoítos y Esquizontes (Figuras 15 y 16). En ellos se observó una proteína que coincide en tamaño y pl con la proteína identificada como MSI-1 en fases sexuales de *P. berghei* (Alonso-Morales, 2015).

7.5.1 Posible fosforilación de MSI-1 en Trofozoítos de *P. berghei*.

Para analizar la fosforilación de proteínas en los trofozoítos de *P. berghei* se hizo el inmunoblot 2-D, con anticuerpos que reconocen a P-treonina, P-Serina y P-Tirosina y se observó una proteína en el tamaño y punto isoeléctrico esperado para MSI-1 (Figura 16). La fosforilación se encontró en los residuos de treonina y, de forma muy marcada, en tirosina; no así en el residuo de serina. Esto se verá confirmado con los análisis por espectrometría de masas para saber si se trata efectivamente de MSI-1 y si hay ausencia de fosforilación en serina.



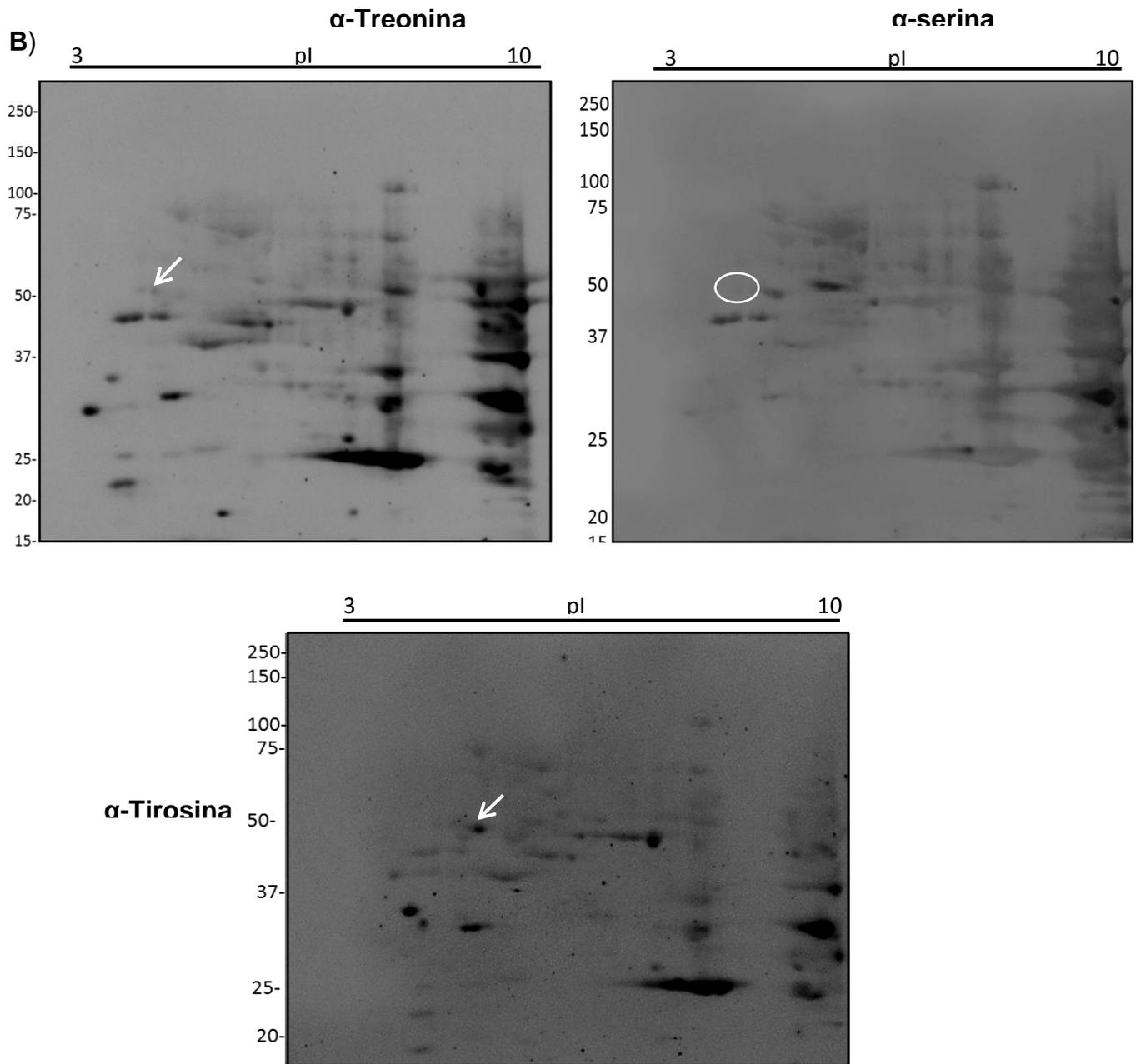


Figura 16. Análisis de fosforilación de PbMSI-1 en trofozoitos de *P. berghei*.

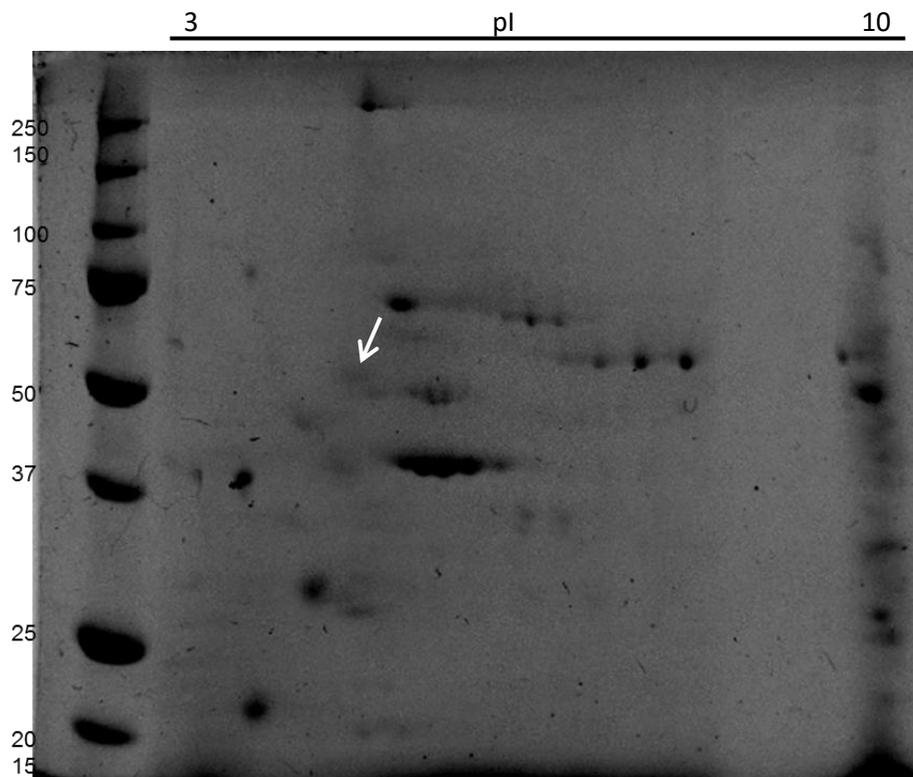
A) Electroforesis en gel 2-D de proteínas de trofozoitos de *P. berghei*. Las proteínas se resolvieron utilizando DryStrips Inmovilizadas (pH 3-10 NL, 7 cm) y la segunda dimensión se llevó a cabo por SDS-PAGE al 10%. Geles teñidos con azul de Coomasie. Los marcadores de peso molecular (kDa) se indican con los números a la izquierda de los geles. El punto isoeléctrico se indica en la parte superior. Las flechas blancas indica la probable proteína MSI-1 de acuerdo a su peso (48 kDa) y pI (4.9) esperados.

B) Fosforilación de la probable proteína MSI-1 en Trofozoitos de *P. berghei*. Las proteínas resueltas por 2-D fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos que reconocen residuos de treonina, serina y tirosina fosforilada. Las flechas blancas indican lo que probablemente sea la proteína MSI-1 fosforilada. El círculo blanco indica la ausencia de fosforilación.

7.5.2 Análisis de fosforilación de MSI-1 en Esquizontes de *P. berghei*.

Los resultados observados por los análisis de inmunoblot 2-D en esquizontes muestran la probable PbMSI-1 fosforilada en residuos de treonina; sin embargo no se detectan proteínas fosforiladas en serina y tirosina a la altura del peso esperado para PbMSI-1. Aún así, faltará hacer más repeticiones para corroborar el experimento.

A)



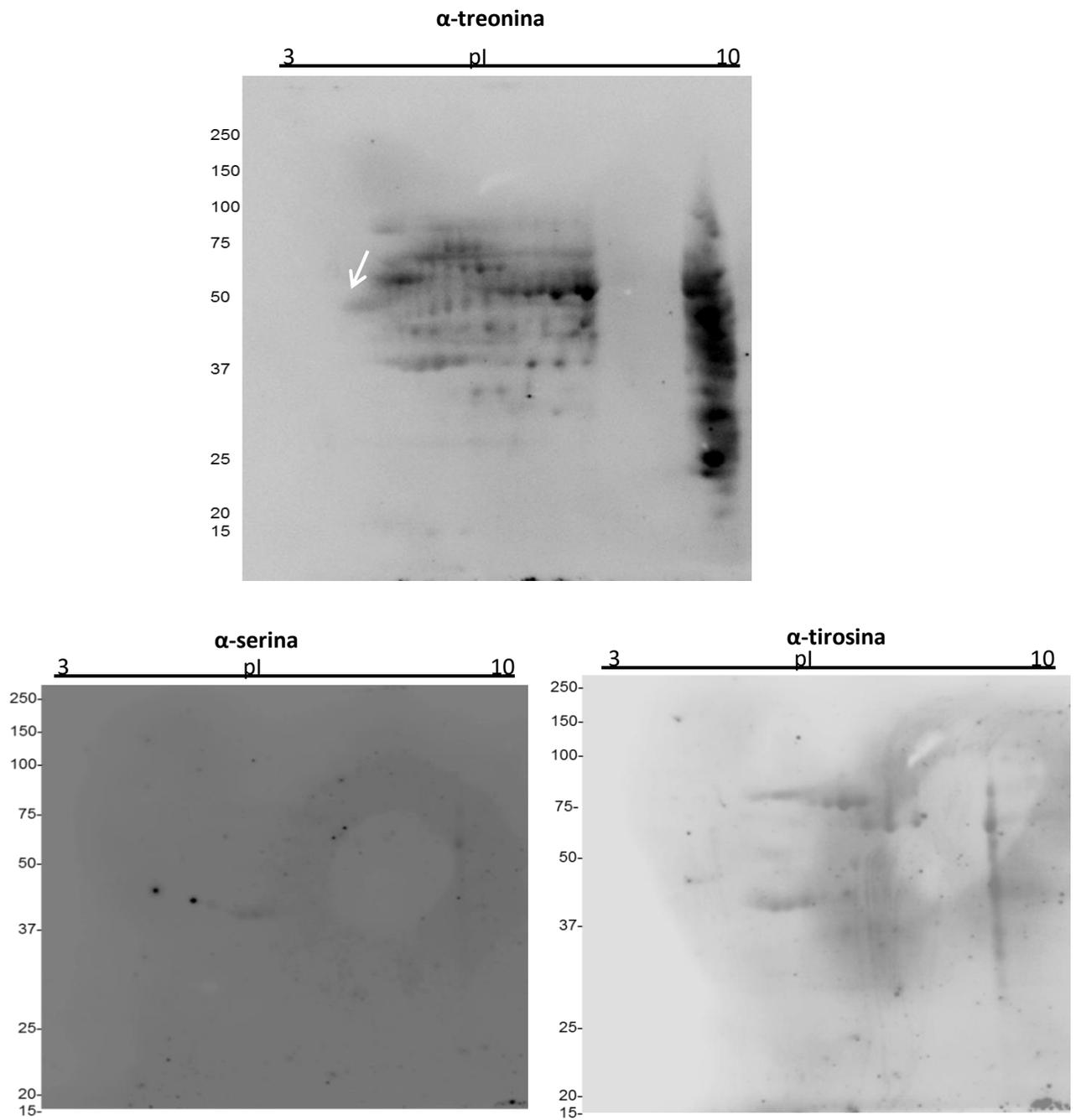


Figura 17. Análisis de fosforilación de PbMSI-1 en esquizotes de *P. berghei*. A) Electroforesis en gel 2-D de proteínas de esquizotes de *P. berghei*. B) Posible fosforilación de PbMSI-1 en treonina; con los anticuerpos α -serina y α -tirosina no se identifica PbMSI-1 fosforilada. Las flechas blancas indican la probable presencia de PbMSI-1.

VIII. DISCUSIÓN

La proteína tipo MSI-1 de *P. berghei* es codificada por el gen PBANKA_020300 y sus características moleculares y función no son conocidas en este parásito. Este trabajo se enfocó a la caracterización de la proteína, lo cual se inició con el análisis *in silico* de la secuencia de la proteína. PbMSI-1 está altamente conservada entre las especies de *Plasmodium* incluyendo *P. falciparum* y *P. vivax*, y diverge de la MSI-1 de otros organismos incluyendo humanos y plantas. El carácter conservado de la proteína en las especies de *Plasmodium* se explica por el origen monofilético de las especies de *Plasmodium* (Qari, 1996; Martinsen, 2008). Previamente se señaló que la proteína MSI-1 a pesar de encontrarse altamente conservada en eucariontes, diverge varias veces durante el curso de la evolución, mantiene su conservación entre organismos relacionados como los vertebrados y las plantas, pero estos grupos difieren entre si y en los organismos inferiores es aún más diverso (Hennig, 2005).

Expresión génica de MSI-1. El análisis de la expresión del mensajero de MSI-1 mostró una expresión constante durante las fases asexuales del ciclo intra-eritrocítico, lo cual podría ser no esperado debido a que los estadios de anillo, trofozoíto y esquizonte varían ampliamente en morfología, propiedades bioquímicas y actividad transcripcional (Anderson D, 2015; Adjalley S, 2015); sin embargo, coincide con datos recientemente reportados, donde se estudió la expresión de una gran cantidad de genes por medio de secuenciación masiva del RNA de diferentes fases del ciclo de vida de los parásitos de la malaria murina, y aquí se observó la expresión constante del mensajero de MSI-1 (PBANKA_020300) a lo largo del ciclo de vida de *P. berghei* (Plasmodb.org [Revisado: Septiembre, 2014]; Otto, T, 2014). Esta expresión similar de MSI-1 en el caso de las fases asexuales sanguíneas, se podría explicar por las características propias de la proteína MSI-1, ya que es una proteína compartida por varias maquinarias proteicas distintas, entre las que se incluyen el complejo PRC2, el complejo remodelador de cromatina NURF y el complejo de ensamble de cromatina CAF-1 (Shaver, 2010) los cuales participan en la organización de la

cromatina, la cual es necesaria para la expresión génica coordinada, estabilidad del genoma y herencia de información epigenética (Duc, 2015). Así, esta expresión constante y similar podría deberse a que la proteína está en recambio entre diversos complejos asociados a la regulación de la cromatina, ya que se sabe que durante la fase de Trofozoíto el núcleo se encuentra transcripcionalmente activo con gran cantidad de eucromatina, proceso que en otros organismos como los mamíferos involucra complejos como el NURF (Witowski, 2015). Por otro lado, la fase de esquizontes se caracteriza por una replicación del DNA y una compactación del núcleo recién formado, en donde complejos como el CAF-1, que participa en el ensamble de cromatina, se podrían ver involucrados (Doyen, 2013). Así, la maquinaria de transcripción y traducción de *Plasmodium* se encuentra activa desde la fase de anillo tardío, pasando por trofozoíto temprano antes de decaer durante el estadio de Esquizonte temprano (Bozdech, 2003).

Dado que no se han descrito con exactitud los mecanismos de la regulación génica en *Plasmodium*, sólo se puede hipotetizar de la co-existencia de varios mecanismos moleculares para esta regulación (Volz, 2010), ya que no existe información de la presencia y función de varios de los complejos regulatorios conocidos en otros tipos celulares.

Predicción de interacciones de MSI-1. Al predecir las posibles interacciones de PbMSI-1 por medio del programa STRING, se encontró que varias de las proteínas posiblemente asociadas corresponden a moléculas que participan en la regulación de la cromatina en otros organismos; y estas proteínas serían las que se esperaría obtener en un ensayo de inmunoprecipitación de PbMSI-1. Es el caso de las proteínas tipo ISWI/SNF, las cuales forman parte de complejos remodeladores dependientes de ATP, como sería el caso del complejo NURD; este tipo de complejos son importantes en los organismos eucariontes, ya que todos los eucariontes parecen tener diversas formas de remodelación de cromatina dependiente de ATP y conservan en común una subunidad ATPasa con una región homóloga a varias proteínas de diferentes organismos (Flaus, 2001).

Un gen que codifica para una ATPasa tipo ISWI fue caracterizado en *P. falciparum* encontrándose que es homóloga a ISWI/SNF2 de levaduras y similar a ISWI de *Drosophila*, mostrando una expresión génica baja pero uniforme durante el ciclo de vida asexual del parásito (Ji, 1997). Además de ésta, se han encontrado otras diez proteínas de tipo ISWI/SNF2 en *P. falciparum* a partir del análisis de secuencias en el genoma del parásito (Horrocks *et. al.*, 2009), como ejemplo la proteína PFF1185w de *P. falciparum*, una proteína SNF2 putativa potencialmente involucrada en la fisiología de la cromatina (Cui *et. al.*, 2010) y cuya homóloga en *P. berghei* sería la proteína PBANKA_1123500. La función de estas proteínas en parásitos protozoarios es poco conocida, aunque en *T. cruzi* se encontró que proteínas de tipo ISWI/SNF2 están involucradas en el silenciamiento epigenético de la expresión de glicoproteínas de superficie (DiPaolo, 2005).

Se predice la interacción de MSI-1 con otra proteína parte del complejo CAF-1 (Factor de ensamble de cromatina), una proteína homóloga a la subunidad p60 (CAC2 en levaduras) del complejo CAF-1. Esto coincide con análisis bioinformáticos previos en los cuales se detectan dos genes (PFA0520c, PFD0455w) que codifican para factores de ensamble de cromatina putativos en *P. falciparum* (Cui, 2010), cuyos homólogos en *P. berghei* serían la PbMSI-1 (PBANKA_020300) y la proteína PBANKA_1006800; esto resalta la posibilidad de que el complejo CAF-1 exista en *Plasmodium*; pudiendo llevar a cabo funciones muy parecidas a las que se dan en otros organismos, como la compactación adecuada de la heterocromatina, esencial para la proliferación celular en *Arabidopsis* (Schönrock, 2006).

La presencia del complejo CAF-1 en *P. berghei* explicaría la presencia en el interactoma de la proteína asf1 (factor anti silenciamiento 1) puesto que, aunque no hay reportes de una interacción directa de MSI-1 (subunidad menor de CAF-1) y asf1, se ha reportado que la subunidad mayor de CAF-1 (p105) es capaz de interactuar con la proteína asf1, y que, además, ambas co-localizan con los cromosomas sinténicos de *Drosophila* cuando hay replicación (Tyler, 2001). Aunado a ello, el factor de ensamble de cromatina y asf1 cooperan en el ensamble

de nucleosomas durante la replicación, ya que ambas interactúan con las histonas H3/H4; además, CAF-1 y Asf1 poseen roles redundantes pues ambas regulan la actividad durante la reparación del daño al DNA (Kim, 2009), pudiendo ser roles que ocurran en esquizontes de *P. berghei* fase en la cual se lleva a cabo la replicación.

Otra asociación predicha para PbMSI-1 es con una histona desacetilasa, lo cual es relevante ya que la acetilación se considera una de las más importantes modificaciones que influyen en la expresión génica. En el parásito apicomplexa *T. gondii* la HDAC3 y la proteína CGN5a son capaces de regular la expresión génica estadio-específica (Saksouk, 2005). En *P. falciparum* se han encontrado tres clases de histonas desacetilasas, las tipo I, II y III y se sabe que el silenciamiento del gen PfSIR2 (codifica para Desacetilasa de histonas tipo III dependiente de NAD+) lleva a una pérdida parcial de la expresión de los genes *var* (Hakimi, 2007). Así, la presencia de MSI-1 en diversos complejos que incluyen Histonas desacetilasas, podría involucrarla en procesos como diferenciación y proliferación en *P. berghei*.

También se predice que MSI-1 de *P. berghei* podría interactuar con proteínas de tipo actina y con una pirofosfatasa inorgánica; se sabe que la PPI y la actina interactúan con complejos reguladores de la cromatina como el complejo NURF ó SWI/SNF de *Drosophila*, aunque no se ha encontrado experimentalmente una interacción directa con MSI-1 (Gdula, 1998; Shen, 2000).

Fosforilación de MSI-1 en fases asexuales. La fosforilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes y que puede modular las interacciones de las proteínas con el DNA y afectar estructuras de la cromatina o servir como marca epigenética para reclutar proteínas efectoras especializadas (Cui, 2010); sin embargo hay escasos reportes de la fosforilación de MSI-1, aunque en un trabajo previo del laboratorio se encontró que PbMSI-1 se fosforila en los residuos de serina y treonina durante las fases sexuales (gametocitos y gametos) (Alonso-Morales et al 2015).

Nuestros resultados mediante WB 2D indicaron que PbMSI-1 se encuentra fosforilada en los residuos de treonina y tirosina en las fases asexuales del ciclo intra-eritrocítico, en trofozoítos en residuos de treonina y tirosina, mientras que en esquizontes en treonina. Estos datos contrastan con lo reportado en un análisis previo a gran escala de proteínas fosforiladas de *P. falciparum* por medio de espectrometría de masas con fragmentación inducida por colisión (CID), en donde MSI-1 apareció fosforilada en los esquizontes (Collins, 2015).

Hay diversos estudios que asocian la fosforilación con la regulación de diversos complejos en los cuales participa MSI-1. Como ejemplos, el complejo CAF-1 se ha encontrado hiperfosforilado durante la mitosis de células HeLa, específicamente su subunidad p60 y éste CAF-1 modificado se separa de la cromatina condensada, por lo que se cree que esta modificación al complejo, específica durante la mitosis, podría regular negativamente CAF-1 (Marheineke, 1998). Se ha propuesto también que los genes que codifican para proteínas del complejo Polycomb, otro de los complejos donde participa MSI-1, se activan por medio de la fosforilación H3K27me3S28 mediada por la vía de las proteína cinasas MSK (Gehani, 2010). Otro estudio señala que la asociación de RbAp48 humana (MSI-1 humana) con la proteína co-activadora CBP (CREB binding protein), es estimulada por CREB (Elemento de unión en respuesta a AMPc) fosforilado, siendo la unión entre estas tres proteínas lo que permite al complejo interactuar posteriormente con las histonas (Zhang, 2000). También se podría señalar el papel que juega la fosforilación en promover la formación de complejos histonas desacetilasas o la fosforilación de éstos complejos por proteínas cinasas CK-2 (Cinasa caseína 2) (Pflum, 2001; Adenuga, 2010). Así, la presencia de residuos fosforilados en PbMSI-1 podría estar modulando la asociación de esta proteína con diversos complejos que involucren la modificación de la cromatina.

Otro aspecto importante a resaltar, es la fosforilación de MSI-1 encontrada en residuos de treonina en los trofozoítos; la fosforilación en residuos treonina fue reportada para PbMSI-1 de las fases sexuales; no ocurre lo mismo con la fosforilación en tirosina, que no fue detectada en fases sexuales (Alonso-Morales,

2015), pero en este caso la encontramos en las asexuales. En otros reportes se han encontrado también diferencias entre los residuos fosforilados en otras proteínas en las diferentes fases, como entre merozoítos y esquizontes, y es probable que las diferencias en la fosforilación se traduzcan en diferencias funcionales en la biología del parásito, pues se sabe que las cinasas regulan procesos como la motilidad o invasión (Lasonder, 2015).

Así, tanto la presencia de fosforilación en MSI-1 de *P. berghei* en fases asexuales como en las fases sexuales, aunado a los resultados de los análisis de expresión génica, en donde se encontró una expresión del mensajero uniforme a lo largo del ciclo intraeritrocítico, además de encontrarse la presencia de la proteína en por los menos dos de las fases asexuales, sugieren que PbMSI-1 puede ser funcional en las fases asexuales y quizá estar participando de forma constante en diversos procesos; además que si se encontrara asociada a diversos complejos en el parásito, podría estar siendo regulada debido a cambios a nivel post-traduccionales en esta proteína, como lo es la fosforilación.

IX. CONCLUSIONES

El gen PBANKA_020300 codifica para una proteína MSI-1 cuya secuencia consta de siete repetidos WD40 y es probable que posea una estructura similar a la proteína MSI-1 humana.

La proteína MSI-1 se encuentra conservada entre las especies del género *Plasmodium* formando un sólo nodo en la filogenia y difiere de las proteínas MSI-1 de eucariontes superiores.

Las interacciones predichas para PbMSI-1 incluyen su asociación formando complejos reguladoras de la expresión génica y que incluyen las proteínas ISWI/SNF, CAF-1, histonas desacetilasas, actina y pirofosfatasa inorgánica; estas interacciones serían interesantes de evaluar en estudios posteriores por medio de análisis de inmunoprecipitación.

El mensajero de MSI-1 se expresa de manera constante y sin diferencias significativas entre las fases del parásito en el ciclo intra-eritrocítico de *P. berghei*.

El análisis de fosforilación revela que es probable que MSI-1 esté fosforilada en residuos de Treonina y Tirosina en los trofozoítos.

La presencia de fosforilación de PbMS-1 en treonina y tirosina podría estar regulando la participación de esta proteína en diversos complejos y no así los cambios en su expresión génica en las fases asexuales.

X. PERSPECTIVAS

- Confirmar la presencia de MSI-1 fosforilada en los trofozoítos y esquizontes por medio de análisis espectrometría de masas a partir de la proteína encontrada en los geles 2-D.
- Completar los análisis de fosforilación en la fase de anillos.
- Posteriores análisis para evaluar la función de esta proteína deberán incluir la opción de generar una proteína recombinante para producir anticuerpos y así poder inmunoprecipitar proteínas que se asocien a PbMSI-1.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ai, X; Parthun, M. 2004. The Nuclear Hat1p/Hat2p Complex: A Molecular Link between Type B Histone Acetyltransferases and Chromatin Assembly. *Molecular Cell*. 14: 195–205.
- Adenuga, D; Rahman, I. 2010. Protein kinase CK2-mediated phosphorylation of HDAC2 regulates co-repressor formation, deacetylase activity and acetylation of HDAC2 by cigarette smoke and aldehydes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 498(1), 62-73.
- Adjalley, S; Chabbert, C; Klaus, B; Pelechano, V; Steinmetz, L. 2015. Landscape and dynamics of transcription initiation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *bioRxiv*, 024356.
- Adkins, M; Howar, S; Tyler, J. 2004. Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Molecular cell*, 14(5), 657-666.
- Alano, P. 2014. The sound of sexual commitment breaks the silencing of malaria parasites. *Trends in parasitology*, 30(11), 509-510.
- Anamika, N; Krupa, A. 2005. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins Struct. Funct. Genet* 58, 180–189.
- Anderson, A; Karandikar, U; Pepple, K; Chen, Z; Bergmann, A; Mardon, G. 2011. The enhancer of trithorax and polycomb gene *Caf1/p55* is essential for cell survival and patterning in *Drosophila* development. *Development*. 138: 1957–1966.
- Ankarklev, J; Brancucci, N; Goldowitz, I; Mantel, P; Marti, M. 2014. Sex: How Malaria Parasites Get Turned On. *Current Biology*. 24: 368-370.
- Alonso-Morales, A; González-López, L; Cázares-Raga, F; Cortés-Martínez, L; Torres-Monzón, J; Gallegos-Pérez, J; de la Cruz Hernández-Hernández, F. 2015. Protein phosphorylation during *plasmodium berghei* gametogenesis. *Experimental parasitology*. 156: 49–60.
- Anderson, A; Karandikar, U; Pepple, K; Chen, Z; Bergmann, A; Mardon, G. 2011. The enhancer of trithorax and polycomb gene *Caf1/p55* is essential for cell survival and patterning in *Drosophila* development. *Development* 138: 1957-1966.
- Anderson, D; Lapp, S; Akinyi, S; Meyer, E; Barnwell, J; Korir-Morrison, C; Galinski, M. 2015. *Plasmodium vivax* trophozoite-stage proteomes. *Journal of proteomics*. 115: 157-176.

- Ausubel, F; Brent, R; Kingston, R; Moore, D; Seidman, J; Smith, J; Struhl, K. 2003. Current Protocols in Molecular Biology.
- Ay, F; Bunnik, E; Varoquax, N; Vert, J; Stafford, W; Le Roch, K. 2015. Multiple dimensions of epigenetic gene regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Bioessays*. 37: 182-194.
- Bannister, L; Sherman, I. 2009. *Plasmodium*. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. pp. 1-12.
- Baker DA. 2010. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 172: 57–65.
- Benson, L; Gu, Y; Yakovleva, T; Tong, K; Barrows, C; Strack, C; Cook, R; Mizzen, C; Annunziato, A. 2006. Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J. Biol. Chem*. 281: 9287–9296.
- Bowen, N; Fujita, N; Kajita, M; Wade, P. 2004. Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1677: 52-57.
- Bozdech, Z; Zhu, J; Joachimiak, M; Cohen, F; Pulliam, B; DeRisi, J. 2003. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol*.4(2), R9.
- Cairns, B; Erdjument-Bromage, H; Tempst, P; Winston, F; Kornberg, R. 1998. Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodelling complexes RSC and SWI/ SNF. *Mol. Cell* 2, 639:651.
- CDC. 2015. <http://www.cdc.gov/malaria/about/facts.html>. [Revisado 19/04/2015].
- Chen, Z; Han, M. 2001. *C. elegans* Rb, NuRD, and Ras regulate lin-39-mediated cell fusion during vulval fate specification. *Current biology*, 11(23), 1874-1879.
- Collins, M; Wright, J; Jones, M; Rayner, J; Choudhary, J. 2014. Confident and sensitive phosphoproteomics using combinations of collision induced dissociation and electron transfer dissociation. *Journal of proteomics*, 103, 1-14.
- Coppi, A. et. al. 2007. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe*. 2 (5): 316-327.
- Coulson RM, Hall N, Ouzounis CA, 2004. Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Res* 14: 1548–1554.

- Cui, L; Miao, J. 2010. Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell*, 9(8), 1138-1149.
- Chaal, B; Gupta, A; Wastuwidyaningtyas B; Luah, Y, et. al. 2010 Histone deacetylases play a major role in the transcriptional regulation of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *PLoS Pathog.* 6:e10000737.
- da Silva Freitas, E; de Noronha, S; Ritto, M; Baptista, C; da Silva, I; Correa-Noronha, S; da Silva, I. 2014. Leptin Signaling Modulates Expression of Polycomb and Trithorax Complexes in the Brain of Fat Tissue Implanted Polycystic Ovarian Syndrome Mice. *American Journal of Molecular Biology*, 4(04), 177.
- DiPaolo, C; Kieft, R; Cross, M; Sabatini, R. 2005. Regulation of trypanosome DNA glycosylation by a SWI2/SNF2-like protein. *Molecular cell*,17(3), 441-451
- Denslow, S. A., & Wade, P. A. 2007. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*, 26(37), 5433-5438.
- Deitsch, K; Duraisingh, M; Dzikowski, R; Gunasekera, A; Khan, S; Le Roch, K; Llinás, M; Mair, G; McGovern, V; Roos, D; Shock, J; Sims, J; Wiegand, R; Winzeler, E. 2007. Mechanisms of Gene Regulation in *Plasmodium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 201–208.
- Doyen, C; Moshkin, Y; Chalkley, G; Bezstarosti, K; Demmers, J; Rathke, C; Verrijzer, C. 2013. Subunits of the histone chaperone CAF1 also mediate assembly of protamine-based chromatin. *Cell reports*, 4(1), 59-65.
- Dumbliauskas, E; Lechner, E; Jaciubek, M; Berr, A; Pazhouhandeh, M; Alioua, M; Cognat, V; Brukhin, V; Koncz, C; Ueli Grossniklaus, U; Molinier, J; Genschik, P. 2011. The Arabidopsis CUL4–DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *The EMBO Journal*. 30: 731–743.
- Duc, C; Benoit, M; Le Goff, S; Simon, L; Poulet, A; Cotterell, S; Probst, A. 2015. The histone chaperone complex HIR maintains nucleosome occupancy and counterbalances impaired histone deposition in CAF-1 complex mutants. *The Plant Journal*. 81(5), 707-722.
- Dvorin, J; Martyn, D; Patel, S; Grimley, J; Collins, C; Hopp, C; Duraisingh, M. 2010. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*. 328(5980), 910-912.
- Egan, T. 2008. Haemozoin formation. *Molecular and biochemical parasitology*. 157.2: 127-136.

- Eichten, S; Schmitz, R; Springer, N. 2014. Epigenetics: beyond chromatin modifications and complex genetic regulation. *Plant physiology*. 165: 933-947.
- Feachem, R; Phillips, A; Hwang, J; Cotter, C; Wielgosz, B; Greenwood, B; Snow, R. 2010. Shrinking the malaria map: progress and prospects. *The Lancet*, 376(9752), 1566-1578.
- Flaus, A; Owen-Hughes, T. 2001. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Current opinion in genetics & development*, 11(2), 148-154.
- Furuyama, T; Dalal, Y; Henikoff, S. 2006. Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 6172–6177.
- Gardner, M. *et al.* 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419: 498–511.
- Gaillard P; Martini E; Kaufman, P; Stillman, B; Moustacchi, E; Almouzni, G. 1996. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* 86, 887–896.
- Gdula, D; Sandaltzopoulos, R; Tsukiyama, T; Ossipow, V; Wu, C. 1998. Inorganic pyrophosphatase is a component of the *Drosophila* nucleosome remodeling factor complex. *Genes & development*, 12(20), 3206-3216.
- Gehani, S; Agrawal-Singh, S; Dietrich, N; Christophersen, N; Helin, K; Hansen, K. 2010. Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Molecular cell*, 39(6), 886-900.
- Gerald, N; Mahajan, B; Kumar, S. 2011. Mitosis in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *EUKARYOTIC CELL*. 10: 474–482.
- Gething, P; Patil, A; Smith, D; Guerra, C; Elyazar, I; Johnston, G; Hay, S. 2011. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J*, 10 (378), 1475-2875.
- Green, J; Rees-Channer, R; Howell, S; Martin, S; Knuepfer, E; Taylor, H; Holder, A. 2008. The motor complex of *Plasmodium falciparum* phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30980-30989.
- Goldberg, D. 2005. Hemoglobin degradation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 295:275-91.

- Gupta, A; Chin, W; Zhu, L; Mok, S; Luah, Y; Lim, E; Bozdech, Z. 2013. Dynamic Epigenetic Regulation of Gene Expression during the Life Cycle of Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 9(2): e1003170.
- haldane.bu.edu/projects/wdrepeat/ [Consultado: Abril de 2015].
- Haldar, K; Mohandas, N. 2007. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current opinion in hematology.* 14.3: 203-209.
- Hakimi, M; Deitsch, K. 2007. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Current opinion in microbiology,* 10(4), 357-362.
- Hayashi, T; Fujita, Y; Iwasaki, O; Adachi, Y; Takahashi, K; Yanagida, M. 2004. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* 118:715–729.
- Hennig, L.; Taranto, P.; Walser, M.; Schonrock, N.; Grissem, W. 2003. *Arabidopsis* MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development.* 130. 2555:2565.
- Hennig, L; Bouveret, R; Grissem, W. 2005. MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends In Cell Biology.* 15: 295-302.
- Hermanson, O; Glass, C; Rosenfeld, M. 2002. Nuclearreceptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 55–60.
- Hsieh, T. *et al.* 2003. From flour to flower: how polycomb group proteins influence multiple aspects of plant development. *Trends Plant Sci.* 8: 439–445.
- Horrocks, P; Wong, E; Russell, K; Emes, R. 2009. Control of gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 164: 9–25.
- Jebiwott, S. *et. al.* 2013. *Plasmodium berghei* calcium dependent protein kinase I is not required for host cell invasion. *Plos One.* 8 (11): e79171.
- Ji, D; Arnot, D. 1997. A *Plasmodium falciparum* homologue of the ATPase subunit of a multi-protein complex involved in chromatin remodelling for transcription. *Molecular and biochemical parasitology,* 88(1), 151-162.
- Kafsack, B; Rovira-Graells, N; Clark, T; Bancells, C; Crowley, V; Campino, S; Williams, A; Drought, L; Kwiatkowski, D; Baker, D. 2014. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature.* 507, 248–252.

- Kamakaka, R. T., Bulger, M., Kaufman, P. D., Stillman, B., & Kadonaga, J. T. (1996). Postreplicative chromatin assembly by *Drosophila* and human chromatin assembly factor 1. *Molecular and cellular biology*, 16(3), 810-817.
- Kraatz, H; Martic, S. 2015. Kinomics: Approaches and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1a edición. pp. 115-136.
- Kim, J; Haber, J. 2009. Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1151-1156.
- Kong, L; Yu, X; Bai, X; Zhang, W; Zhang, Y; Zhao, W; Jia, J; Tang, W; Zhou, Y; Liu, C. 2007. RbAp48 is a critical mediator controlling the transforming activity of human papillomavirus type 16 in cervical cancer. *J. Biol. Chem.* 282: 26381–6391.
- Latreille, D; Bluy, L; Benkirane, M; Kiernan, R. 2014. Identification of histone 3 variant 2 interacting factors. *Nucleic acids research*. 42: 3542-3550.
- Lasonder, E; Ishihama, Y; Andersen, J; Vermunt, A; Pain, A; Sauerwein, R; Mann, M. 2002. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, 419(6906), 537-542.
- Livak, K.; Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lochhead, P. 2009. Protein kinase activation loop autophosphorylation in cis: overcoming a Catch-22 situation. *Sci. Signal* 2, pe4.
- Mann, M., & Jensen, O. N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21(3), 255-261.
- Manning, G. *et. al.* 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 1912: 1934.
- Marheineke, K; Krude, T. 1998. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 15279-15286.
- Martinsen, E.; Perkins, S; Schall, J. 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47(1), 261-273.
- Mack, M. 2015. Investigation into the Specification of NURF Recruitment to the Genome. Virginia Commonwealth University.

- Margueron, R; Reinberg, D. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), 343-349.
- Meijsing, S; Ehrenhofer-Murray, A. 2001. The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 15(23), 3169-3182.
- Mozgová, I; Fajkus, J. 2010. Dysfunction of Chromatin Assembly Factor 1 Induces Shortening of Telomeres and Loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 22: 2768–2780.
- Murzina, N; Pei, X; Zhang, W; Sparkes, M; Vicente-García, J; Pratap, J; McLaughlin, S; Ben-Shahar, T; Verreault, A; Luisi, B; Laue, E. 2008. Structural Basis for the Recognition of Histone H4 by the Histone-Chaperone RbAp46. *Structure*. 16: 1077–1085.
- Neer, E; Schmidt, C; Nambudripad, R; Smith, T. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 371: 297-300.
- Nowak, A; Alfieri, C; Stirnimann, C; Rybin, V; Baudin, F; Ly-Hartig, N; Linder, D; Müller, C. 2011. Chromatin-modifying Complex Component Nurf55/p55 Associates with Histones H3 and H4 and Polycomb Repressive Complex 2 Subunit Su(z)12 through Partially Overlapping Binding Site. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286: 23388–23396.
- Olsen, B., Markwell, J. 2007. "Assays for the Determination of Protein Concentration". *Current Protocols in Protein Science*: 14–17.
- Otto, T; Wilinski, D; Assefa, S; Keane, T; Sarry, L; Böhme, U; Llinás, M. 2010. New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Molecular microbiology*. 76: 12-24.
- Otto, T; Böhme, U; Jackson, A; Hunt, M; Franke-Fayard, B; Hoeijmakers, W; Janse, C. 2014. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene-expression. *BMC biology*. 12(1), 86.
- Pacifico, F; Paolillo, M; Chiappetta, G; Crescenzi, E; Arena, S; Scaloni, A; Monaco, M; Vascotto, C; Tell, G; Formisano, S; Leonardi, A. 2007. RbAp48 is a target of nuclear factor-kB activity in thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 1458–1466.
- Parthun, M. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87, 85–94.
- Pfefferli, C; Müller, F; Jaźwińska, A; Wicky, C. 2014. Specific NuRD components are required for fin regeneration in zebrafish. *BMC Biology*. 12:30-34.

- Pflum, M; Tong, J; Lane, W; Schreiber, S. 2001. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47733-47741.
- Polo, S. 2015. Reshaping chromatin after DNA damage: the choreography of histone proteins. *Journal of molecular biology*. 427: 626-636.
- Qari, S.; Shi, Y.; Pieniazek, N.; Collins, W.; Lal, A. 1996. Phylogenetic Relationship among the Malaria Parasites Based on Small Subunit rRNA Gene Sequences: Monophyletic Nature of the Human Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum* 1. *Molecular phylogenetics and evolution*. 6(1), 157-165.
- Qian, Y; Lee, E. 1995. Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of RAS in yeast. *J. Biol. Chem.* 270: 25507–25513.
- Qiu, Zhijun, Carolyn Song, Navid Malakouti, Daniel Murray, Ayman Hariz, Mark Zimmerman, Derek Gyax, Aiman Alhazmi, and Joseph Landry. "Functional Interactions Between NURF and CTCF Regulate Gene Expression." *Molecular and Cellular Biology* 35.1 (2015): 224-37.
- Rangarajan, R. et. al. 2005. A mitogen activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep.* 6 (5): 464-469.
- Ray-Gallet, D; Woolfe, A; Vassias, I; Pellentz, C; Lacoste, N; Puri, A; Schultz, D; Pchelinstsev, N; Adams, P; Jansen, L; Almouzni, G. 2012. Dynamics of Histone H3 Deposition In Vivo Reveal a Nucleosome Gap-Filling Mechanism for H3.3 to Maintain Chromatin Integrity. *Molecular Cell*. 44: 928–941.
- Reyes, J; Hennif, L; Gruissem, W. 2002. Chromatin-Remodeling and Memory Factors. New Regulators of Plant Development. *Plant Physiology*. 130: 1090-1101.
- Rodríguez, M; Betanzos-Reyes, Á. 2011. Plan de mejoramiento del control de la malaria hacia su eliminación en Mesoamérica. *Salud Pública de México*, 53, s333-s348.
- Rodríguez, M; Margos, G; Compton, H; Ku, M; Lanz, H; Rodríguez, M; Sinden, R. 2002. *Plasmodium berghei*: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. *Experimental Parasitology*. 101: 73-76.
- Rout, S; Warhurst, D; Suar, M; Kanta, R. 2015. *In silico* comparative genomics analysis of *Plasmodium falciparum* for the identification of putative essential

- genes and therapeutic candidates. *Journal of Microbiological Methods*. 109: 1–8.
- Roguev, A; Schaft, D; Shevchenko, A; Pijnappel, W; Wilm, M; Aasland, R; Stewart, A. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *The EMBO journal*, 20(24), 7137-7148.
- Ruggieri, R; Tanaka, K; Nakafuku, M; Kaziro, Y; Toh, E; Matsumoto, K. 1989. MS11, a negative regulator of the RAS-CAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology*. 86: 8778-8782.
- Saksouk, N; Bhatti, M; Kieffer, S; Smith, A; Musset, K; Garin, J; Sullivan, W; Cesbron-Delauw, M; Hakimi, M. 2005. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol*. 25:10301-10314.
- Schönrock, N; Exner, V; Probst, A; Gruissem, W; Hennig, L. 2006. Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 281(14), 9560-9568.
- Schuetz, A; Allali-Hassani, A; Martin, F; Loppnau, P; Vedadi, M; Bochkarev, A; Plotnikov, A; Arrowsmith, C; Min, J. 2006. Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5. *EMBO J*. 25: 4245–4252.
- Shen, X; Mizuguchi, G; Hamiche, A; Wu, C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, 406 (6795), 541-544.
- Siau, A., Silvie, O., Franetich, J.F., Yalaoui, S., Marinach, C., Hannoun, L., *et al.* 2008. Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection. *PLoS Pathog*.
- Sicard, A. *et al.* 2011. Activation of PAK-MEK signaling pathway in malaria parasite infected erythrocytes. *Cell Microbiol*. 13 (6): 836-845.
- Siciliano, G; Alano, P. 2015. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology*. 6:391.
- Sinha, A., Hughes, K.R., Modrzynska, K.K., Otto, T.D., Pfander, C., Dickens, N.J., Religa, A.A., Bushell, E., Graham, A.L., Cameron, R., *et al.* (2014). A

- cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature* 507, 253–257.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M; Hay, S. 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*, 5(1), 69.
- Solari, F; Ahringer, J. 2000. NuRD-complex genes antagonize RAS-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 10: 223–226.
- Solyakov, L; Halbert, J; Alam, M; Semblat, J; Dorin-Semblat, D; Reininger, L; Doerig, C. 2011. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature communications*, 2, 565.
- Spiegelman, B; Heinrich, R. 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell.* 119: 157–167.
- Tagami, H; Ray-Gallet, D; Almouzni, G; Nakatani, Y. 2004. Histone H3. 1 and H3. 3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell.* 116: 51-61.
- Talman, A; Prieto, J; Marques, S; Ubaida-Mohien, C; Lawniczak, M; Wass, M; Xu, T; Frank, R; Ecker, A; Stanway, R; Krishna, S; Sternberg, M; Christophides, G; Graham, D; Dinglasan, R; Yates, J; Sinden, R. 2014. Proteomic analysis of the *Plasmodium* male gamete reveals the key role for glycolysis in flagellar motility. *Malaria Journal.* 13:315.
- Tarun, A; Peng, X; Dumpit, R; Ogata, Y; Silva-Rivera, H; Camargo, N; Kappe, S. 2008. A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105: 305-310.
- Tewari, R. et. al. 2010. The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe.* 8 (4): 377-387.
- Tyler, J; Collins, K; Prasad-Sinha, J; Amiot, E; Bulger, M; Harte, P; Kadonaga, J. T. 2001. Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 Chromatin Assembly Factors. *Molecular and cellular biology*, 21(19), 6574-6584.
- Vermaak, D; Wade, P; Jones, P; Shi, Y; Wolffe, A. 1999. Functional Analysis of the SIN3-Histone Deacetylase RPD3-RbAp48-Histone H4 Connection in the *Xenopus* Oocyte. *Molecular and cellular biology.* 19: 5847-5860.

- Volk, A; Crispino, J. 2015. The role of the chromatin assembly complex (CAF-1) and its p60 subunit (CHAF1b) in homeostasis and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 1849: 979-986.
- Volz, J; Carvalho, T; Ralph, S; Gilson, P; Thompson, J; Tonkin, C; Langer, C; Crabb, B; Cowman, A. 2010. Potential epigenetic regulatory proteins localise to distinct nuclear sub-compartments in *Plasmodium falciparum*. *International Journal for parasitology*. 40:109-121.
- Ward, P; Equinet, L; Packer, J; Doerig, C. 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5, 79.
- Witkowski, L; Foulkes, W. 2015. In Brief: Picturing the complex world of chromatin remodelling families. *The Journal of pathology*.
- World Health Organization (WHO). 2014. World Malaria Report 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Tomado de www.who.int/malaria. [Abril de 2015].
- Yang, D.; Maeng, S; Strain, A; Floyd, A; Nielsen, K; Heitman, J; Bahn, Y. 2012. Pleiotropic roles of the Msi1-like protein Msl1 in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*. 11:1482-1495.
- Young, J.A., Fivelman, Q.L., Blair, P.L., de la Vega, P., Le Roch, K.G., Zhou, Y., *et al.* 2005. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Mol Biochem Parasitol*. **143**: 67–79.
- Zhang, Q; Goodman, R. 2000. Histone binding protein RbAp48 interacts with a complex of CREB binding protein and phosphorylated CREB. *Molecular and cellular biology*, 20(14), 4970-4978.
- Zhao, K. *et al.* 1998. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95, 625±636. 1998.

