



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DE FOSFOPROTEÍNAS DURANTE LA
GAMETOGÉNESIS DE *Plasmodium berghei*”**

T E S I S

Que presenta

ALBERTO ALONSO MORALES

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de la tesis

Dr. FIDEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

México, D.F.

NOVIEMBRE, 2015

ASESORES

Dra. ROSA MARIA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES

Investigador Titular 3D del Departamento de Infectómica y Patogénesis
Molecular, Cinvestav-IPN.

Dra. FEBE ELENA CAZÁRES RAGA

Profesor Invitado del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
Cinvestav-IPN.

Dr. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

Investigador Titular 3C del Departamento de Infectómica y Patogénesis
Molecular, Cinvestav-IPN.

Dr. ENRIQUE OTHÓN HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

Investigador Titular 3B del Departamento de Infectómica y Patogénesis
Molecular, Cinvestav-IPN.

Dr. MARIO HENRY RODRÍGUEZ LÓPEZ

Investigador en Ciencias Médicas F del Centro de Investigación Sobre
Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN en el laboratorio No. 12 de Entomología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular bajo la dirección del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de Doctorado. Becario CONACyT No. de registro 225013.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por su apoyo para que pudiera realizarse este proyecto.

A la Dra. Febe Elena Cazéres Raga por todo su apoyo académico que permitió la realización de este proyecto.

A mi comité de asesores por su gran disposición en todo momento y por sus observaciones para la realización de este proyecto.

A la Bióloga Experimental Leticia Cortés Martínez por su asistencia técnica.

Al técnico Juan Manuel Ceballos Ramírez por su asistencia técnica.

Al M.V.Z. Manuel Flores Cano de la Unidad de Producción de Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) por sus asistencia técnica en el manejo de animales de experimentación para la producción de anticuerpos.

A mis amigos del laboratorio 12 de Entomología Molecular del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Lore, Tino, Abel, Vero, Lety, Sr. Juanito y Juan Manuel; gracias por todos esos buenos momentos, hicieron que tuviera una estancia muy agradable en el laboratorio.

A mis amigos del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Gracias por su amistad.

DEDICATORIA

A mi Familia

Mis padres

Socorrito Morales Jiménez y Lucio Alonso Vázquez

Mi Hermano

Carlos Alonso Morales

Gracias por apoyarme en todo momento

A mi Nueva Familia

Don Carlos, Doña Edu, Gera y Carlos

Gracias por su confianza

A Rosita Cardenas Guerra por permitirme se parte de su vida, y estar conmigo en todo momento, de corazón, mil gracias.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de la malaria	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	4
1.2.1 Desarrollo en el hospedero vertebrado	4
1.2.1.1 Desarrollo asexual	4
1.2.1.2 Desarrollo sexual (gametocitogénesis)	5
1.2.2 Desarrollo en el hospedero invertebrado	6
1.2.2.1 Gametogénesis	6
1.2.2.2 Fertilización, desarrollo a oocineto, ooquiste y esporozoíto	7
1.3 Desarrollo de vacunas altruistas contra la malaria	9
1.4 Especies de <i>Plasmodium</i> que infectan murinos y se utilizan en el laboratorio	9
II. ANTECEDENTES	11
2.1 Señalización celular	11
2.1.1 Señalización celular en <i>Plasmodium</i>	11
2.1.2 Proteínas de señalización durante el desarrollo sexual de <i>Plasmodium</i>	12
2.2 Biología molecular de gametos en <i>Plasmodium</i>	14
2.2.1 Proteínas que participan en la unión de gametos en <i>Plasmodium</i>	15
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Manejo de animales de laboratorio	21
7.2 Aislamiento de parásitos	21
7.2.1 Aislamiento de gametocitos y gametos de <i>Plasmodium berghei</i>	21
7.2.2 Aislamiento de parásitos totales de la cepa 2.33 de <i>P. berghei</i>	22
7.3 Proteómica	23
7.3.1 Extracción de proteínas	23

7.3.2 Electroforesis bidimensional (E-2D)	24
7.3.3 Electrotransferencia	25
7.3.4 Western blot.....	25
7.3.5 Obtención de polipéptidos y digestión con tripsina	26
7.3.6 Identificación de proteínas por espectrometría de masas	26
7.3.7 Enriquecimiento de fosfopéptidos con TiO ₂	26
7.3.8 Identificación de fosfopéptidos por LC-MS/MS	27
7.4 Análisis de algunas fosfoproteínas diferenciales, identificadas durante la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	28
7.4.1 Biología molecular	28
7.4.1.1 Purificación de RNA.....	28
7.4.1.2 Ensayo de retrotranscripción – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	29
7.4.1.3 Oligonucleótidos de la ribonucleótido difosfato reductasa (RNR).....	30
7.4.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
7.4.1.5 Clonación de los fragmentos amplificados	31
7.4.1.6 Secuenciación de los fragmentos clonados	34
7.4.2 Ensayos funcionales	35
7.4.2.1 Inibición de la ribonucleótido difosfato reductasa con hidroxurea (HU), durante la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	35
7.4.2.2 Inibición de la gametogénesis de <i>P. berghei</i> con un anticuerpo anti-tubulina.....	35
7.4.2.3 Localización de la tubulina durante la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	36
VIII. RESULTADOS	37
8.1 Análisis de proteínas durante la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	37
8.2 Diferenciación de gametocitos de <i>P. berghei</i> en ausencia de SFB.....	37
8.3 Análisis de proteínas fosforiladas durante la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	40
8.4 Identificación de fosfoproteínas por MS/MS.....	45
8.5 Identificación de sitios fosforilados por enriquecimiento de fosfopeptidos-TiO ₂ y LC-MS/MS..	49
8.6 Estudio de algunas proteínas que cambiaron su fosforilación durante la gametogénesis en <i>P. berghei</i>	51
8.6.1 Ribonucleótido difosfato reductasa en la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	51
8.6.1.1 Expresión durante en ciclo de vida del parásito	51
8.6.1.2 Inibición de la ribonucleótido difosfato reductasa con hidroxurea (HU).....	53
8.6.2 Tubulina en la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	56
8.6.2.1 Localización de la tubulina en la gametogénesis	56
8.6.2.2 Participación de la tubulina en la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	59

IX.	DISCUSIÓN.....	61
9.1	La malaria	61
9.2	Inducción de la gametogénesis de <i>P. berghei</i> en ausencia de suero.....	62
9.3	Proteínas fosforiladas durante la gametogénesis de <i>P. berghei</i>	62
9.4	Ribonucleótido difosfato reductasa	65
9.5	Proteínas de citoesqueleto, tubulina y actina.....	66
9.6	Otras proteínas fosforiladas.....	67
9.6.1	Chaperonas.....	67
9.6.2	Enolasa	68
9.6.3	Proteínas de unión a cromatina	69
9.6.4	Proteínas G pequeñas	69
9.6.5	Proteínas del complejo T.....	70
9.7	Represión post-transcripcional en <i>Plasmodium</i>	70
X.	CONCLUSIONES	73
XI.	PERSPECTIVAS	74
XII.	REFERENCIAS.....	75

RESUMEN

La gametogénesis de *Plasmodium*, la cual se lleva a cabo en el estómago del mosquito, es un complejo proceso de diferenciación que involucra procesos de señalización celular, los cuales son regulados por fosforilaciones y defosforilaciones; estos procesos de señalización celular regulan vías metabólicas y la síntesis de proteínas necesarias para el desarrollo del parásito. Sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la activación de la gametogénesis es poco estudiado. En este trabajo se analizó la fosforilación de proteínas durante la gametogénesis *in vitro* de *Plasmodium berghei* en medio en ausencia de suero fetal bovino, mediante electroforesis bidimensional (2-DE), combinada con inmunotransferencia (IB) y el uso de anticuerpos específicos que reconocen residuos fosforilados en serina, treonina y tirosina. Aproximadamente 75 proteínas cambiaron su fosforilación, de las cuales 23 fueron identificadas por espectrometría de masas. Las proteínas identificadas incluyen componentes del citoesqueleto, proteínas de choque térmico, y proteínas implicadas en la síntesis de DNA y vías de señalización, entre otras. Se analizó el sitio de fosforilación de seis de las proteínas identificadas, HSP70, la proteína msi1 con repetidos WD40, enolasa, actina-1 y dos isoformas de la subunidad pesada de la ribonucleótido difosfato reductasa mediante enriquecimiento de fosfopéptidos TiO₂ y espectrometría de masas en tándem. Además, la exposición transitoria a la hidroxiurea, un inhibidor de la ribonucleótido difosfato reductasa, inhibió la gametogénesis del macho de una manera dosis dependiente, y proporcionando datos importantes para continuar con el estudio funcional de esta proteína. Respecto al estudio de la tubulina, mediante inmunofluorescencia se observó que la proteína se encuentra en la periferia de los gametocitos y gametos, en la parte citoplásmica, cercana a la membrana, además en gametos se observó que se encuentra de manera abundante en el citoplasma del parásito; mediante el uso de un anticuerpo anti-tubulina, se observó que el desarrollo a oocinetos se inhibe de manera dosis dependiente.

ABSTRACT

Plasmodium gametogenesis within the mosquito midgut is a complex differentiation process involving signaling mediated by phosphorylation, which modulate metabolic routes and protein synthesis required to complete this development. However, the mechanisms leading to gametogenesis activation are poorly understood. We analyzed protein phosphorylation during *Plasmodium berghei* gametogenesis *in vitro* in serum-free medium using bidimensional electrophoresis (2-DE) combined with immunoblotting (IB) and antibodies specific to phosphorylated serine, threonine and tyrosine. Approximately 75 protein exhibited phosphorylation changes, of which 23 were identified by mass spectrometry. These included components of the cytoskeleton, heat shock proteins, and proteins involved in DNA synthesis and signaling pathways among others. Novel phosphorylation events support a role for these proteins during gametogenesis. The phosphorylation sites of six of the identified proteins, HSP70, WD40 repeat protein msi1, enolase, actin-1 and two isoforms of large subunit of ribonucleoside reductase were investigated using TiO₂ phosphopeptides enrichment and tandem mass spectrometry. In addition, transient exposure to hydroxyurea, an inhibitor of ribonucleoside reductase, impaired male gametocytes exflagellation in a dose-dependent manner, and provides a resource for functional studies. Regard to the study tubulin, by immunofluorescence it was observed that the protein is found in the periphery of gametocytes and gametes at the cytoplasmic part, close to the membrane, also in gametes was observed which is located abundant in cytoplasm parasite; by using an anti-tubulin antibody was observed that development is inhibited ookinetes dose dependent manner.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la malaria

Los vectores son organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas; muchos de esos vectores son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado (persona o animal), y posteriormente los inoculan a un nuevo portador al ingerir su sangre; los mosquitos son los vectores de enfermedades mejor conocidos; las garrapatas, moscas, flebótomos, pulgas, triatominos y algunos caracoles de agua dulce también son vectores de enfermedades (Enfermedades Transmitidas por Vectores, OMS 2014).

Las enfermedades transmitidas por vectores son trastornos causados por agentes patógenos, entre ellos los parásitos, en el ser humano. En todo el mundo se registran cada año más de 1000 millones de casos y más de 1 millón de defunciones como consecuencia de las enfermedades transmitidas por vectores, tales como la malaria, dengue, esquistosomiasis, tripanosomiasis africana humana, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, fiebre amarilla, encefalitis japonesa y oncocercosis. Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, la distribución de estas enfermedades está determinada por una compleja dinámica de factores medioambientales y sociales; en los últimos años, la globalización de los desplazamientos y el comercio, la urbanización no planificada y los problemas medioambientales, entre ellos el cambio climático, están influyendo considerablemente en la transmisión de enfermedades; algunas, como el dengue, la fiebre chikungunya y la fiebre del Nilo Occidental, están apareciendo en países en los que hasta hace poco eran desconocidas (Enfermedades Transmitidas por Vectores, OMS 2014).

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante transmitida al hombre por un vector, es causada por parásitos protozoarios del Phylum *Apicomplexa* del género *Plasmodium* y es transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles sp*, los cuales generalmente pican entre el atardecer y el amanecer. En todo el mundo existen más de 60 especies de anofelinos, que son vectores reconocidos. Cuatro especies de *Plasmodium* causan

malaria en el humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. En los últimos años también ha habido algunos casos humanos por *P. knowlesi*, un parásito del mono que aparece en zonas boscosas de Asia Sudoriental (Informe Mundial de la Malaria, OMS, 2013).

Las especies más frecuentes de malaria son *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo *P. falciparum* la especie más peligrosa al ser responsable de la mayoría de las muertes y de las formas más graves de la enfermedad. *P. falciparum* predomina en África, mientras que *P. vivax* tiene una distribución más amplia, ya que es capaz de desarrollarse en el mosquito vector a temperaturas más bajas, y por lo tanto sobrevivir en zonas altas y en climas más fríos, además de que tiene un estadio hepático latente (conocido como hipnozoíto) que le permite sobrevivir durante los períodos en que los mosquitos *Anopheles* no están presentes para continuar la transmisión, tal como, durante los meses de invierno (Informe Mundial de la Malaria, OMS, 2013).

La malaria es una enfermedad prevenible y tratable, siempre y cuando las intervenciones recomendadas actualmente se implementan correctamente. Estas intervenciones incluyen: el control de vectores mediante el uso de mosquiteros tratados con insecticida, la fumigación de interiores con insecticidas de acción residual y, en algunos lugares específicos, el control de larvas (Informe Mundial de la Malaria, OMS, 2013).

Según la Organización Mundial de la Salud, la malaria provoca más de 600 000 defunciones cada año, en su mayor parte en menores de cinco años; se transmite en 97 países, lo que supone un riesgo de enfermedad para 3400 millones de personas. La morbilidad se concentra principalmente en África subsahariana, donde se estima que se producen el 90% de todas las defunciones anuales por malaria (Informe Mundial de la Malaria, OMS, 2013).

El financiamiento y la cobertura de los programas de control de la malaria han aumentado notablemente desde el año 2000, y esto ha generado una reducción de las tasas de incidencia y mortalidad de la enfermedad. De 106 países en los que seguía habiendo transmisión de malaria en el 2000, 64 han alcanzado la meta de los Objetivos de Desarrollo del Milenio que consistente en reducir la incidencia de la enfermedad. De esos 64 países, 55 están en camino de

alcanzar la meta de la Organización Mundial de la Salud y de la Iniciativa para Hacer Retroceder la Malaria (RBM, Roll back Malaria, por sus siglas en inglés) que consiste en reducir la tasa de incidencia del paludismo en un 75% para 2015. La tasa mundial estimada de incidencia de casos de malaria disminuyó en un 30% entre el 2000 y 2013, y la de mortalidad en un 47% (Informe Mundial de la Malaria, OMS, 2013). En figura 1 se muestra la distribución geográfica de la malaria durante el 2014.

En México, de acuerdo a la Dirección General de Epidemiología, en el 2014 se reportaron 591 casos de malaria causados por *P. vivax* y los estados que mostraron mayor número de casos fueron: Chiapas, Campeche y Sinaloa (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SINAVE, 2015).

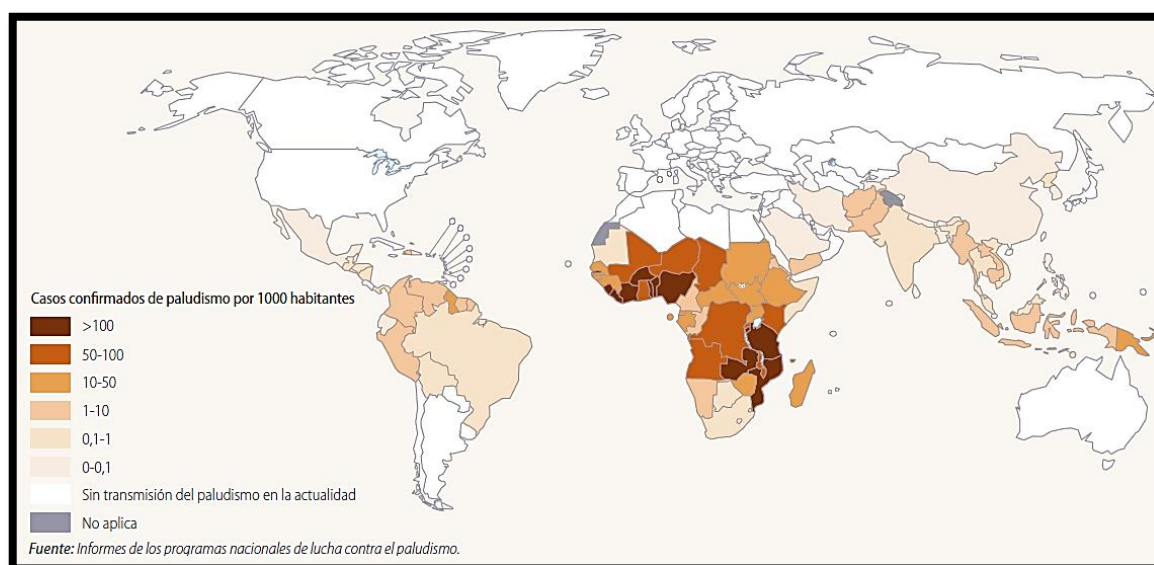


Figura 1: Distribución de la malaria en el mundo. Las regiones que presentan una mayor frecuencia son África Subsahariana, las regiones tropicales y subtropicales de Asia, América del Sur y América Central, incluyendo México (Organización Mundial de la Salud, 2014).

1.2 Ciclo de vida de *Plasmodium*

El ciclo de vida de *Plasmodium* es complejo y se lleva a cabo alternando un hospedero vertebrado y un invertebrado (figura 2).

1.2.1 Desarrollo en el hospedero vertebrado

1.2.1.1 Desarrollo asexual

En el humano, la infección comienza con la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectado con el parásito el cual introduce, junto con la saliva, las formas infectantes del parásito denominadas esporozoítos, que circulan por corto tiempo e invaden las células parenquimatosas del hígado, donde el núcleo del parásito sufre divisiones repetidas originando formas sinciciales llamados merosomas; al completar su maduración los merosomas liberan miles de merozoítos que invaden los glóbulos rojos (Le Roch *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2006).

La entrada del parásito (merozoítos) a los glóbulos rojos es clave para el establecimiento de la infección, para lo cual el parásito cuenta con una compleja y dinámica maquinaria de organelos secretorios formada por los micronemas, roptrias y gránulos densos encargados de promover la entrada del parásito al eritrocito (Murphy *et al.*, 2006). Ya dentro de los glóbulos rojos, los merozoítos se desarrollan a la siguiente fase de crecimiento, el trofozoito eritrocítico. Después de 2 a 3 días, dependiendo de la especie de *Plasmodium*, el núcleo se divide produciendo esquizontes, éstos se rompen y liberan 8-16 merozoítos capaces de invadir a otro eritrocito e iniciar otra generación de parásitos en sangre. Las fases del ciclo eritrocítico son las responsables de los síntomas y patologías asociadas con la malaria; en el caso de la malaria no complicada, ésta asociada con fiebres cíclicas y escalofríos. La malaria severa incluye múltiples condiciones patológicas tales como la acidosis láctica, la malaria cerebral (que es el resultado de la adhesión de los eritrocitos infectados al endotelio del cerebro en *P. falciparum*) y la anemia severa (Murphy *et al.*, 2006). En los siguientes ciclos, que determinan la recurrencia de los síntomas cada 2 o 3 días, los trofozoítos se pueden desarrollar nuevamente hasta esquizontes o bien tomar una vía alterna para diferenciarse a gametocitos machos y hembras, los cuales son

las únicas formas del ciclo de vida del parásito capaces de mediar la transición del hospedero vertebrado al hospedero invertebrado (Moreira *et al.*, 2004).

1.2.1.2 Desarrollo sexual (gametocitogénesis)

La diferenciación de parásitos asexuales a gametocitos es llamada gametocitogénesis y se da aproximadamente a los 7-15 días después de iniciada la infección eritrocítica, algunos factores que influyen para inducir la gametocitogénesis son: la densidad parasitaria, la anemia, la respuesta inmune o bien el tratamiento con drogas (Alano, 2007; Tiburcio *et al.*, 2015). Para el caso de *P. falciparum*, se requieren cerca de 10 días para completar la maduración de los gametocitos, pudiéndose clasificar en cinco estadios morfológicos, que presentan las siguientes características: en el estadio I el parásito se encuentra redondeado y sin llegar a ocupar todo el eritrocito, es indistinguible de los trofozoítos tempranos; en el estadio II se desarrolla un nuevo citoesqueleto subpelicular que está sostenido por los microtúbulos, a medida que la longitud de los microtúbulos aumenta, los gametocitos se desarrollan en una forma de D alargada; en el estadio III se da un alargamiento en los extremos, el eritrocito ligeramente se distorsiona, la membrana subpelicular y el complejo de los microtúbulos se desarrollan rápidamente, y los machos se pueden distinguir de las hembras; en el estadio IV la membrana subpelicular y el complejo de los microtúbulos rodea completamente el parásito, el dimorfismo sexual es pronunciado, las hembras muestran un aumento en los ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico con pigmentos densos, mientras que en los machos el núcleo se agranda y los pigmentos son más dispersos; finalmente en el estadio V la forma del huso mitótico se convierte en una media luna con extremos redondeados debido a la pérdida del complejo de los microtúbulos (Butterworth *et al.*, 2013; Nilsson *et al.*, 2015). Dependiendo de la clona parasitaria, el índice de gametocitos puede ser de un gametocito macho por cerca de cinco gametocitos hembra, sin embargo, si se toma en cuenta que en el estómago del mosquito un gametocito macho da origen a aproximadamente ocho gametos machos, queda una proporción 1:1 (Young *et al.*, 2005; Kuehn y Pradel, 2010).

1.2.2 Desarrollo en el hospedero invertebrado

1.2.2.1 Gametogénesis

La vida del parásito en el vector inicia cuando un mosquito hembra ingiere gametocitos maduros presentes en la sangre de una persona infectada, minutos después de la ingesta los gametocitos maduros se diferencian a gametos y salen del eritrocito. Este proceso de diferenciación a gametos ocurre en el estómago del mosquito y se llama gametogénesis (Moreira *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2005).

La gametogénesis es inducida por estímulos externos como son la disminución de la temperatura de 37°C a 19-21°C, un aumento en el pH hasta 8.0-8.3, una concentración de bicarbonato de al menos 20 mM y la presencia de un factor que activa a los gametocitos (GAF) identificado como ácido xanturénico (XA), el cual es secretado por el epitelio del estómago del mosquito (Muhia *et al.*, 2001).

Para el caso de los gametocitos machos, estos se diferencian completamente a gametos en aproximadamente 15-20 minutos, durante este tiempo los gametocitos machos completan tres rondas de replicación de DNA, se lleva a cabo el ensamble del axonema y la segregación de ocho genomas haploides (proceso llamado como exflagelación). La diferenciación de los gametocitos hembras es menos espectacular, aquí los parásitos permanecen en un estado mitótico, en el cual, de forma interesante todavía requieren de regulación post-traducciona. La gametogénesis de la hembra está caracterizada por cambios en el citoplasma y la salida de los glóbulos rojos, así como por la traducción de un subgrupo de transcriptos regulados mediante mecanismos de represión de la traducción, por un complejo ribonucleoproteico (mRNP) que contiene a los represores transcripcionales: DOZI, una helicasa de RNA [*Development of Zygote Inhibited*, una de clase DDX6 (*DEAD-box RNA helicase 6*)] y el factor homólogo de CITH, una proteína de unión a RNA (homólogo de CAR-I de *Caenorhabditis elegans* y de Tayler Hitch de *Drosophila melanogaster*, con un dominio de unión a RNA parecido a Sm), que inhiben el desarrollo a cigoto (Mair *et al.*, 2010; Morahan *et al.*, 2014).

Existen grandes diferencias en la actividad celular entre gametos de cada sexo, haciendo a los gametos machos más vulnerables a la intervención farmacológica debido a su gran actividad metabólica.

1.2.2.2 Fertilización, desarrollo a oocineto, ooquiste y esporozoíto

Los ocho microgametos formados tienen la capacidad de fertilizar a un macrogameto, y este proceso de fertilización ocurre dentro de los 30-60 min después de la entrada del parásito al estómago, dando como resultado la formación de un cigoto o huevo, el cual gradualmente se diferencia a oocineto móvil, que tiene la apariencia de una banana o de una hoja. Éste es móvil y capaz de evadir las enzimas proteolíticas, lipolíticas y glucolíticas secretadas por el epitelio del estómago del mosquito al lumen intestinal. En este momento el parásito debe de atravesar dos barreras: la matriz peritrófica (MP), que es una capa extracelular formada principalmente de quitina y proteínas, que protege el estómago del mosquito y rodea al bolo alimenticio, y el epitelio intestinal. Después de atravesar estas barreras el oocineto se establece entre el epitelio y la lámina basal del estómago, del lado del hemocele. En este sitio, durante los próximos 10 a 15 días el parásito (dependiendo de la especie y la temperatura) se diferencia en ooquiste maduro. En el ooquiste ocurre una gran cantidad de divisiones celulares y se generan miles de esporozoítos que son liberados en el hemocele, los cuales viajan a través del cuerpo del mosquito para finalmente invadir las glándulas salivales del mosquito donde maduran quedando listos para infectar al humano durante la picadura que realiza el mosquito en una nueva ingesta sanguínea (Aly *et al.*, 2009; Hirai y Mori, 2010; Ngwa *et al.*, 2013; Sinden, 2015).

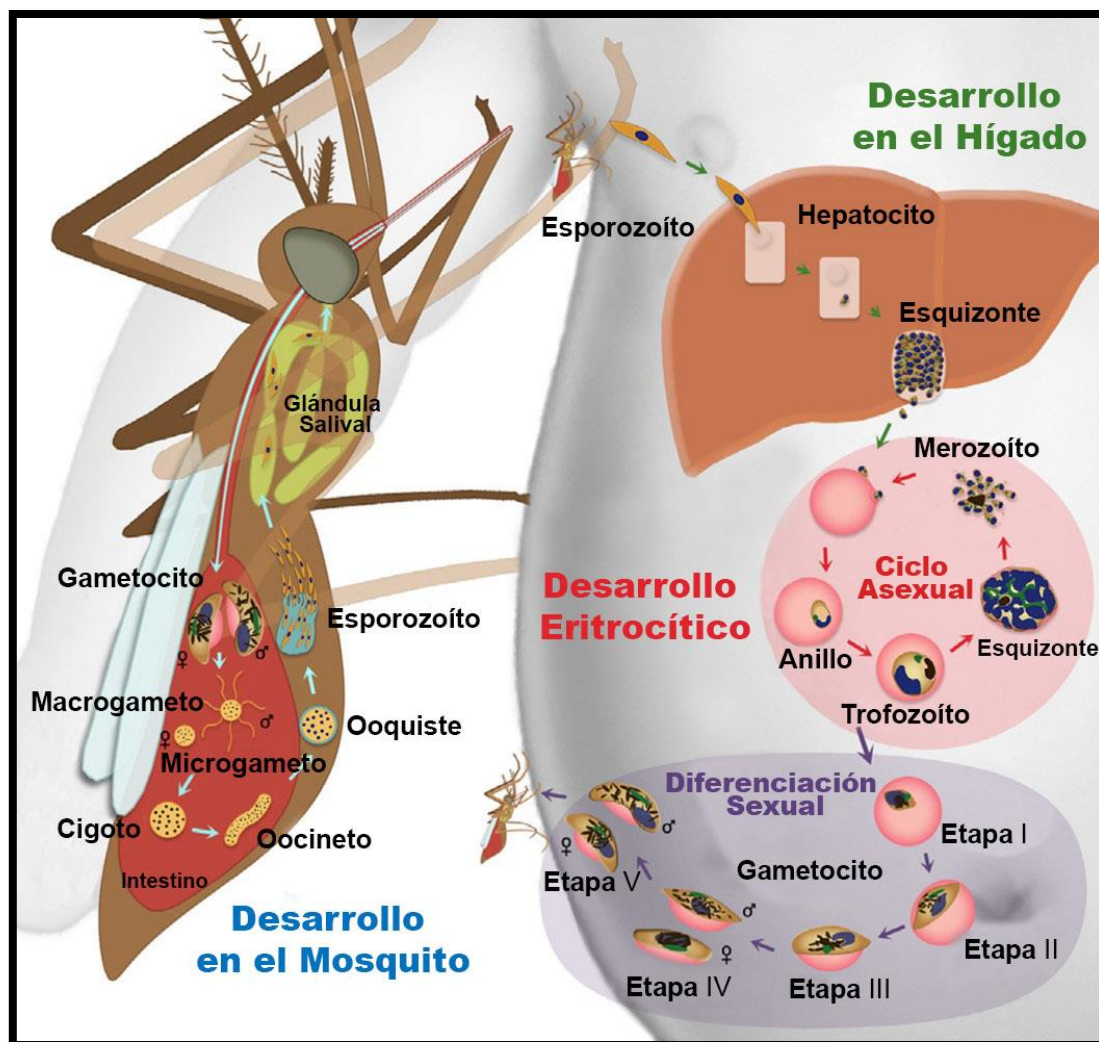


Figura 2: Ciclo de vida de *Plasmodium*. Mosquitos hembra infectados con *Plasmodium* inoculan esporozoítos dentro del hospedero humano, los esporozoítos pasan al torrente sanguíneo hasta llegar a los hepatocitos donde maduran hasta formar a los merozoítos que son liberados al torrente sanguíneo. Los merozoítos invaden a los eritrocitos, donde se desarrollan secuencialmente a las formas de anillo, trofozoíto y esquizonte para formar nuevos merozoítos. Una porción pequeña de los parásitos dentro de los eritrocitos se diferencian a gametocitos, los cuales son ingeridos por mosquitos sanos, en el estómago del mosquito se diferencian en gametos, el gameto macho fertiliza al gameto hembra para dar origen a un cigoto. Los cigotos se convierten en oocinetos móviles y alargados, que invaden la membrana del epitelio intestinal del mosquito, lo atraviesan y se establecen entre el epitelio y la lámina basal, donde se desarrollan en ooquistes. Los ooquistes crecen, se rompen y liberan una nueva generación de esporozoítos, los cuales viajan e invaden a las glándulas salivares del mosquito (Modificado de Biamonte *et al.*, 2013).

1.3 Desarrollo de vacunas altruistas contra la malaria

Los esfuerzos para controlar la malaria han sido frustrados por la complejidad biológica y ecológica tanto del parásito como de su vector (Tarun *et al.*, 2008). El desarrollo de drogas y vacunas para combatir la malaria tradicionalmente ha sido enfocado hacia las fases del ciclo eritrocítico, etapa en la cual aparecen los síntomas clínicos asociados con la enfermedad; sin embargo, en las últimas décadas, se ha hecho evidente que el éxito de cualquier estrategia para el control de la malaria es la búsqueda de drogas y vacunas que puedan ser usadas coordinadamente en contra de varios estadios del ciclo de vida del parásito. La fase sexual del parásito es considerada como blanco potencial para el desarrollo de nuevas drogas y/o vacunas que bloqueen el desarrollo del parásito en el mosquito, con el objetivo de prevenir la propagación de la malaria en la población (Carter *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2005). Varias proteínas de superficie de gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos se han propuesto como antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión (TBV, Transmission blocking malaria vaccines por sus siglas en inglés), como son Pfs48/45, Pfs230, Pfs25/28 encontrando una reducción en el índice de transmisión, sin embargo ninguna de éstas la bloquea por completo, razón que hace importante identificar nuevas proteínas que puedan ser implementadas como blancos para el desarrollo de TBV (Van Dijk *et al.*, 2001; Eksi *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2007).

1.4 Especies de *Plasmodium* que infectan murinos y se utilizan en el laboratorio

Para el estudio de la malaria, cuatro especies de *Plasmodium*, aisladas de ratas silvestres de cinco países de África se han adaptado para crecer en ratones y ratas de laboratorio, lo cual ha permitido estudiar la malaria en modelos de experimentación. Existen diferencias evidentes en la biología de cada parásito, dentro de las que se incluyen su morfología y la preferencia por las células rojas sanguíneas. *P. chabaudi* y *P. vinckei* invaden preferentemente las células rojas sanguíneas maduras, al igual que *P. falciparum* y *P. malariae*, mientras que *P. berghei* y *P. yoelii*, del mismo modo que *P. vivax* y *P. ovale*, invaden los reticulocitos. Los parásitos de la malaria que infectan a roedores, al igual que *P. falciparum* tienen 14 cromosomas, son

polimórficos entre ambas especies y entre los aislamientos de la misma especie. A pesar de la plasticidad del genoma, la localización de diferentes genes a lo largo del cromosoma (sintenia) entre las cuatro especies es altamente conservada. Estas especies que infectan a murinos han sido utilizadas como modelos para el estudio de la malaria, principalmente *P. berghei* y *P. chabaudi* (Carlton *et al.*, 2001).

II. ANTECEDENTES

2.1 Señalización celular

En muchos procesos celulares la detección de señales ambientales o el contacto entre células inducen una amplia gama de señales intracelulares que son cruciales para la sobrevivencia o muerte celular. Un proceso de señalización inicia cuando un ligando se une a su receptor, lo que promueve una cascada de reacciones intracelulares donde participan diversas proteínas que son reguladas por fosforilaciones y defosforilaciones, además de la participación de segundos mensajeros como el calcio, el monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), el monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), entre otros, todos ellos encargados de amplificar la señal. Estos procesos de señalización celular inducen cambios en la actividad transcripcional, movimiento, metabolismo, diferenciación, proliferación celular, entre otros procesos (Schemarova, 2006).

2.1.1 Señalización celular en *Plasmodium*

Los mecanismos moleculares de transducción de señales se han conservado a lo largo de la evolución, de tal manera que los principios generales son similares entre levaduras y mamíferos; sin embargo, presentan variaciones específicas de especie, por lo que los procesos de cada organismo deben ser caracterizados para definir en detalle cómo ocurre su regulación.

En el genoma de *P. falciparum*, se han identificado, con base en la búsqueda de secuencias con dominios consenso de cinasas de otros organismos, de 86-99 proteína cinasas, entre las cuales se han encontrado representantes de las familias de cinasas eucarióticas, con excepción de dos grupos: ste-20 (STE) y la familia de proteínas tirosina cinasas (TyrK). La familia STE incluye proteína cinasas que participan en la vía de las MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos), este grupo es evolutivamente conservado y la ausencia en el genoma del parásito puede indicar que el modo de activación de la vía MAPK es diferente a la de otros eucariontes (Ward *et al.*, 2004). Por otra parte se observó que, aunque no se encuentren en el genoma del *Plasmodium* representantes de familias de tirosina cinasas (TyrK), en el parásito se

observan proteínas fosforiladas en tirosina durante el desarrollo intra-eritrocítico y cuando se utilizan inhibidores de las TyrK, su desarrollo se ve afectado, indicando que en el parásito existen enzimas que realizan esta función y que estas enzimas difieren en sus características de las cinasas típicas, lo que no ha permitido su identificación hasta ahora (Wu *et al.*, 2009). Debido a estas discrepancias, en *Plasmodium* son pocas las proteínas de señalización que se han caracterizado, encontrando diferencias estructurales y de dominios con respecto a las de células de mamífero.

2.1.2 Proteínas de señalización durante el desarrollo sexual de *Plasmodium*

A continuación se describen algunas proteínas de señalización encontradas en el desarrollo sexual del parásito.

Hay una vía de señalización, donde está involucrada la participación del AMPc, un segundo mensajero que activa a la proteína cinasa A (PKA). La PKA existe en las células eucariotes como un complejo inactivo, formado por una subunidad catalítica y una reguladora. La unión de AMPc disocia el complejo, activando la subunidad catalítica, la cual tiene actividad de cinasa con un gran número de sustratos, incluyendo factores de transcripción, lo que provoca cambios en el patrón de expresión de genes. Los niveles de AMPc son controlados por la actividad de la adenilato ciclasa (AC), la cual es activada por receptores de superficie, principalmente por proteínas G heterotriméricas.

En *P. falciparum*, se encontró que posee tanto la PKA (PfPKA) como la adenilato ciclasa (PfAC). Además, de que en su genoma se han encontrado genes que codifican para dos distintas PfAC: la PfAC α contiene seis dominios transmembranales en el N-terminal, lo que es característico de los canales de voltaje de K⁺ y un dominio adenilato ciclasa en el C-terminal, la PfAC β se ha relacionado con una familia de AC solubles que se encuentran en bacterias fotosintéticas y humanos (Muhia, 2003).

También, en *P. falciparum* se identificaron dos guanilato ciclasas: la PfGC α y la PfGC β . El gen que codifica la PfGC α se expresa tanto en los estadios asexuales como en los sexuales,

lo que sugiere que es esencial en el ciclo de vida del parásito. Estudios farmacológicos sugieren la participación del GMPc en la exflagelación, sin embargo, se demostró que la inhibición de pfGCβ no afecta la gametogénesis, lo que sugirió que los niveles de este nucleótido cíclico son regulados por alguna otra enzima. Cuando se eliminó el gen de la fosfodiesterasa (PfpDE) se afectó la exflagelación, resultados que sugirieron que es la PfpDE la que regula los niveles de GMPc durante el desarrollo sexual del parásito. El tratamiento de gametocitos machos con inhibidores de cinasas dependientes de AMPc/GMPc detiene el desarrollo de gametos machos (Taylor *et al.*, 2008).

Otra vía de señalización estudiada en *Plasmodium*, es la que involucra la participación del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), el cual es hidrolizado por la fosfolipasa C (PLC) en dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a su receptor, que se encuentra en el retículo endoplásmico, la unión de este segundo mensajero induce la liberación del Ca²⁺ del retículo endoplásmico; por otro lado el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC).

En *P. falciparum* la exflagelación de gametos es mediada por estos segundos mensajeros, ya que cuando se utilizan inhibidores de la PLC la exflagelación no se lleva a cabo (Muhia, 2003). En *P. falciparum* y *P. berghei* se ha observado que el Ca²⁺ intracelular es un regulador de la activación de los gametocitos, esto debido a que, cuando se utilizan antagonistas de Ca²⁺ (bloqueadores de los canales de calcio) no se lleva a cabo la gametogénesis del macho, donde se incluye la síntesis de DNA. Sin embargo, para el caso del Ca²⁺ extracelular, se ha encontrado que este segundo mensajero no es necesario para que se lleve a cabo la exflagelación, ya que cuando se utilizan quelantes de Ca²⁺ extracelulares, no se afecta éste proceso (Silva *et al.*, 2002; Vernick, 2004).

En *P. berghei* se identificó una proteína cinasa dependiente de calcio, llamada PbCDPK4, activada por el incremento en la concentración de calcio intracelular, que ocurre cuando los gametocitos se exponen a ciertas condiciones, como es: disminución en la temperatura, aumento en el pH y una concentración de bicarbonato de al menos 20 mM. La PbCDPK4 regula la replicación de gametocitos machos y las mutantes en esta cinasa pierden la

capacidad de transmisión a los mosquitos (Billker *et al.*, 2004). Otra proteína cinasa identificada es una homóloga a una cinasa activada por mitógeno, la *Pbmap-2*, la cual controla la formación de gametos machos a nivel de la citocinesis; gametocitos machos que tienen deletado el gen (KO) *Pbmap-2* efectúan la replicación de DNA pero no se da la formación de axonemas móviles (Tewari *et al.*, 2005). En *P. falciparum* se identificó una proteína relacionada a NIMA, llamada *Pfnek-3* la cual se expresa en el estado asexual tardío y en gametocitos (Lye *et al.*, 2006), esta cinasa junto con la *Pfnek-1* pueden fosforilar *in vitro* a la *Pfmap-2* (Dorin *et al.*, 2001).

En los últimos años, se demostró que la proteína CDC20/CDH1 ortóloga en *Plasmodium* es un importante regulador de la mitosis durante la gametogénesis del macho, también se demostró que esta proteína se encuentra fosforilada en las fases asexuales y sexuales, pero el nivel de fosforilación aumenta en gametocitos activados y oocinetos (Guterry *et al.*, 2012).

2.2 Biología molecular de gametos en *Plasmodium*

Como ya se ha mencionado, la diferenciación de los gametocitos hembras es menos espectacular que los gametocitos machos. En los gametocitos hembra, la activación, el marcado redondeamiento y la salida de los glóbulos rojos, logra gametos totalmente fértiles. Los gametos hembra expresan un subconjunto de RNAm materno el cual se almacena como transcriptos represores en los gametocitos. La represión transcripcional de los gametos hembra parece ser esencial para el desarrollo normal del cigoto, ya que en su ausencia numerosos transcriptos, que en otras fases se almacenarían y permanecerían silenciosos, se degradan y los cigotos no logran diferenciarse en oocinetos (Mair *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2015; Alano, 2014).

Del subgrupo de transcritos silenciados que son activados durante la gametogénesis, p25 y p28 son los más estudiados; ambos codifican proteínas de superficie ancladas por GPI, que tienen dominios extracelulares ricos en cisteína y aunque no se conoce su función, se consideran como blancos para bloquear la transmisión (Tomas *et al.*, 2001). Los RNAm de muchas proteínas requeridas en el cigoto se transcriben en gametocitos, pero las secuencias ricas en uridina presentes en las regiones 5' o 3' no traducidas de algunos mensajeros forman complejos de ribonucleoproteínas que contienen los represores transcripcionales DOZI y CITH (Mair *et*

al., 2010). Los mecanismos de represión transcripcional son poco entendidos, sin embargo se cree que es un proceso regulado por proteínas cinasas.

Experimentos realizados *in vitro* han mostrado que después de la gametogénesis, el gameto macho nada libremente, sin tener un movimiento dirigido hacia los gametos hembra, caso parecido a lo observado en otros eucariotas como en especies de la familia *Volvocaceae* (algas verdes) donde un gameto macho móvil se fusiona con un gameto hembra inmóvil. En *Plasmodium*, el gameto macho se mueve vigorosamente durante la interacción con el gameto hembra, y se ha demostrado que este movimiento continúa incluso después de la entrada en el macrogameto, permaneciendo hasta un minuto después de la fusión (Goodman y McFadden, 2008; Hirai y Mori, 2009).

2.2.1 Proteínas que participan en la unión de gametos en *Plasmodium*

En *P. falciparum* y *P. berghei* las proteínas P48/45 son altamente expresadas en la superficie de los gametocitos y gametos. Experimentos KO (knock-out) de estos genes (*P48/45*) en *P. berghei* demostraron un desarrollo normal del parásito durante los estados sanguíneos y la gametogénesis, sin embargo la fertilización no se lleva a cabo. Ensayos de fertilización cruzada, revelaron que gametos hembras KO *P48/45* pueden ser fertilizados por gametos machos silvestres (WT), sin embargo gametos machos KO en *P48/45* no pueden fertilizar a los gametos hembra WT, indicando que *P48/45* en los microgametos es importante para que se dé la fertilización (Van Dijk *et al.*, 2001).

En *P. berghei* se observó que las proteínas P230 y P47 son esenciales en el proceso de fertilización del parásito. Mediante estudios de fertilización cruzada entre parásitos que carecen de P230, P48/45 o P47 se demostró que P230, al igual que P48/45 es un factor de fertilidad del macho. De manera contraria, el silenciamiento de P47 origina una fuerte reducción en la fertilidad sólo de la hembra. Lo que indica que estas tres proteínas, miembros de la familia 6-Cys, son ligandos específico tanto del macho o la hembra que juegan un papel muy importante en el reconocimiento y/o unión de los gametos (Van Dijk *et al.*, 2001)

En *P. berghei* se identificó un homólogo al gen de esterilidad específico de gametos machos, la HAP2 [*haploid-disrupting (hapless)*] descrito originalmente en *Arabidopsis thaliana*, el cual es miembro de la familia GCS1 [Generative Cell Specific 1] (Johnson *et al.*, 2004). En *P. berghei* la proteína HAP2 se expresa exclusivamente en la superficie de gametocitos machos y microgametos; parásitos KO en este gen revelan que no es necesario para la adhesión de gametos (esto debido a que probablemente la unión sea a través de P48/45), pero sí es esencial para la fusión. También se observó que anticuerpos policlonales contra el residuo 355-609 inhiben la formación de oocinetos *in vitro* y ooquistes *in vivo* (Liu *et al.*, 2008; Blagborough y Sinden, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

La malaria es la enfermedad infecciosa más importante en el mundo y en México, aunque la transmisión se tiene bajo control, por sus condiciones ambientales es susceptible de que pueda re-emerger. El desarrollo de drogas y/o vacunas contra esta enfermedad ha sido enfocado principalmente hacia las formas sanguíneas del ciclo de vida del parásito, etapas en la cual aparecen los síntomas asociados con la enfermedad. Sin embargo, las medidas más efectivas contra la enfermedad han sido las dirigidas a evitar la transmisión atacando principalmente al mosquito. Un enfoque alternativo que se ha desarrollado en los últimos años ha sido el diseño de las vacunas “altruistas”, las cuales tiene como objetivo bloquear el desarrollo del parásito dentro del mosquito, y por esta razón es relevante el análisis de las moléculas expresadas en las fases sexuales, incluyendo las que participan durante gametogénesis, y a las que ahora se les considera como posibles blancos para el desarrollo de estrategias que prevengan la transmisión.

La gametogénesis de *Plasmodium* es difícil de estudiar debido a la complejidad tanto para obtener los parásitos como la aplicación de métodos de manipulación genética, sin embargo los mecanismos moleculares como la señalización están siendo estudiados en diversos procesos, incluidos la diferenciación y fertilización. Y dado que se espera que en un nivel de regulación, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas de las cuales las más importantes son las fosforilaciones y defosforilaciones, es de gran interés el conocer algunas proteínas de señalización que varíen su nivel de fosforilación y que participen en dicho evento.

IV. HIPÓTESIS

La señalización celular es un proceso conservado durante la evolución, en el cual las fosforilaciones y defosforilaciones de proteínas son un mecanismo de regulación de importancia clave para los procesos celulares. Por tal motivo, durante la gametogénesis de *Plasmodium berghei* deberán darse cambios en los niveles de fosforilación de diversas proteínas, los cuales estén relacionados con la regulación de la gametogénesis.

V. OBJETIVOS

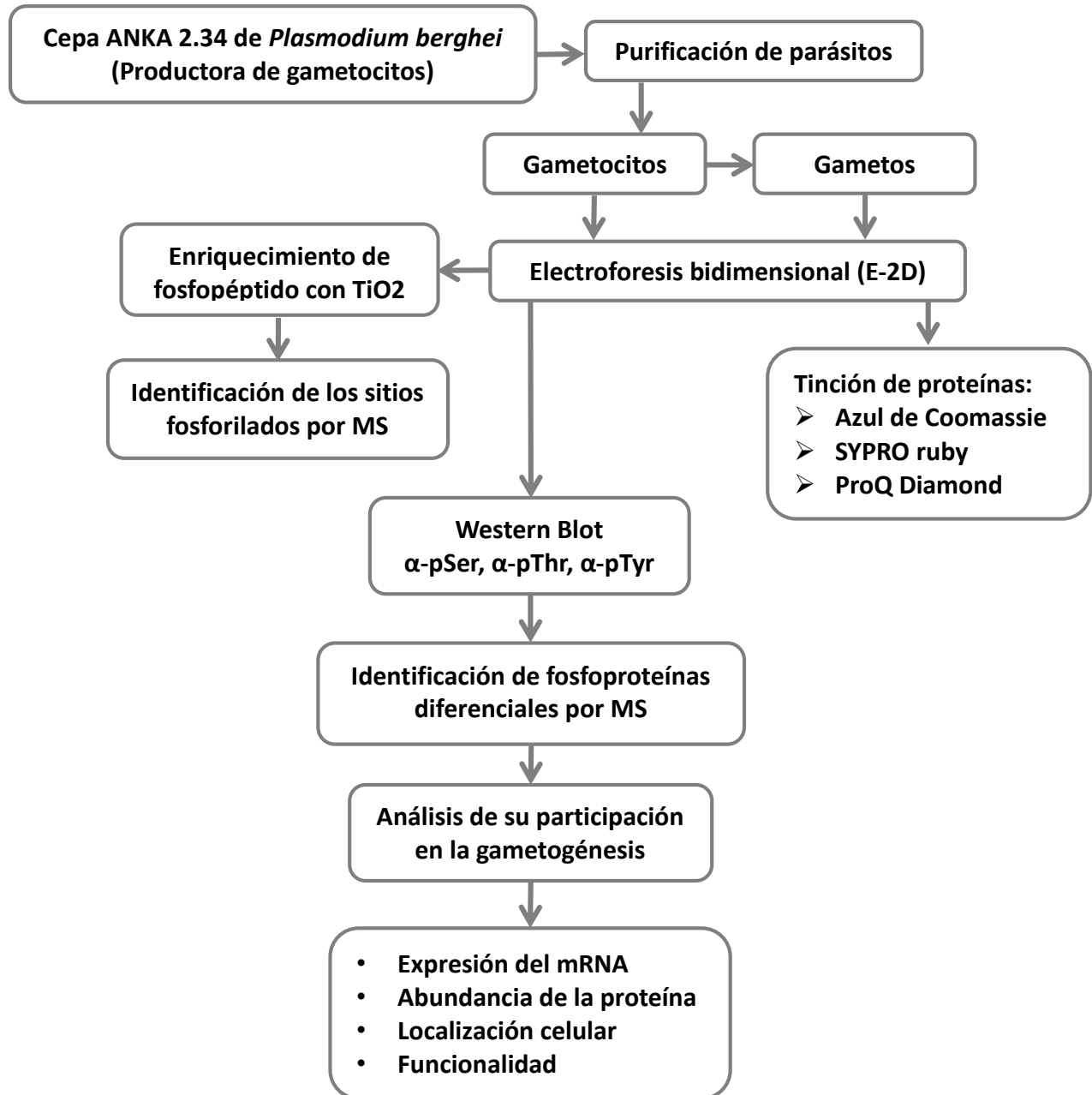
5.1 Objetivo general

- Identificar y caracterizar cambios en la fosforilación de las proteínas durante la gametogénesis de *Plasmodium berghei*.

5.2 Objetivos particulares

- Analizar los cambios en la abundancia de proteínas durante la gametogénesis de *P. berghei*.
- Analizar los cambios en las fosforilaciones de proteínas en los residuos serina, treonina y tirosina, durante la gametogénesis de *P. berghei*.
- Identificar las fosfoproteínas diferenciales.
- Estudiar la participación de algunas de las fosfoproteínas diferenciales.
 - Determinar la expresión a nivel de transcrito.
 - Determinar la localización celular.
 - Analizar la funcionalidad de las proteínas.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Manejo de animales de laboratorio

El manejo de los animales para la purificación de los parásitos se llevó a cabo mediante el protocolo presentado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio del CINVESTAV, “CICUAL”.

7.2 Aislamiento de parásitos

Para este trabajo se utilizaron dos clonas del parásito *Plasmodium berghei* de la cepa Antwerpen Katanga (ANKA): la clona 2.34 productora de gametocitos y la clona 2.33 no productora de gametocitos (proporcionadas por el Colegio Imperial de la Universidad de Londres, Inglaterra a la Dra. María del Carmen Rodríguez del Instituto Nacional de Salud Pública), mantenidas mediante pases cíclicos en ratones machos de la cepa BALB/c.

7.2.1 Aislamiento de gametocitos y gametos de *Plasmodium berghei*

Para la producción de gametocitos y gametos, un grupo de 15-20 ratones BALB/c machos se les inoculó por vía intraperitoneal (IP) 0.2 ml de difenil-hidracina (6 mg/ml) para producir hemólisis e inducir la producción de reticulocitos, los cuales son las células preferidas para la invasión por el parásito (Shinondo *et al.*, 1994). Al tercer día, los ratones tratados con difenil-hidracina se inocularon con 10^6 parásitos, provenientes de ratones infectados previamente, y a los 3 días post-infección se analizó la gametogénesis y la fertilización de los parásitos mediante un ensayo de exflagelación. Éste consistió en tomar 5 μ l de sangre infectada con *P. berghei*, colocándola en 50 μ l de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL: hipoxantina 50 μ g/ml, Hepes 0.025 M, NaHCO₃ 0.024 M, penicilina 5 μ g/ml, estreptomycin 5 μ g/ml, neomicina 1 μ g/ml, suplementado con o sin suero fetal bovino al 20% inactivado a 56 °C, a un pH de 8.3) durante 10-15 min a 19-21 °C. A continuación se tomó una gota del cultivo, se colocó en un portaobjetos, sobre ella se colocó un cubreobjetos que debía contener vaselina en sus

cuatro bordes para crear una cámara con capacidad de aproximadamente 10 μ l. La formación de centros de exflagelación se contó en el microscopio de contraste de fases y se eligieron aquellos ratones que presentaron alta gametocitemia y alta exflagelación en el día 4 post-infección. Para seleccionar los gametocitos en la sangre del ratón se eliminaron las fases asexuales mediante el uso de pirimetamina, la cual inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que es esencial para la síntesis de DNA en el desarrollo asexual (Rodríguez *et al.*, 2002). Para este fin, al 4° día post-infección los ratones seleccionados se inocularon con 0.1 ml de pirimetamina (1 mg/ml) por vía IP. En los días siguientes se revisó la parasitemia en los animales tratados y cuando en los frotis sanguíneos se observaron sólo gametocitos (las formas asexuales se eliminaron) se procedió a sacrificar a los ratones y a la purificación de gametocitos. La obtención de las fases sexuales del parásito se realizó por punción cardiaca utilizando heparina (100 UI/ml) como anticoagulante y la sangre se resuspendió 1:4 con solución amortiguadora A (Solución A: Tris 10 mM, NaCl 170 mM y glucosa 10 mM, pH de 7.4) a 37 °C. La suspensión se colocó sobre un colchón de Histodenz™ (Sigma) al 15% preparado en solución A, pH 7.4 y se centrifugó a 4,000 x g durante 10 min, se recuperó la interfase formada entre el Histodenz y la solución A. Una muestra de los parásitos recuperados se usó para identificar morfológicamente a los gametocitos teñidos con Giemsa al 20% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS: 8 g de NaCl; 0.2 g de KCl; 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ a pH de 7.4). Los parásitos se lavaron tres veces con solución A, centrifugando a 7,000 x g durante 3 min a 37 °C. Para la diferenciación *in vitro*, a los gametocitos se les adicionó medio de cultivo RPMI 1640 (suplementado con o sin suero fetal bovino) y se llevó a una temperatura de 19-21 °C. A los 13-18 min se observó al microscopio de luz la diferenciación a gametos machos (exflagelación) y hembras e inmediatamente ocurrió la fertilización (Rodríguez *et al.*, 2002). Las muestras de gametocitos y gametos se guardaron a -70 °C hasta su uso.

7.2.2 Aislamiento de parásitos totales de la cepa 2.33 de *P. berghei*

Para producir parásitos asexuales puros se utilizó la clona de *P. berghei* 2.33 la cual no produce gametocitos (Paton *et al.* 1993). Para este fin, los ratones BALB/c machos se inocularon IP con 0.2 ml de difenil-hidracina (6 mg/ml). Al tercer día se inoculó a los ratones con 10⁶ parásitos de la clona 2.33, a los 4-5 días post-infección se obtuvo la sangre de la cola para

analizar, por tinción con Giemsa al 20%, el número y las formas del parásito presentes. La sangre infectada se obtuvo por punción cardiaca utilizando heparina (100 UI/ml) y se resuspendió en PBS a temperatura ambiente. La sangre se centrifugó durante 8 min a 3,000 x g, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces. Para eliminar los glóbulos blancos la sangre se pasó por una columna de celulosa CF-11 (Whatman) previamente equilibrada. El filtrado obtenido se centrifugó durante 10 min a 3,000 x g y se lavó dos veces con PBS centrifugando el mismo tiempo y velocidad que anteriormente se utilizó. A continuación, el botón se resuspendió en PBS y se colocó sobre un gradiente de Percoll isosmótico (Percoll y sacarosa 2.5 M, 9:1) (Amersham Pharmacia Biotech) de 90, 80, 70 y 60%, colocado de mayor a menor concentración. El gradiente se centrifugó 30 min a 30,000 x g a 4°C. De las fases formadas en el gradiente se tomó la que contenía esquizontes y trofozoítos, identificándola por su color más oscuro. La interfase se lavó dos veces con PBS a 4°C con la finalidad de liberar los parásitos intracelulares y eliminar restos celulares, la muestra se trató con saponina (Sigma) al 0.15% disuelta en PBS incubando de 15-20 min. Posteriormente se centrifugando a 2000 x g durante 10 min, la pastilla se lavó dos veces con PBS. De las muestras se realizaron frotis teñidos con Giemsa al 20% para determinar la pureza de los parásitos; las muestras de anillos, trofozoítos y esquizontes se guardaron a -70 °C hasta su uso.

7.3 Proteómica

7.3.1 Extracción de proteínas

Para el análisis de proteínas, los parásitos obtenidos se resuspendieron en 30 µl de amortiguador de muestra para isoelectroenfoque (urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, buffer IPG pH 3-10 2%, DTT 40 mM), 20 µl de un coctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche EUA) y 20 µl de un coctel de inhibidores de fosfatasa (PhosStop, Roche Alemania). Los parásitos fueron lisados mediante ocho ciclos de congelación/descongelación utilizando nitrógeno líquido y un pistilo para ejercer fuerza mecánica, posteriormente las proteínas fueron sometidas a un paso de purificación y precipitadas utilizando el kit comercial 2D Clean-up (Amersham Biosciences, USA). Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 100 µl de amortiguador de hidratación para isoelectroenfoque (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%,

buffer IPG pH 3-10 0.5%, DTT 10 mM y azul de bromofenol 0.002%). Finalmente la concentración de proteínas se determinó utilizando el kit comercial 2D Quant (Amersham Biosciences, USA).

7.3.2 Electroforesis bidimensional (E-2D)

Para analizar en detalle las proteínas, éstas se separaron por E-2D, la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) con base a su punto isoeléctrico (pI) y la segunda dimensión por su peso molecular (SDS-PAGE). Para la separación por pI, tiras prefabricadas pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala Suecia) fueron hidratadas toda la noche (16 h) con 200 µg de proteínas disueltas en 125 µl de amortiguador de hidratación. Posteriormente, las proteínas fueron separadas por su pI utilizando el sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala Suecia), usando un programa de corrida de cuatro pasos: en el primer paso se usó un voltaje de 300 y 200 V/h, en el segundo 100 y 300 V/h, para el tercero fueron 5000 y 4500 V/h y el cuarto paso fue de 5000 y 2000 V/h. Una vez terminada la corrida, las tiras fueron incubadas en amortiguador de equilibrio (urea 6 M, Tris-HCl, pH 8.8 75 mM, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%) más DTT 65 mM durante 15 min, en seguida se incubaron en el mismo amortiguador con iodoacetamida 65 mM durante 15 min (GE Healthcare). Después de este tratamiento, las proteínas fueron separadas por peso molecular en geles SDS-PAGE al 10%, el corrimiento de proteínas primeramente se llevó a cabo durante 20 min a 80 V, posteriormente se aumentó el voltaje a 100 V hasta que el frente de corrida estuviera a 2 mm antes del final del gel. Una vez finalizado el corrimiento, un grupo de geles fueron fijados en etanol al 30%/ácido acético al 10% durante 30 min para ser teñidos con el colorante azul de Coomassie coloidal (G250, Bio-Rad, EUA) o SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific) por 2 h. Los geles teñidos con azul de Coomassie coloidal fueron desteñidos con agua Milli-Q hasta la visualización de las proteínas y fueron digitalizados en el sistema ImageQuant LAS 4000 (General Electric Healthcare Bio-Sciences); los geles teñidos con SYPRO Ruby fueron analizados en el sistema Ettan DIGE Imager (GE Healthcare), usando una excitación de 280/450 nm. Otro grupo de geles fueron utilizados para la electrotransferencia.

7.3.3 Electrotransferencia

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE, Healthcare Bio-Sciences). Para este fin, el gel, membrana y papel filtro se humedecieron con amortiguador de transferencia (metanol 20%, Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8.3) durante 30 min. Posteriormente, dentro de una cámara de transferencia semi-humeda (GE Healthcare Bio-Sciences) se preparó un sándwich, que consistió en colocar el gel y la membrana de nitrocelulosa entre tres pedazos de papel filtro de 3 mm. Finalmente la transferencia se llevó a cabo a 0.07 Amp durante 60 minutos.

7.3.4 Western blot

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloqueó con albumina sérica bovina al 3% en TBS-Tween (TBS-T) al 0.01% durante 2 h, se lavó tres veces con TBS-T al 0.01% y se incubó con el anticuerpo α -fosfoserina (anticuerpo policlonal, dilución 1:100, Invitrogen Life Technologies, No. de catálogo 61-8100) o α -fosfotreonina (anticuerpo monoclonal, dilución 1:1000 Invitrogen Life Technologies, No. de catálogo 13-9200), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente la membrana de NC se lavó 3 veces con TBS/T al 0.01% y se incubó durante 2 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Millipore, USA, No. de catálogo AP308P) dilución 1:80000 o anti-IgG de conejo (Invitrogen, USA, No. de catálogo 65-6120) 1:50000, respectivamente, los cuales están conjugados a peroxidasa de rábano (HRP). Los sitios de unión del anticuerpo se revelaron por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA). Para la reacción ECL, a la membrana de NC se le agregaron las soluciones 1 y 2 proporcionadas en el kit, mezcladas en una relación 1:1 durante 5 min y los resultados se registraron en el fotodocumentador ImageQuant LAS 4000. Para el caso del anticuerpo α -tirosina (anticuerpo monoclonal, Invitrogen Life Technologies, No. de catálogo 03-7720), éste está acoplado a HRP, por lo que después de incubarse durante dos horas en una dilución 1:3000, los sitios de unión del anticuerpo se revelaron directamente por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL.

7.3.5 Obtención de polipéptidos y digestión con tripsina

Las proteínas (manchas) separadas por E-2D que mostraron cambios en los niveles de fosforilación fueron cortadas de los geles y se transfirieron a tubos Eppendorf.; el colorante Azul de Coomassie se retiró hasta observar el gel transparente. La digestión de las proteínas se realizó de la siguiente manera: las piezas de poliacrilamida que contienen los polipéptidos se digirieron con una solución de tripsina grado de secuenciación (25 ng/ μ L, Promega, USA) durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se agregó una solución de extracción de proteínas [acetonitrilo w/v (ACN) al 50%/ácido trifluoroacético al 0.5% w/v], las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, se mezclaron por vórtex y se centrifugaron a 14.000 x g durante 30 segundos. El sobrenadante se recolectó y las proteínas digeridas se concentraron/desalaron usando un protocolo de extracción en fase sólida con C18-ZipTips (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Los péptidos se eluyeron en 15 μ l de ACN (w/v) al 50% / ácido trifluoroacético (w/v) al 0.1%

7.3.6 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las muestras digeridas fueron analizadas utilizando el espectrómetro de masa modelo 5800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) en la Universidad de California-Irvine. El espectro MS/MS fue analizado usando el algoritmo Paragon (Protein Pilot Software, Applied Biosystems) contra la base de datos UniProt (UniProtKB)/SwissProt para las especies de *Plasmodium*, además de otras bases de datos para proteínas contaminantes. Los parámetros de búsqueda se ajustaron para residuos de cisteínas alquilados con yodoacetamida. Para la identificación de proteínas se utilizó un intervalo de confianza $\geq 95\%$ (ProtScore Unused > 1,3).

7.3.7 Enriquecimiento de fosfopéptidos con TiO₂

Para la identificación de fosfopéptidos por espectrometría de masas, las proteínas seleccionadas fueron sometidas a enriquecimiento utilizando el kit *Magnetic Titanium Dioxide*

Phosphopeptide Enrichment (Thermo Scientific, Rockford, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las manchas individuales de las proteínas fueron cortadas de los geles E-2D teñidos con Azul de Coomassie, obteniendo cubos de aproximadamente 1 mm³. Cada mancha fue desteñida, reducida, alquilada y digerida en fragmentos peptídicos con tripsina (25 ng/μl; Promega) durante toda la noche a 37 °C. Las piezas del gel que contenían las muestras de péptidos se sometieron a sonicación, centrifugadas y colectado el sobrenadante, concentrándolos y desalándolos, posteriormente fueron eluidos en ACN al 80% /ácido fórmico al 0.1% utilizando columnas HyperSep C18 SPE (Thermo Scientific). Después de la adición del ácido fórmico a una concentración final de 2%, las muestras fueron agregadas directamente a perlas magnéticas de TiO₂, que fueron previamente condicionadas en amortiguador de unión, mezclando cuidadosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 min. El sobrenadante se eliminó y las perlas fueron lavadas con amortiguador de lavado. Las perlas con los fosfopéptidos se resuspendieron en 30 μl de amortiguador de elución y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. El sobrenadante que contenía los péptidos eluidos fue removido, concentrado y suspendido en 5% de ACN/ 1% de ácido fórmico.

7.3.8 Identificación de fosfopéptidos por LC-MS/MS

Los fosfopéptidos se analizaron por LC-MS/MS en un Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), el cual está interconectado con un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento, ultra-nano (Easy nLC, Thermo Scientific) bajo condiciones optimizadas en la Unidad de Proteómica de la Universidad de California-Davis, USA. Para buscar modificaciones de fosforilación, los archivos de espectrometría fueron procesados con el motor de búsqueda X! Tandem y por verificación manual. El X! Tandem se comparó con la base de datos UniProt para *Plasmodium sp.* y secuencias de proteínas contaminantes. El análisis se realizó con una tolerancia de iones masa de 0.40 Da y una tolerancia de iones matriz de 20 PPM (Finoult *et al.*, 2011). Se incluyeron como modificaciones variables especificadas en X! Tandem, la desamidación de asparagina y glutamina, la oxidación de la metionina, la acetilación N-terminal y la fosforilación de la serina, treonina y tirosina; como modificación fija se incluyó la carbamidometilación de los residuos de cisteína. Los sitios fosforilados fueron considerados con un corte de probabilidad

> 75%. Se utilizó UniProt y Gen Ontology para determinar el proceso biológico y función celular de las fosfoproteínas identificadas. Las predicciones de los sitios de fosforilación en serina, treonina y tirosina, y ± 6 aminoácidos circundantes se hicieron mediante el servidor NetPhos 2.0.

7.4 Análisis de algunas fosfoproteínas diferenciales, identificadas durante la gametogénesis de *P. berghei*

7.4.1 Biología molecular

7.4.1.1 Purificación de RNA

Para la obtención de RNA total de todos los estadios del parásito se utilizó el método de extracción con TRIzol (Invitrogen), que es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, siguiendo el protocolo de Simms et al. (1993). El método consistió en concentrar $0.5-1 \times 10^7$ parásitos en tubos Eppendorf de 1.5 ml centrifugando a $5,000 \times g$ durante 5 min. A la pastilla se le agregó 1 ml de TRIzol y se homogenizó suavemente, la suspensión se incubó durante toda la noche a 4°C para disociar los complejos de nucleoproteínas y posteriormente se le agregaron 200 μl de cloroformo. Las muestras se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a $12,000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Al final de la centrifugación se obtuvieron dos fases bien definidas, la capa superior (acuosa) se separó cuidadosamente a fin de no mezclar con la interfase y se trasladó a un tubo nuevo. A la fase acuosa de cada muestra se le agregaron 500 μl de isopropanol frío y se incubó a -20°C toda la noche para precipitar el RNA. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a $12,000 \times g$ durante 10 min a 4°C y el RNA precipitado se lavó con etanol al 75% en agua tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Sigma) al 0.1% por dos veces, centrifugando 5 min a la misma velocidad y temperatura. El precipitado de RNA se dejó secar y se resuspendió en 20 μl de agua DEPC. Una alícuota de 2 μl de RNA se corrió en un gel de agarosa para verificar su integridad, mientras que para la cuantificación del RNA, se midió la densidad óptica a 260 nm de una dilución 1:250 de cada preparación. Para evitar contaminación con DNA que pudiera causar falsos positivos en los experimentos de RT-PCR, el RNA total purificado se trató con Desoxirribonucleasa I (DNAsa 1), grado de amplificación (Invitrogen).

Para este fin, se colocó el volumen suficiente para poner 1 µg del RNA total previamente purificado en un tubo limpio y estéril, se le adicionaron 1 µl del amortiguador de reacción 10x (Invitrogen) y 1 µl de DNAsa I (1 U/ml) y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua tratada con DEPC. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Después, la DNAsa I se inactivó agregando 1 µl de EDTA 25 mM a la reacción y calentando el tubo durante 10 min a 65° C. Para que las sales presentes en el tratamiento con DNAsa no interfirieran en los experimentos de RT-PCR, el RNA se volvió a precipitar con isopropanol y al final se resuspendió en agua-DEPC. Las muestras de RNA se guardaron a -70 °C hasta el momento de su utilización.

7.4.1.2 Ensayo de retrotranscripción – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La reacción de retrotranscripción se efectuó de acuerdo a las indicaciones del proveedor de la enzima SUPERSRIPT II (Gibco BRL, No. de catálogo 18064-014). Esta enzima es una proteína recombinante purificada a homogeneidad a partir de una cepa de *Escherichia coli* que contiene el gen pol del Virus de la Leucemia murina de Moloney, la cual contiene una mutación que le proporciona la ventaja de que carece de la actividad de exonucleasa 5' que posee la enzima nativa. Esto asegura un rendimiento mayor de cDNA y productos de mayor longitud que los producidos por otras transcriptasas inversas.

Para preparar el cDNA se tomaron 5 µg de RNA total y se llevaron a un volumen final de 11 µl en agua DEPC. A esta solución se le agregó 1 µl de la solución 10 µM del oligonucleotido adaptador (AP) (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'), se mezcló suavemente y se colectó la reacción centrifugando levemente. La mezcla se calentó a 70 °C durante 10 min y se enfrió en hielo durante 3 min. La reacción se mantuvo en hielo para agregarle 2 µl del amortiguador 10x de PCR; 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 1 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM y 2 µl de DTT 0.1 M. El contenido del tubo se mezcló suavemente, se incubó 5 min a 42°C y se le agregó 1 µl de la transcriptasa reversa (SUPERSRIPT II, Invitrogen). La mezcla se incubó a 42 °C durante 50 min para la construcción de la primera cadena de cDNA, posteriormente la enzima se inactivó a 70 °C por 15 min. Para eliminar el RNA que sirvió de molde para la elaboración del cDNA, el tubo se centrifugó brevemente a 14,000 x g y se le

agregó 1 µl de RNasa H, se mezcló suavemente y se incubó durante 20 min a 37 °C. El tubo que contenía al cDNA se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su utilización.

7.4.1.3 Oligonucleótidos de la ribonucleótido difosfato reductasa (RNR)

Los oligonucleótidos para amplificar las secuencias de la ribonucleótido difosfato reductasa, subunidad pesada (RNR1) y ligera (RNR2) se diseñaron por análisis *in silico* de las secuencias de genes y/o mensajeros accesibles en las bases de datos correspondientes de *P. berghei* accesible en línea en el sitio PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org/plasmo/>).

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación por PCR de RNR1 y RNR2 fueron: *PbRNR1* sentido 5'-CCC GCT CGA GTA ACG CAA GGA G-3' y *PbRNR1* antisentido: 5'-ATT TGC GGT CGT GGG GTT CCT G-3', que amplificaron un producto de 536 pb; para la amplificación de RNR2, los oligonucleótidos fueron: *PbRNR2* sentido 5'-TTG CAG CAA GTG ATG GAA TAG-3' y *PbRNR2* antisentido 5'-CAT TTA GCA GCC CAT AAT GC-3', que amplificaron un producto de 238 pb.

7.4.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el ensayo de PCR se usó como molde el cDNA construido como se describió anteriormente, se mezclaron 5 µl del amortiguador de PCR; 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM; 1 µl de cada oligonucleótido específico (200 nM); agua destilada hasta completar un volumen de 48 µl y 0.5 µl de Taq DNA polimerasa. A la mezcla se le agregaron 2 µl de la reacción de RT como molde, se mezcló suavemente y se colectó en el fondo del tubo con una centrifugación breve a 14,000 x g. La mezcla se incubó durante 5 min a 95 °C y se realizaron 35 ciclos de PCR utilizando los siguientes tiempos y temperaturas: 30 seg a 95 °C/ 30 seg a 50 °C/ 90 seg a 72 °C. Al final, se incubó durante 5 min a 72 °C. El procedimiento se realizó en un termociclador modelo 2400 (Perkin Elmer, USA). Una alícuota de 20 µl de la reacción se procesó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (50-100 µg/ml) y amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8.0, 1 mM EDTA); los productos de amplificación se observaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta (UV Products,

San Gabriel Ca.). Como controles positivos de la integridad del cDNA se montaron reacciones usando iniciadores específicos para amplificar el gen que codifica para la proteína Pbs21, la cual se sabe está presente sólo en los estadios sexuales del parásito: *Pbs21* sentido 5'-TCA CGG AAT TCA ATT TTA AAT ACA GTT TTA T-3' y *Pbs21* antisentido 5'-AAT TGG TCG ACT TAC ATT ACT ATC ACG TA-3'.

7.4.1.5 Clonación de los fragmentos amplificados

Los productos de la reacción de PCR de RNR1 o RNR2 se clonaron en el vector pCR 4-TOPO 2.1 de (Invitrogen) usando el sistema de ligación de extremos cohesivos A-T dejados por la Taq polimerasa durante la reacción de amplificación (Mead *et al.*, 1991), con el siguiente protocolo:

7.4.1.5.1 Purificación del producto

Como primer paso para la clonación de los productos de PCR, éste se purificó mediante el método de QUIAquick PCR purification kit (QIAGEN). Este protocolo está diseñado para la extracción y purificación de DNA desde 70 pb hasta 10 kb a partir de fragmentos de geles de agarosa estándar o de bajo punto de fusión usados para la separación por electroforesis usando amortiguador TAE (Tris-acetato/EDTA) o TBE (Tris-borato/EDTA). Cuando la cantidad de agarosa pesó arriba de 400 mg se llevó a cabo el proceso de purificación por columnas, también suministradas en el kit. En la práctica, los productos de las reacciones de PCR se separaron por electroforesis en agarosa y una vez que se identificó el producto a clonar, éste se cortó, se pesó, se le agregaron 3 partes de buffer QG (suministrado en el kit) por 1 parte del gel (100 mg~100 µl) y se incubó durante 10 min a 50 °C con agitación cada 2-3 min. Una vez disuelta la agarosa, la solución se colocó en una columna, se centrifugó a 12,000 x g por 1 min y se eliminó la solución que pasó a través de la columna. A la columna se le agregaron 0.5 ml de amortiguador QG y se repitió la centrifugación eliminando el sobrenadante. A la columna se le agregó 0.75 ml de solución PE (suministrada en el kit) para remover trazas de agarosa y de la solución anterior, se incubó durante 5 min, se centrifugó y se descartó la solución que pasó a través de la columna. La columna se colocó en un tubo nuevo y se le agregaron 30 µl de agua, se dejó reposar

5 min y se centrifugó de la misma forma. Para confirmar la presencia de DNA, 3 µl del material obtenido se corrió en un gel de agarosa. El DNA se utilizó posteriormente para experimentos de clonación.

7.4.1.5.2 Ligación en el vector PCR4-TOPO

En este sistema se utiliza el vector pCR4-TOPO 2.1 que es proporcionado por el proveedor en forma lineal con terminaciones cohesivas de Timidina (T) en las cadenas 3' y la topoisomerasa que se encuentra unida al vector en forma covalente. El sistema trabaja con la Topoisomerasa I del virus Vaccinia, la cual se une a la cadena doble de DNA en sitios específicos y rompe la unión fosfodiéster después del sitio 5' CCCTT en una cadena (Shuman, 1991). La energía de la ruptura del fosfodiéster es conservado por la formación de una unión covalente entre el fosfato 3' de la hebra disponible de DNA y un residuo tirosil (Tyr-274) de la Topoisomerasa I. La unión fosfato-tirosil se une a la región 5' hidroxil de la cadena de DNA original disponible, revirtiendo la reacción y liberando la topoisomerasa (Petersen y Shuman, 1997). La reacción se realizó de la siguiente manera: En un tubo de microfuga de 0.5 ml de capacidad se mezclaron 4 µl del producto de PCR purificado (de 10-100 ng), 1 µl de agua estéril y 1 µl del vector pCR4-TOPO (10 ng/µl). La reacción de ligación se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente (22-23 °C) durante 20 min. Una vez terminado este paso, la reacción se mantuvo en hielo y se procedió a transformar bacterias competentes.

7.4.1.5.3 Transformación de bacterias con la construcción pCR4-TOPO

Con la finalidad de amplificar la secuencia RNR1 o RNR2 ligada al vector pCR4-TOPO, se transformaron 50 µl de una suspensión de bacterias *E. coli* competentes químicamente [One Shot. TOP-10F, (Invitrogen)]. Para esto, las células se descongelaron en hielo y se mezclaron con 2 µl de la reacción de ligación. Para evaluar la eficiencia de la transformación se procesó un ensayo control en un tubo aparte, que contenía 50 µl de bacterias competentes y 10 pg de plásmido pUC19 cerrado. Ambas reacciones se incubaron en baño de hielo durante 20 min, se les sometió a un choque térmico por 30 s a 42 °C y se incubaron nuevamente en hielo por 2 min. A cada reacción se le adicionaron 250 µl de medio SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de

levadura, 0.5 g/l de NaCl, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron a 37° C en agitación continua por 1 h. Los cultivos se espatularon sobre cajas Petri con agar LB con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (isopropil-β-D-galactósido, 2 mM), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido, 80 µg/ml). Las cajas se incubaron invertidas a 37° C durante 20 h. La construcción pCR4-TOPO/RNR1 o RNR2 posee el gen de resistencia a ampicilina y las bacterias que lo poseen forman colonias blancas en el medio de selección.

7.4.1.5.4 Purificación de plásmidos (MINIPREP)

Para preparar plásmido purificado se partió de colonias individuales crecidas sobre cajas de Petri preparadas con el antibiótico ampicilina. Se tomaron 10 colonias al azar y cada una se sembró independientemente en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml). Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37° C con agitación constante a una velocidad de 200 rpm. Al día siguiente las bacterias se centrifugaron durante 10 min a 5,000 x g a 4 °C, se resuspendieron en solución STE (NaCl 0.1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) y se centrifugaron nuevamente. La pastilla formada en cada uno de los tubos, se resuspendió en 200 µl de solución I fría (Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM) y se le agregó 400 µl de la solución II recién preparada (200 µl de NaOH 10 N y 500 µl de SDS 20% en un volumen final de 10 ml). Los tubos se mezclaron invirtiéndolos cinco veces, se incubaron en hielo por 10 min e inmediatamente se les agregó 300 µl de solución III fría (60 ml de acetato de potasio 5 M; 11.5 ml de ácido acético; 28.5 ml de agua). Los tubos se agitaron en el vórtex durante 10 s, se colocaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se colectaron y se colocaron en tubos nuevos, se les agregó 10 µl de RNAsa A (10 mg/ml) y se incubaron durante 20 min a 68 °C. Posteriormente, a cada tubo se les agregó una décima parte de CTAB (CetylTrimethylAmmonium Bromide) (Sigma) disuelto al 5% en una solución de NaCl 0.5 M, los reactivos se mezclaron suavemente, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 10 min a 4 °C a 12,000 x g. Cada una de las pastillas se resuspendieron en 300 µl de NaCl 1.2 M, se les agregó 750 µl de etanol absoluto y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4° C. El botón se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 20 µl de agua estéril. La integridad del plásmido se analizó corriendo 2 µl de la preparación final en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

De este material se tomó una alícuota para confirmar la presencia del inserto de la RNR 1 y RNR2 por medio de restricción enzimática. Para este fin, se utilizó a la enzima de restricción *EcoR I* que corta a ambos lados del sitio de inserción del producto de PCR. Para esto se siguió el siguiente protocolo: En un tubo se mezclaron aproximadamente 4 µg de DNA plasmídico; 2 µl del amortiguador de restricción 10x; 2 U de *EcoR I* y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua estéril. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante toda la noche y se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (50-100 µl /ml) y amortiguador TAE 1x, y los productos de la restricción se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

7.4.1.6 Secuenciación de los fragmentos clonados

Los productos clonados en el vector pCR4-TOPO se secuenciaron en ambas direcciones para obtener su secuencia completa, utilizando un sistema de Secuenciación por ciclos de amplificación con AmpliTaq DNA polimerasa FS (Perkin Elmer, No. de Cat. 4303149). Para la reacción se utilizó el kit de secuenciación Big Dye versión 1.1., que amplifica fragmentos de DNA con un alto contenido de A-T. Las reacciones individuales de secuencia se prepararon con los siguientes reactivos: 1 µg de DNA de plásmido, 10 pmol de iniciador M13 en sentido 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' o en antisentido (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') y 8 µl de la mezcla de reacción del kit, en un volumen final de 20 µl. Estas reacciones se sometieron a 20 ciclos de amplificación, de 94° C por 1 min, 50° C por 1 min y 72° C por 1.5 min. Los productos de la reacción se purificaron por precipitación con isopropanol a una concentración final de 60% y se secuenciaron en un sistema de lectura automática de secuencia (ABI Prism, modelo 310), en el Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos.

Las secuencias de DNA de la RNR1 y RNR2 se analizaron en los programas que se encuentran disponibles en el portal de internet de San Diego Supercomputing Center., <http://workbench.sdsc.edu>. Alternativa y/o complementariamente estos programas y bases de datos se consultaron en el portal de internet del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América: <http://ncbi.nlm.nih.gov>, así como en la base de datos PlasmDB.

7.4.2 Ensayos funcionales

7.4.2.1 Inibición de la ribonucleótido difosfato reductasa con hidroxiurea (HU), durante la gametogénesis de *P. berghei*

Para conocer el papel de la RNR durante la gametogénesis del parásito, se realizó un ensayo de inibición de ésta enzima, que consistió en: gametocitos purificados se resuspendieron en medio RPMI 1640 pH 7.4 y se incunaron a 37°C, esto para prevenir la activación de los gametocitos. Se hicieron alícuotas del medio en tubos Eppendorf, a los cuales se les adicionaron diferentes concentraciones de HU (50 mM, 75 mM y 100 mM), posteriormente los tubos se incubaron durante 1 h, bajo estas mismas condiciones. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 12,000 x g, durante 2 min y la pastilla se resuspendió en medio RPMI 1640 pH 8.3, y se incubaron a 21°C durante 10 a 15 minutos para inducir la gametogénesis. A continuación se tomó una gota del cultivo, se colocó en un portaobjetos, sobre ella se colocó un cubreobjetos que debía contener vaselina en sus cuatro bordes para crear una cámara con capacidad de aproximadamente 10 µl. La formación de centros de exflagelación se contó en el microscopio de contraste de fases. Los experimentos se hicieron por triplicado.

7.4.2.2 Inibición de la gametogénesis de *P. berghei* con un anticuerpo anti-tubulina

Para conocer la participación de la tubulina en la gametogénesis del parásito, se realizó un ensayo de inibición de la proteína, que consistió en: gametocitos purificados se resuspendieron en diferentes alícuotas de medio RPMI 1640 pH 8.3 que contenían diferentes concentraciones del anticuerpo anti-tubulina (50 µg/ml, 75 µg/ml o 100 µg/ml). Posteriormente, los tubos se incubaron a 21°C para inducir la diferenciación del parásito, estos se incubaron durante 24 h, posteriormente los tubos se centrifugaron a 12,000 x g, durante 2 min; de la pastilla formada se tomaron 2 µl de sangre y se prepararon frotis teñidos con Giemsa para el conteo de oocinetos, para que de ésta manera se midiera el efecto del anticuerpo. Como control se utilizó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (IgG2b). Los experimentos se hicieron por duplicado

7.4.2.3 Localización de la tubulina durante la gametogénesis de *P. berghei*

Para conocer la localización de la tubulina durante la gametogénesis de *P. berghei* se realizó una inmunofluorescencia. Para esto, gametocitos o gametos purificados se colocaron en una laminilla, dejándolos sedimentar durante 30 min a 19-21°C, se les retiró el exceso de solución y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min en cámara húmeda. Ya fijados, los parásitos se lavaron con PBS y se almacenaron a -20°C para su posterior uso. Para el ensayo de inmunofluorescencia, una laminilla que contenía a los gametocitos o gametos fijados, se bloqueó con suero normal de chivo al 20% toda la noche a 4°C, se retiró la solución, los parásitos se permeabilizan con Triton X-100 al 0.2% por 15 min, finalmente se agregó el anticuerpo monoclonal anti-tubulina en una dilución 1:50 (diluído en PBS 1x) y se incubó durante 2 h. La laminilla se lavó 5 veces con PBS. El segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína (Alexa 488) se le agregó en una dilución de 1:500, se incubó durante 2 h y la laminilla se lavó de forma similar que la anterior. La preparación fue cubierta con una solución anti apagamiento [Vectashield con DAPI, (Vector Lab. Burlingame, CA, USA)] que se usó para teñir núcleos y sellar las laminillas. Las laminillas se analizaron por microscopía con focal (Leica, DMLS). Los experimentos se hicieron por triplicado.

VIII.RESULTADOS

8.1 Análisis de proteínas durante la gametogénesis de *P. berghei*

Las proteínas de gametocitos y gametos diferenciados utilizando medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 20% fueron separadas mediante E-2D y se observó que en gametos existe la presencia y aumento de un grupo de proteínas de aproximadamente 70-75 kDa y un pI de entre 5-7, las cuales difieren de las de gametocitos; sin embargo, estos cambios podrían representar proteínas contaminantes, derivadas del medio RPMI 1640 suplementado con SFB (figura 3A y B). Para conocer si las proteínas diferenciales que se observaron en gametos eran derivadas del SFB adicionado al medio RPMI 1640, proteínas de SFB fueron precipitadas y separadas por E-2D y se encontró que el grupo de proteínas observado en gametos se encuentra muy abundante en las proteínas del SFB, lo que indicó que las proteínas diferenciales observadas en realidad son contaminantes derivadas del SFB (figura 3C).

8.2 Diferenciación de gametocitos de *P. berghei* en ausencia de SFB

Debido a que la presencia de proteínas contaminantes derivadas del SFB interfería con el análisis de las proteínas durante la gametogénesis de *P. berghei*, el protocolo de diferenciación *in vitro* fue modificado haciéndolo en medio RPMI 1640 en ausencia de SFB. Para conocer si la ausencia de SFB afectaba la diferenciación del parásito *in vitro*, se midió el porcentaje de diferenciación a gametos y a oocinetos en ausencia de SFB, observando que ésta condición no afecta la gametogénesis, ni el desarrollo a oocinetos, ya que ambas fases mostraron el mismo porcentaje de diferenciación que los parásitos tratados con RPMI 1640 suplementado con SFB (figura 4).

Finalmente, proteínas de gametos diferenciados en medio RPMI 1640 sin SFB fueron separadas por E-2D, encontrando que muchas proteínas que provenían de la contaminación por parte de las proteínas del SFB, ya no estaban presentes en estas condiciones (figura 3d). Además, los perfiles de proteínas observados en gametos y gametocitos fueron muy parecidos entre sí, con algunos cambios en la abundancia de varias proteínas que se mencionarán más adelante.

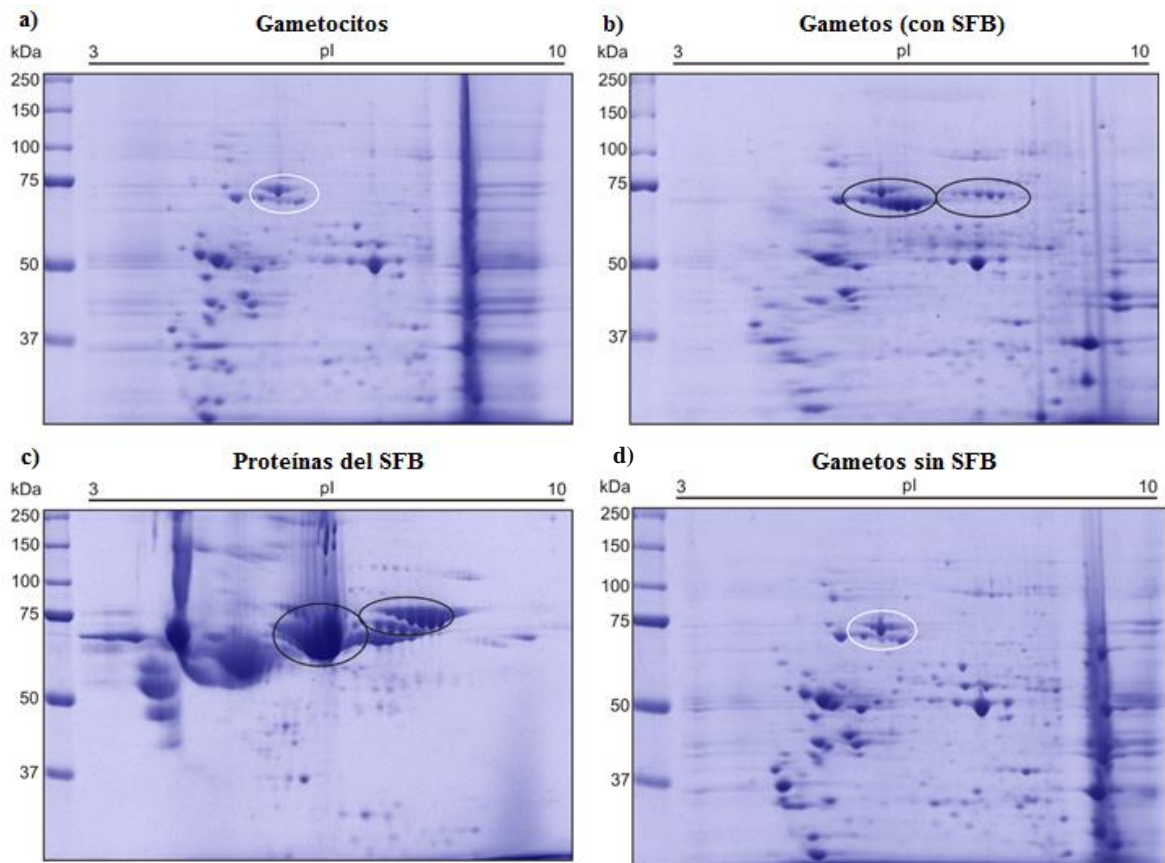


Figura 3. Análisis de proteínas durante la gametogénesis de *P. berghei*. Proteínas obtenidas de fases sexuales de *P. berghei* fueron separadas por electroforesis bidimensional por su pI, en tiras pre-echas con un rango de pH 3-10 NL, para posteriormente separarlas por peso molecular en geles de SDS-PAGE al 10%. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. a) Proteínas de gametocitos; b) Proteínas de gametos, diferenciados en medio RPMI 1640 suplementado con SFB; c) Proteínas del SFB precipitadas, d) Proteínas de gametos diferenciados en medio RPMI 1640 sin SFB. Los círculos negros en gametos (b), muestran la presencia y aumento de un grupo de proteínas de aproximadamente 70-75 kDa y un pI de entre 5-7, las cuales eran proteínas contaminantes derivadas del SFB (c). Los círculos blancos muestran las proteínas que provenían de la contaminación por parte de las proteínas del SFB, ya no estaban presentes en los gametos diferenciados en estas condiciones (d). Los ensayos se hicieron por triplicado.

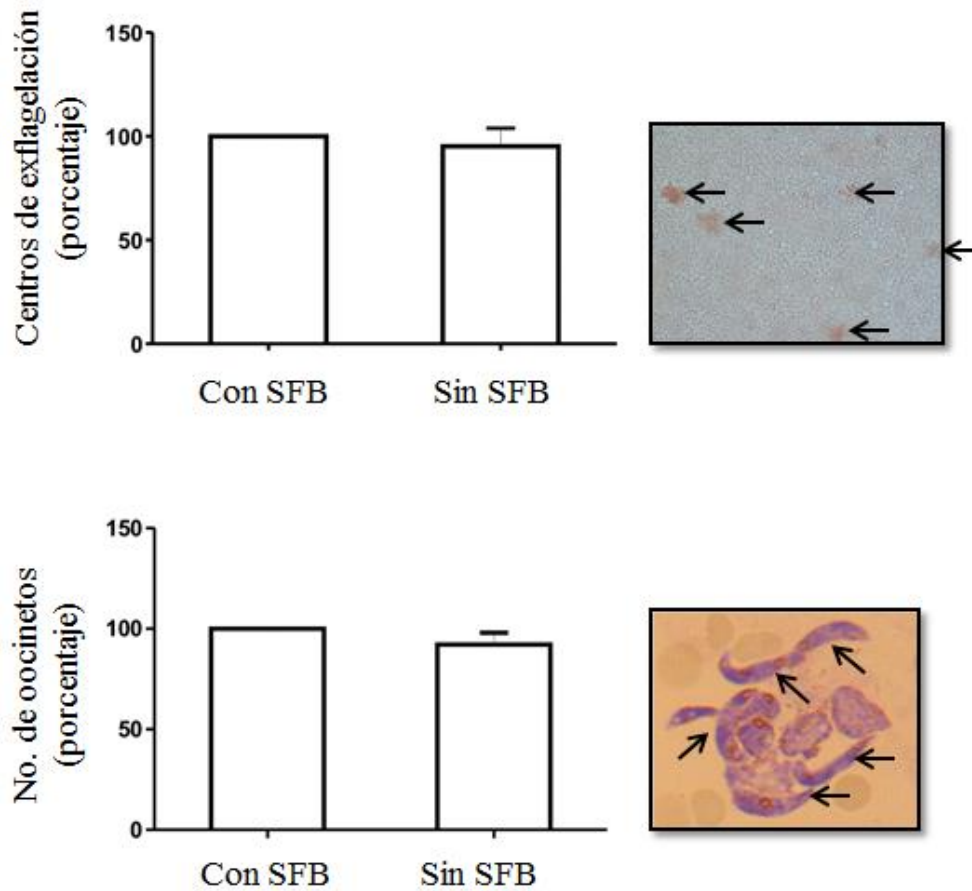


Figura 4. Diferenciación de gametocitos de *P. berghei* en ausencia de SFB. Gametocitos purificados se incubaron en medio RPMI 1640 sin SFB a 19°C. Un alícuota de gametocitos fue incubado durante 15 minutos, después de ese tiempo se contaron los centros de exflagelación como indicadores de gametogénesis; otro alícuota de gametocitos fueron incubados por 24 horas, posteriormente se midió el porcentaje de diferenciación a oocinetos. La formación de centros de exflagelación se contó en el microscopio de contraste de fases; los oocinetos fueron teñidos con Giemsa. Los porcentajes de diferenciación fueron comparados con parásitos incubados en medio RPMI 1640 con SFB. Las flechas en la fotografía superior indican los centros de exflagelación y en la inferior los oocinetos. Las barras de dispersión indican la desviación estándar de 5 experimentos independientes.

8.3 Análisis de proteínas fosforiladas durante la gametogénesis de *P. berghei*

Para determinar los cambios en la fosforilación de proteínas durante la gametogénesis de *P. berghei*, proteínas de gametocitos y gametos diferenciados durante 15 min en medio RPMI 1640 sin SFB fueron separadas por E-2D. Primeramente, proteínas totales de gametocitos y gametos se tiñeron con ProQ Diamond, un colorante que tiñe fosfoproteínas totales. Se observaron aproximadamente 130 proteínas fosforiladas en gametocitos y 120 en gametos. De forma interesante, en gametos se observó un grupo de proteínas de aproximadamente 100 kDa formando una línea horizontal con un rango de pI entre 5.2 a 6.5, en comparación a lo que ocurre en gametocitos, donde este grupo de proteínas abarcó un rango de pI más básico entre 5.8 a 7.0 (figura 5). Como punto de referencia de este cambio de migración se tomó una mancha de 50 kDa y pI 6.2 (línea blanca vertical en la figura 5, paneles superiores).

Por otra parte, para completar el análisis de las proteínas totales, los geles teñidos con ProQ Diamond, fueron re-teñidos con Sypro Ruby, un colorante de alta sensibilidad que tiñe proteínas totales. Aproximadamente 710 proteínas fueron observadas, con un peso molecular de 20 a 200 kDa. Varias proteínas mostraron variación en abundancia, entre ellas un grupo de aproximadamente 25 kDa/pI 3.8, 45 kDa/pI 5.5, 46 kDa/pI 6.0, 47 kDa/pI 7.0 y 50 kDa/pI 4.9, las cuales estaban presentes en los gametocitos y ausentes en los gametos (figura 5, paneles inferiores; flechas negras en gametocitos y círculos blancos en los gametos).

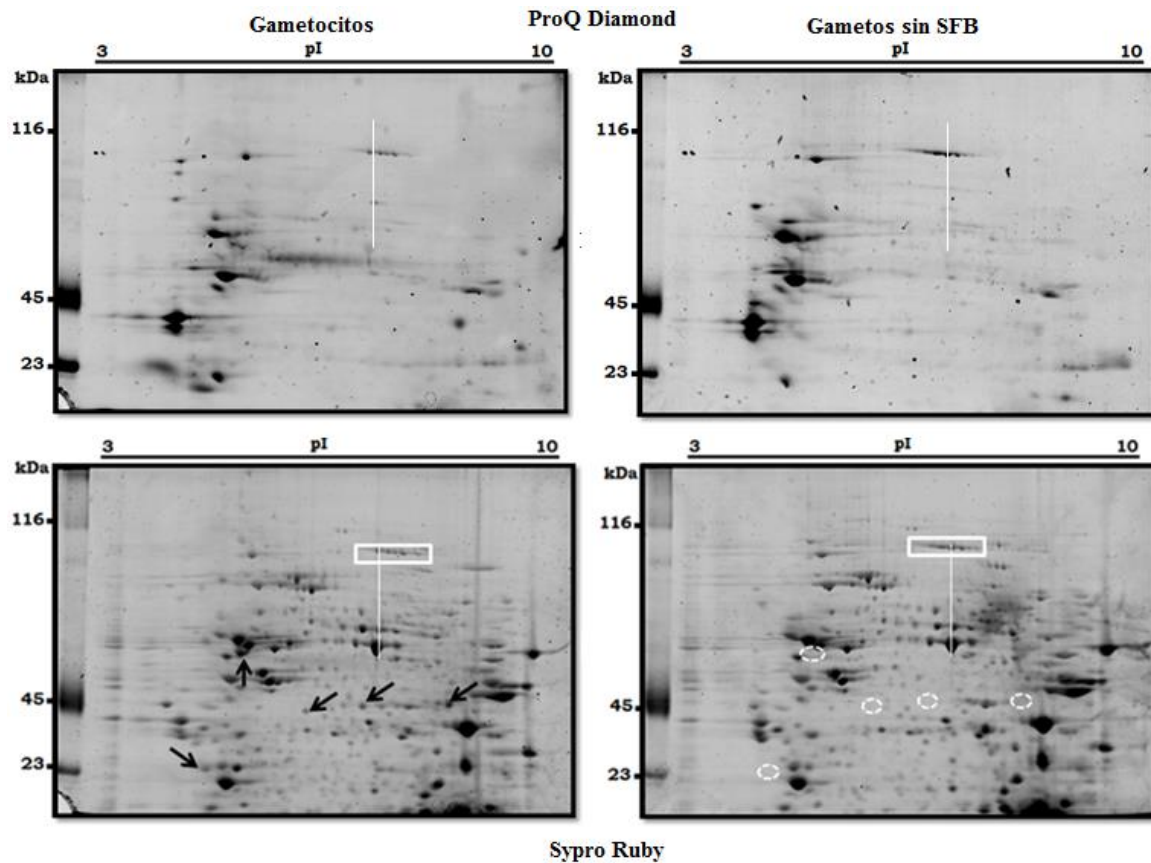


Figura 5. Análisis de fosfoproteínas totales durante la gametogénesis de *P. berghei* en ausencia SFB. Proteínas de gametocitos y gametos obtenidas en ausencia de SFB, fueron separadas mediante 2-DE en tiras prefabricadas, por su pI ó IEF (pH 3-10 NL, 7 cm) y peso molecular (SDS-PAGE al 10%). Para visualizar fosfoproteínas totales, los geles fueron teñidos con ProQ Diamond (panel superior); posteriormente, para visualizar proteínas totales, los geles fueron teñidos con Sypro Ruby (panel inferior). Las flechas negras indican la expresión diferencial de proteínas presentes en gametocitos, los ovalos blancos indican la ausencias de estas proteínas en la fase de gametos. El recuadro y línea blanca, señalan un grupo de proteínas de aproximadamente 100 kDa que cambian su punto isoelectrico dependiendo de la fase, en gametocitos estas proteínas tienen un pI más básico en comparación a la fase de gametos.

El análisis de las proteínas fosforiladas se llevó a cabo siguiendo la estrategia de separar las proteínas por E-2D, seguido de Western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra aminoácidos fosforilados en serina, treonina o tirosina. El análisis reveló aproximadamente 75 proteínas fosforiladas en Ser/Thr/Tyr con un rango de 20-100 kDa (Figura 6).

De manera interesante, el anticuerpo policlonal anti-fosfoserina (α -pSer), detectó un grupo de proteínas de 100 kDa/pI 5.2-7.0 que en los geles teñidos con ProQ Diamond se observó que cambian su pI durante la gametogénesis, este grupo de proteínas mostró un aumento en su fosforilación en la fase de gametos (figura 6, panel superior derecho, puntos 3 y 4). Otras proteínas que se observaron fosforiladas en serina son las de 110 kDa/pI 4.8 y 70 kDa/pI 5.5, que se observan principalmente fosforiladas en gametocitos (panel superior izquierdo, puntos 1 y 2, respectivamente).

La fosforilación en treonina se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotreonina (α -pThr) (figura 6, paneles intermedios); entre las proteínas fosforiladas en treonina, se encuentran dos de aproximadamente 50 kDa con un pI de 4.6 y 4.8 (puntos 5 y 6), y con un pI de 6.2 (punto 8), las cuales se detectaron con mayor intensidad en la fase de gametos; el punto 9 (pI 6.5) se detectó ligeramente en gametos y está ausente en gametocitos. En gametos se detectaron proteínas de aproximadamente 37 kDa con pI de 6.6 y 6.7 (puntos 12 y 13); además dos polipéptidos de aproximadamente 45 kDa con pI de 5.2 y 5.3 (puntos 10 y 11, respectivamente) que fueron detectados con mayor intensidad en la fase de gametocitos (paneles intermedios).

La fosforilación en tirosina se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (α -pTyr) (paneles inferiores). Se observaron proteínas de 55 kDa con pI de 6.0 y 6.2 (puntos 14 y 15, respectivamente), el punto 14 mostró mayor intensidad en gametos, mientras el punto 15 disminuyó su intensidad en esta misma fase. Otra proteína de aproximadamente 55 kDa con pI de 4.9 (punto 16) reaccionó intensamente en gametos. Además, dos manchas de alrededor de 30 kDa con pI 5.6 y 5.7 (puntos 17 y 18) mostraron mayor intensidad en gametocitos que en gametos.

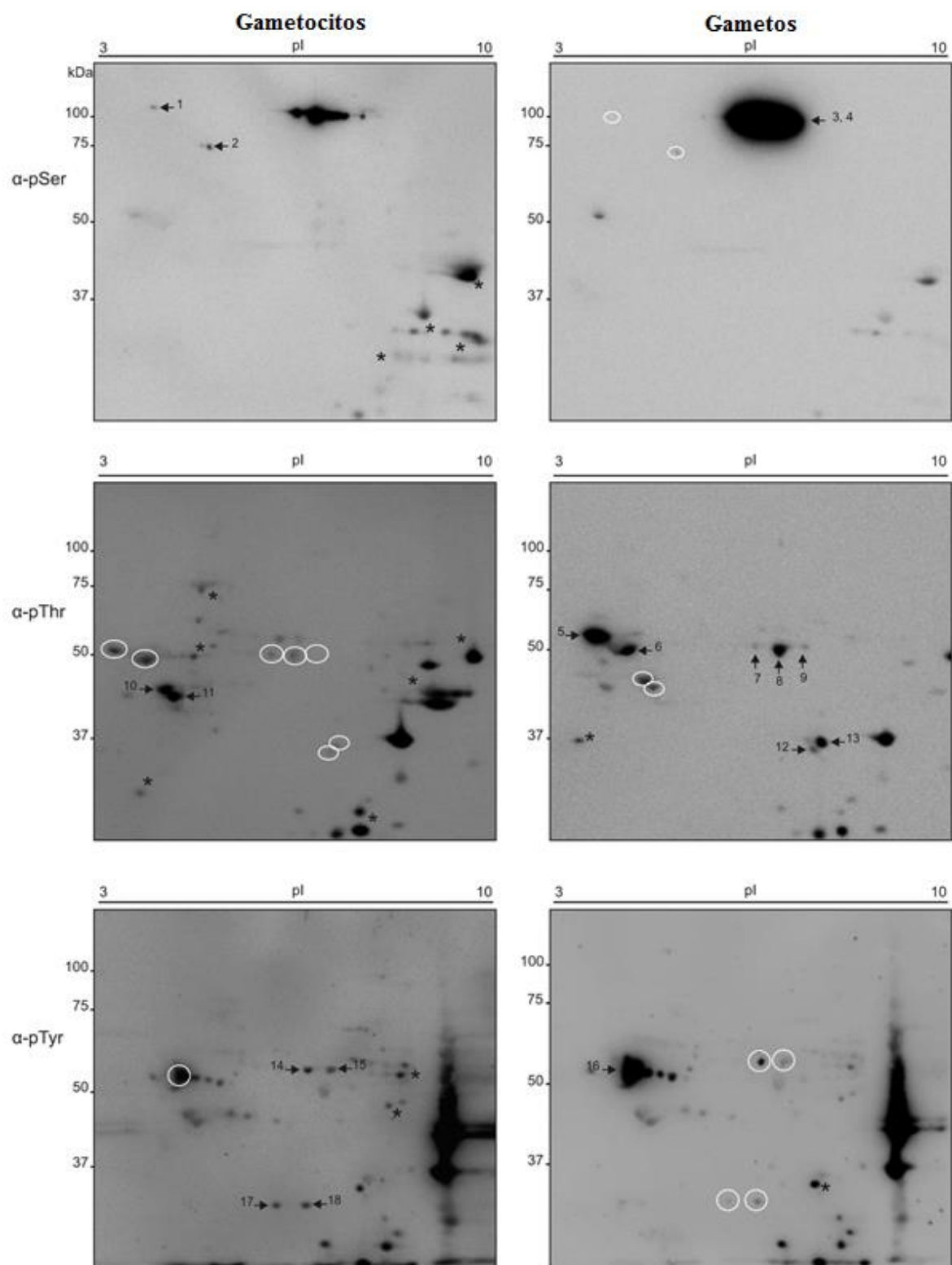


Figura 6. Proteínas fosforiladas durante la gametogénesis. Proteínas de gametocitos y gametos fueron separadas por E-2D, transferidas a membranas de nitrocelulosa y analizadas por Western blot. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos que reconocen específicamente residuos fosforilados en Ser, Thr o Tyr. El panel superior corresponde a las proteínas fosforiladas en Ser, el panel intermedio a las proteínas fosforilaciones en Thr y el panel inferior a las fosforilaciones en Tyr. Las fechas y números negros indican las proteínas que aumentaron su fosforilación, las cuales se identificaron por espectrometría de masas en tándem, los óvalos blancos indican la disminución en la fosforilación de las proteínas identificadas. Los asteriscos indican cambios de fosforilación que no fueron identificados por MS.

8.4 Identificación de fosfoproteínas por MS/MS

Dieciocho puntos que cambiaron su nivel de fosforilación durante la gametogénesis se analizaron mediante MS en tándem (Tabla 1). Se identificaron veintitrés proteínas (figura 7), dentro de las que se encontraron, cinco proteínas de estrés: endoplasmina putativa, proteína de choque térmico 70 (HSP-70), dos subunidades beta de la proteína del complejo T putativa (TPC-beta) y un precursor de la disulfuro isomerasa (PDI); cuatro proteínas involucradas en la síntesis de DNA: dos isoformas de la subunidad pesada de la ribonucleótido reductasa (RNR), la proteína MSI1 con repetidos WD-40 y la proteína de unión a histona n1/n2; seis proteínas del citoesqueleto: la alfa, beta y gama tubulina y la actina, actina-1 y actina-2; tres proteínas de señalización: la proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), el receptor para activar a la cinasa c putativa (RACK1) y dos isoformas de la proteína ArfGAP; tres proteínas metabólicas: tres isoformas de la enolasa; y una proteína ribosomal. Además, una proteína identificada como no caracterizada, que tiene 99% de identidad con la nucleasa p1/s1 de *P. berghei* (gi:675227026).

Diez de las proteínas identificadas mostraron un aumento en la fosforilación en la fase de gametocitos, incluyendo: endoplasmina (HSP90), HSP70, actina-1, actina-2, proteína de unión a histona n1/n2, una subunidad beta de la proteína del complejo T y las dos isoformas de la proteína ArfGAP. Adicionalmente, diez proteínas fosforiladas mostraron mayor intensidad en gametos: dos isoformas de la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa, la proteína MSI1 con repetidos WD-40, las isoformas α y β tubulina, dos isoformas de la enolasa, la proteína G, la nucleasa p1/s1 y, una subunidad beta de TPC. En la figura 8 se indican las proteínas que cambiaron su nivel de fosforilación y fueron identificadas por MS/MS.

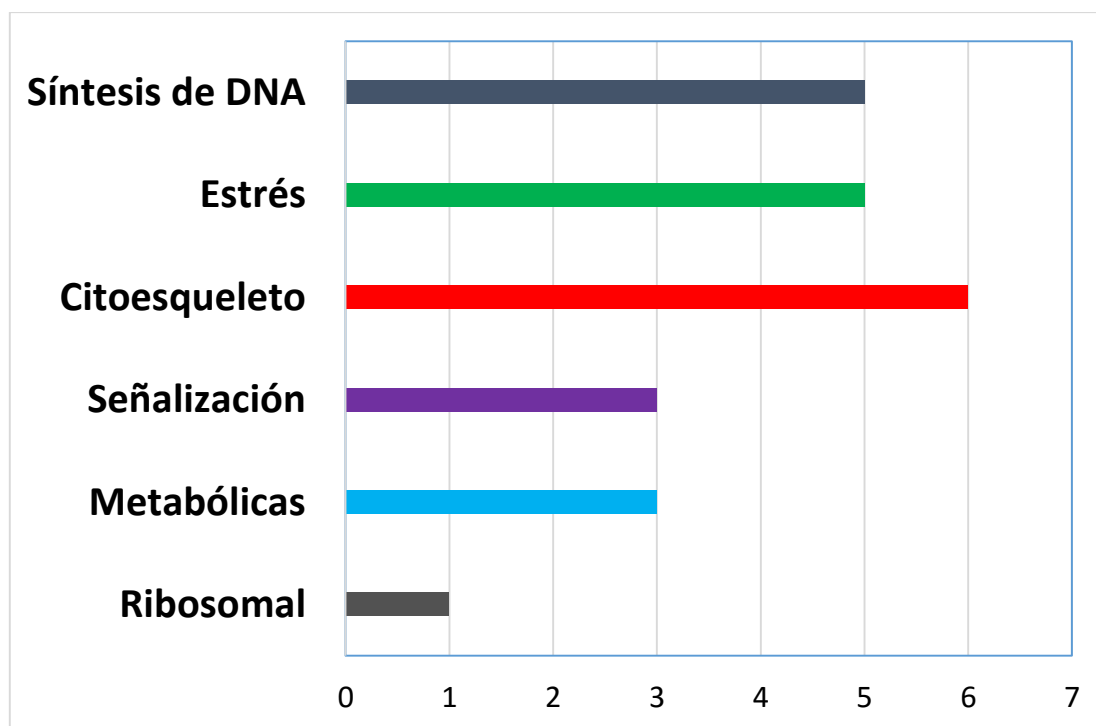


Figura 7. Función de las fosfoproteínas identificadas en *P. berghei*. Todas las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos anti-pSer, anti-pThr o anti-pTyr. Las categorías de función biológica de las proteínas identificadas se determinaron utilizando la base de datos PlasmoDB, tomando las anotaciones del Gene Ontology.

Tabla 1. Proteínas identificadas que cambian su nivel de fosforilación durante la gametogénesis de *P. berghei*

Num spot	Num acces. NCBI	Score ^a	Proteína [especies]	Péptidos/ % covert.	MW/pI teórico	Residuos fosforilados/fase
1	gi 675229094	17.88	Endoplásmica, putativa [<i>P. yoelii</i>]	8/31.4	93.24/5.31	S/Gametocitos
2	gi 74935931	24.67	Proteína de choque térmico 70 [<i>P. berghei</i>]	12/25	75.14/5.51	S/Gametocitos
3	gi 68070011	1255 ^b	Ribonucleótido difosfato reductasa, subunidad grande [<i>P. berghei</i>]	34/42	97.05/6.97	S/Gametos
4	gi 68070011	1188 ^b	Ribonucleótido difosfato reductasa, subunidad grande [<i>P. berghei</i>]	29/39	97.05/6.97	S/Gametos
5	gi 75011989	10.43	Proteína msi1 con repetidos Wd-40 [<i>P. yoelii</i>]	5/16.6	50.70/4.92	S, T/Gametos
6	gi 67649703	419	Alfa tubulina [<i>P. berghei</i>]	12/30	50.48/4.90	T/Gametos
	gi 68070467	325	Precursor disulfuro isomerasa [<i>P. berghei</i>]	8/17	55.72/5.44	
7	gi 74987958	8.69	Enolasa [<i>P. berghei</i>]	4/23	49.02/6.10	T/Gametos
8	gi 74987958	22.84	Enolasa [<i>P. berghei</i>]	12/45.5	49.02/6.10	T/Gametos
	gi 74929959	2.98	Gama tubulina [<i>P. falciparum</i>]	1/5.3	51.64/6.04	
9	gi 74987958	10.95	Enolasa [<i>P. berghei</i>]	5/26.5	49.02/6.10	T/Gametos
10	gi 74882334	23.19	Actina-1 [<i>P. yoelii</i>]	14/44.7	41.88/5.21	T, Y/Gametocitos
	gi 74989223	55.59	Actina-2 [<i>P. berghei</i>]	3/11	42.65/5.07	
11	gi 121959609	19.68	Actina [<i>P. berghei</i>]	8/39.4	41.90/5.05	T/Gametocitos
	gi 75012030	1.52	Proteína de unión a histona n1/n2 [<i>P. yoelii</i>]	1/3.3	38.67/4.82	
12	gi 74979254	15.05	Proteína de unión a nucleótidos de guanina, putativa [<i>P. chabaudi</i>]	7/40.6	35.72/6.34	T/Gametos
13	gi 74985398	14.81	Proteína no caracterizada [<i>P. berghei</i>]	7/45.4	38.79/6.30	T/Gametos
	gi 74843605	9.37	Fosfoproteína ribosomal P0 [<i>P. berghei</i>]	2/24.1	34.86/6.17	
14	gi 74878250	5.25	Subunidad beta de la proteína del complejo T, putativa (Fragmento) [<i>P. yoelii</i>]	2/11.8	59.35/5.87	Y/Gametocitos
15	gi 74976730	21.68	Subunidad beta de la proteína del complejo T, putativa [<i>P. chabaudi</i>]	12/38.9	58.93/5.83	Y/Gametocitos
16	gi 74879261	33.86	Beta tubulina [<i>P. yoelii</i>]	22/60.7	49.78/4.76	Y/Gametos
17	gi 68073955	651 ^b	Proteína ArfGAP [<i>P. berghei</i>]	14/50	33.05/6.09	Y/Gametos
18	gi 68073955	695 ^b	Proteína ArfGAP [<i>P. berghei</i>]	15/59	33.05/6.09	Y/Gametos

^aLos espectros MS/MS se analizaron utilizando el algoritmo Paragon contra la base de datos Uniprot/SwissProt. ^bLos archivos de datos Braw fueron procesados con el software MassLynx ProteinLynx y MASCOT usando la base de datos NCBI para especies de *Plasmodium*.

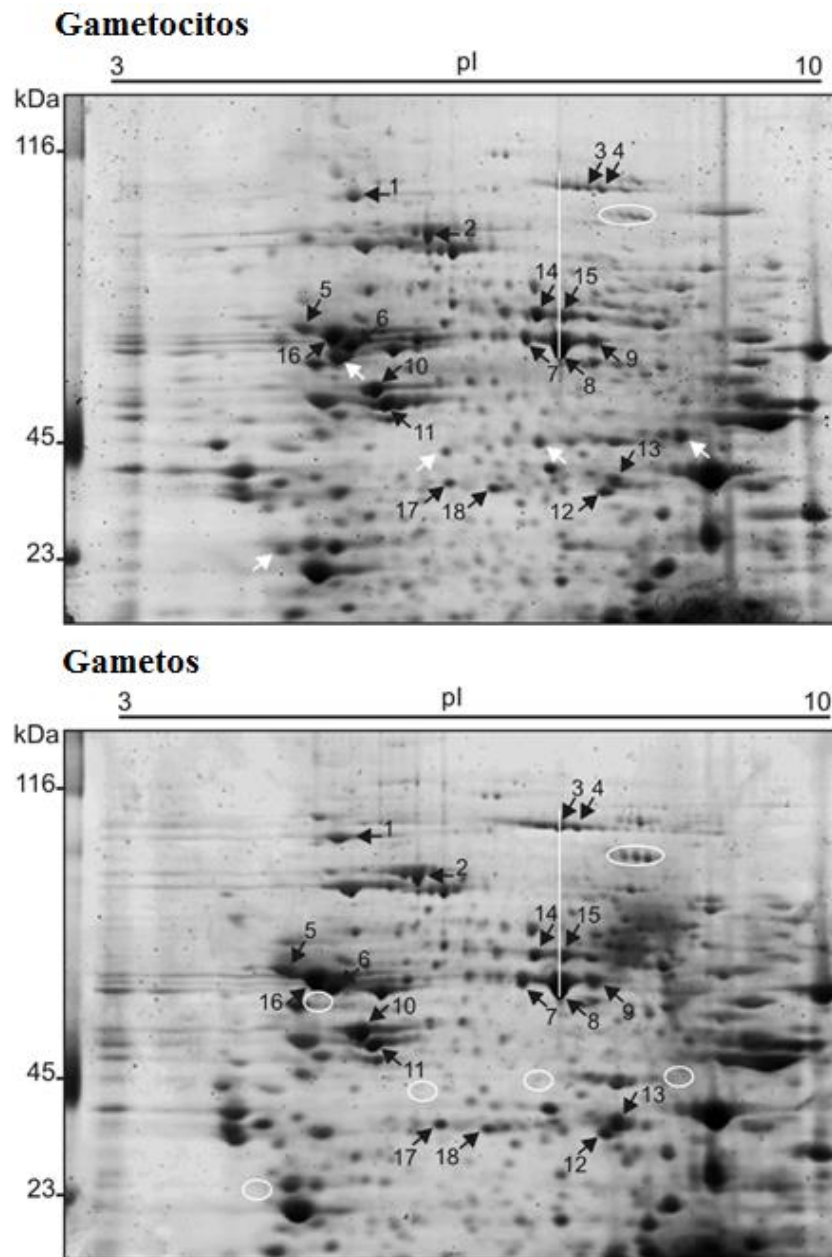


Figura 8. Proteínas totales y fosfoproteínas identificadas durante la gametogénesis. Las proteínas de gametocitos y gametos obtenidas en ausencia de SFB fueron separadas mediante E-2D por su pI ó IEF (pH 3-10, NL) y peso molecular (SDS-PAGE al 10%). Los geles fueron teñidos con Sypro Ruby. Las flechas negras indican las proteínas que cambiaron su fosforilación, observada mediante WB (figura 6). Las flechas blancas indican el aumento en la expresión de otras proteínas durante la gametogénesis del parásito, los óvalos blancos indican la ausencia de esas proteínas en la fase de gametos.

8.5 Identificación de sitios fosforilados por enriquecimiento de fosfopeptidos-TiO₂ Y LC-MS/MS

Para identificar a detalle los sitios de fosforilación en seis de las fosfoproteínas identificados con los anticuerpos anti-pSer, anti-pThr y anti-pTyr, por medio de espectrometría de masas en tándem, se realizó el enriquecimiento de fosfopéptidos mediante el uso de microesferas magnéticas unidas a dióxido de titanio. De las seis fosfoproteínas seleccionadas para este análisis, la HSP70 y RNR (las dos isoformas) se encuentran fosforiladas en serina en ambos métodos (Tabla 2). La proteína MSI1 se encontró fosforilada en serina y treonina en el análisis por WB, al igual que por espectrometría de masas. La enolasa mostró fosforilación en treonina por WB, sin embargo por MS/MS se encontró un sitio de fosforilación en serina. Asimismo, la actina se encontró fosforilada en treonina y tirosina en el análisis por WB pero por espectrometría de masas sólo se detectaron residuos fosforilados en tirosina.

Tabla 2. Sitios fosforilados de fosfoproteínas identificadas durante la gametogénesis

Num. proteína	Proteína	pRes 2D/WB	Fosfopéptidos	Sitio pRes	Posición en la proteína	XCorr	Carga	MH+ [Da]
2	HSP70	S	sGIEEKPMIEVVYQGEK	S1	S106	2.82	3	2032.9561
			sVtsILEWLEKNQLAGKDEYEAK	S1 S4 T3	S585 S588	2.69	3	2731.3159
3	RNR1	S	LPsSSEGDQLK	S3	S10	3.90	2	1240.5470
			RLPsSSEGDQLKK	S4 S5	S10 S11	3.06	3	1525.7234
			TDsGKIFDDGIKR	S3	S22	3.62	3	1531.7165
			KTDsGKIFDDGIK	S4	S22	3.06	2	1503.7091
			TPsGKPIQTMVVLNR	S3	S35	3.66	3	1801.8552
			RTPsGKPIQTMVVLNR	S4	S35	3.86	3	1957.9592
			EVsREtIstEsTVTQNACPLR	S3 S8 S11	S817 S822 S25	2.44	3	2459.1161
				T6 T9	T820 T823			
4	RNR1	S	LPsSSEGDQLKK	S3	S10	3.15	2	1368.6400
			RLPsSSEGDQLKK	S4	S10	2.67	2	1524.7405
			TDsGKIFDDGIK	S3	S22	3.33	2	1375.6132
			KTDsGKIFDDGIK	S4	S22	5.25	3	1503.7083
			TPsGKPIQTMVVLNR	S3	S35	3.60	2	1800.8707
			RTPsGKPIQTMVVLNR	S4	S35	1.81	3	1958.9339
			EVsREtIstESTVTQNaPLRR	S3 S8	S817 S822	1.99	3	2614.2261
				T6 T9	T820 T823			
5	msi1-WD40	T	RKsNALDEACLELSEEPtNEEIMK	S3 T18	S12 T27	2.10	3	2903.2699
8	Enolasa	T	IEEsLGANGSFAGDK	S4	S429	2.18	2	1575.6497
10	Actina-1 Actina-2	T	EEyDESGPSIVHR	Y3	Y363	2.65	2	1597.6529
			EEyDESGPSIVHR	Y3	Y363	2.65	2	1597.6529

Los fosfopéptidos se enriquecieron mediante el uso de microesferas magnéticas unidas a TiO₂. S, T and Y se refieren a serina (Ser, S), treonina (Thr, T) y tirosina (Tyr, Y). s, t and y se refieren a las formas fosforiladas.

8.6 Estudio de algunas proteínas que cambiaron su fosforilación durante la gametogénesis en *P. berghei*

8.6.1 Ribonucleótido difosfato reductasa en la gametogénesis de *P. berghei*

8.6.1.1 Expresión durante en ciclo de vida del parásito

Una de las proteínas que mostraron cambios dramáticos en su movilidad en relación al pI de sus isoformas y en sus niveles de fosforilación en residuos de serina durante la gametogénesis, fue la enzima ribonucleótido difosfato reductasa (RNR) (figuras 6 y 8, puntos 3 y 4).

La RNR es una enzima heterotetramérica compuesta de dos subunidades pesadas (RNR1) y dos subunidades ligeras (RNR2); éste complejo heterotetramérico participa en la síntesis de DNA, catalizando la formación de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP's). En *Plasmodium*, la síntesis de DNA es importante para que se pueda dar la gametogénesis del macho, y la RNR pudiera estar participando en éste proceso.

En éste trabajo se analizó la participación de la RNR durante la gametogénesis de *P. berghei*, para esto, primeramente se analizó la expresión del RNAm de las dos subunidades, RNR1 y RNR2. A partir de cDNA se amplificaron fragmentos de la RNR1 y RNR2, utilizando los oligonucleótidos descritos en la sección de materiales y métodos. Para el caso de la RNR1 se amplificó un producto de 536 pb, y para RNR2, un productos de 238 pb (figura 9 a). Estos fragmentos se clonaron por separado, en el vector pCR4-TOPO, para que, posteriormente con estas contrucciones se transformaran las bacterias *E. coli* (One Shot. TOP-10F). Pasa saber si los productos amplificados y clonados correspondían a los fragmentos de los genes de interés, los plásmidos se cortaron con la enzima de restricción EcoR1 y los fragmentos liberados correspondientes a la RNR1 y RNR2 fueron de 536 pb y 238 pb, respectivamente (figura 9 b). Estos fragmentos fueron secuenciados y se confirmó la identidad de los mismos.

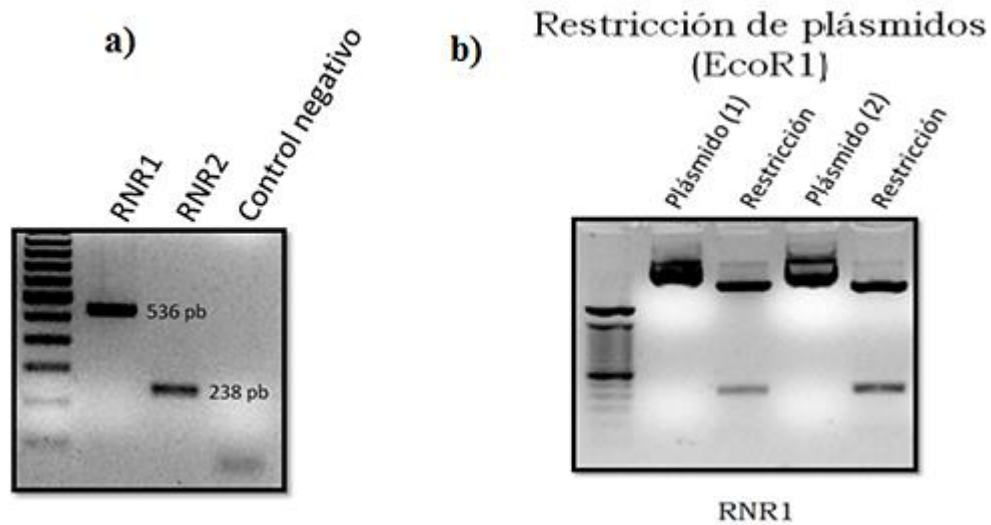


Figura 9. Clonación de las dos subunidades de la ribonucleótido difosfato reductasa. a) con los oligonucleótidos específicos se amplificaron fragmentos de los genes de la subunidad pesada de la ribonucleótido reductasa (RNR1) (536 pb) y la subunidad ligera de ribonucleótido reductasa (RNR2) (238 pb). b) los productos amplificados fueron clonados en el vector pCR 4-TOPO 2.1, los plásmidos correspondientes a cada gen fueron purificados y restringidos con la enzima EcoR1 para liberar los fragmentos, los cuales fueron secuenciados para confirmar su identidad.

Posteriormente, mediante RT-PCR se analizó la expresión de estas dos proteínas en el ciclo de vida del parásito (desarrollo asexual: trofozoítos y esquizontes; desarrollo sexual: gametocitos y gametos). Encontrando que, tanto en las fases asexuales como sexuales del parásito, las dos subunidades son altamente expresadas.

Para el caso de la RNR1, ésta se encuentra mayormente expresada en la fase de esquizontes y gametocitos; y en menor cantidad en trofozoítos. En gametos, la RNR1 también se encuentra expresada. En cuanto a la expresión de RNR2, se observó ésta se encuentra expresada de manera constante en las cuatro fases analizadas del ciclo de vida del parásito (figura 10). La proteína Pbs21, una molécula que sólo se expresa en la fase de gametocitos y gametos se utilizó como control de expresión.

8.6.1.2 Inhibición de la ribonucleótido difosfato reductasa con hidroxiurea (HU)

Para conocer, si la RNR participa en la gametogénesis de *P. berghei*, se realizó un ensayo de inhibición de ésta enzima, mediante el uso de un inhibidor específico de la RNR, la hidroxiurea (HU). Para esto, gametocitos purificados fueron tratados con diferentes concentraciones de HU (50, 75 y 100 mM), observando una disminución de más del 50% en los parásitos incubados con la HU a una concentración de 100 mM. Esta inhibición es dosis-dependiente, tomando en cuenta la formación de centros de exflagelación (formación de rosetas) de los parásitos incubados con las concentraciones de 50 mM y 75 mM. Como control se utilizaron parásitos no tratados (figura 11).

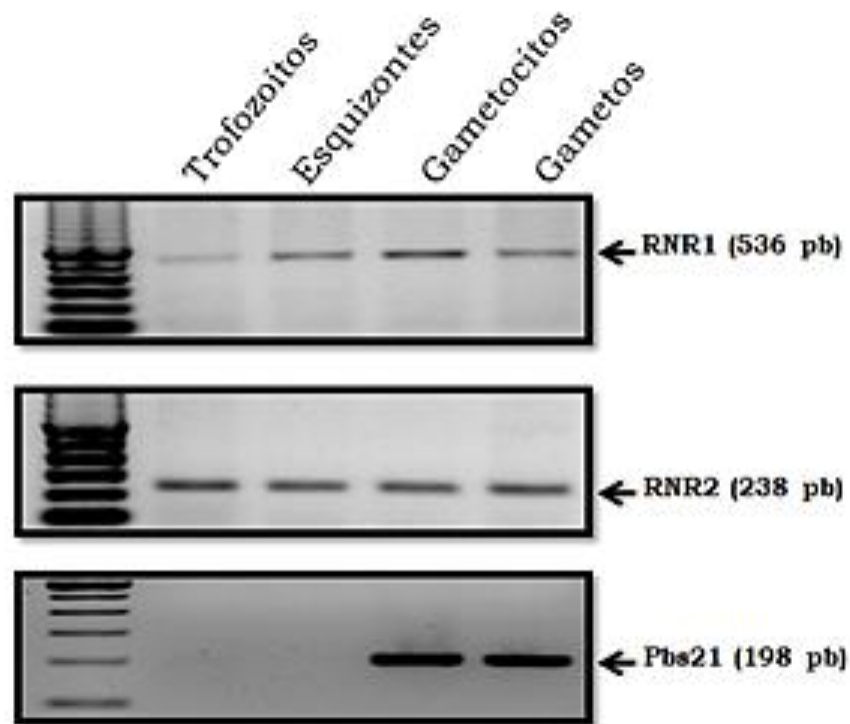


Figura 10. Análisis de expresión de los mRNAs de la ribonucleótido reductasa en fases asexuales y sexuales. La expresión de los RNAm de RNR1 y RNR2 en las fases asexuales (trofozoítos y esquizontes) y en las fases sexuales (gametocitos y gametos) fueron analizadas mediante RT-PCR. El tamaño de los fragmentos correspondientes a las subunidades de la RNR se muestran en cada recuadro. Pbs21 se utilizó como control de expresión de fase específica (sólo se expresa en fases sexuales).

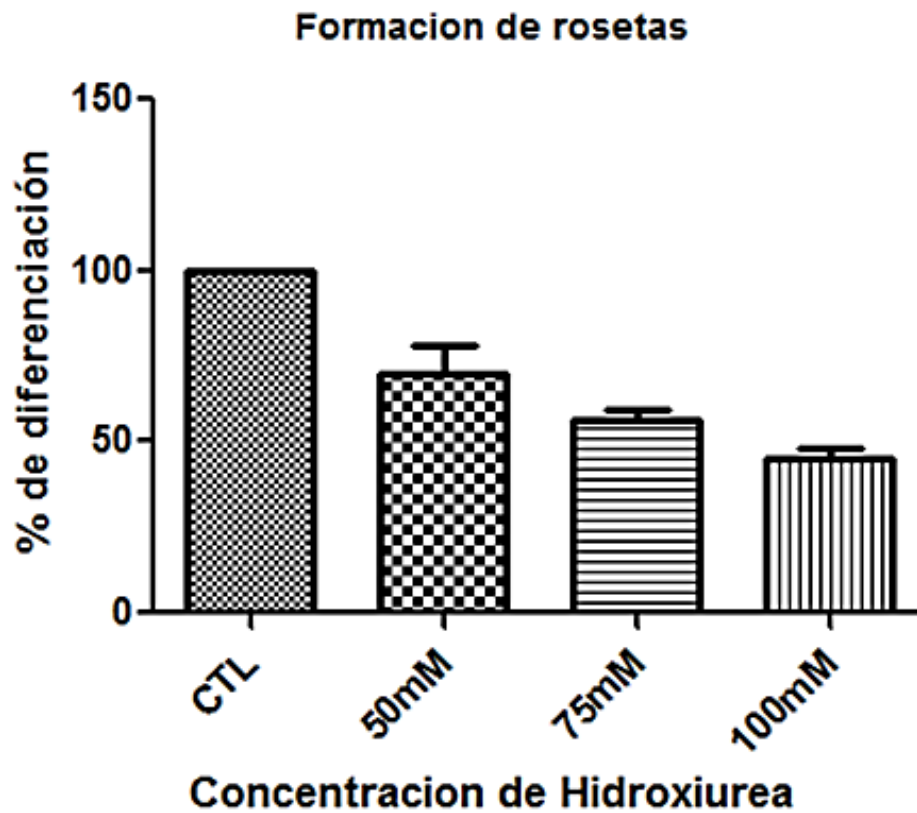


Figura 11. Inhibición de la gametogénesis por la hidroxiurea. Gametocitos purificados fueron incubados a diferentes concentraciones de hidroxiurea durante 60 min en medio RPMI 1640 pH 7.4 a 37° C; posteriormente el medio se cambió a medio RPMI 1640 pH 8.3 y se incubó durante 15 min a 19° C. El porcentaje de diferenciación (gametogénesis) fue determinado midiendo los centros de exflagelación o formación de rosetas por microscopía de contraste de fases. Las barras de dispersión indican la desviación estándar de 3 réplicas biológicas.

8.6.2 Tubulina en la gametogénesis de *P. berghei*

8.6.2.1 Localización de la tubulina en la gametogénesis

Otras proteínas que aumentaron su abundancia y cambiaron su nivel de fosforilación en residuos de treonina y tirosina fueron, la alfa y beta tubulina. Las tubulinas son proteínas globulares de 55 kDa, la familia de las tubulinas está formada por las tubulinas α , β y γ . Las tubulinas α y β son las subunidades esenciales de los microtúbulos, mientras que la tubulina- γ es un componente fundamental del centrómero.

Para conocer la localización de la tubulina durante la gametogénesis de *P. berghei*, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce de manera específica a la proteína, el cual fue producido en el laboratorio. Para este ensayo, laminillas de gametocitos y gametos fijados y permeabilizados, incubados con el anticuerpo, muestran que la tubulina (figura 12a) se encuentra en la periferia de los gametocitos y gametos, en la parte citoplásmica, cercana a la membrana; además de que, en gametos se observó que la tubulina se encuentra de manera abundante en el citoplasma del parásito. En la figura 12b, se observa fuertemente marcada la localización de la tubulina a lo largo del flagelo del gameto macho.

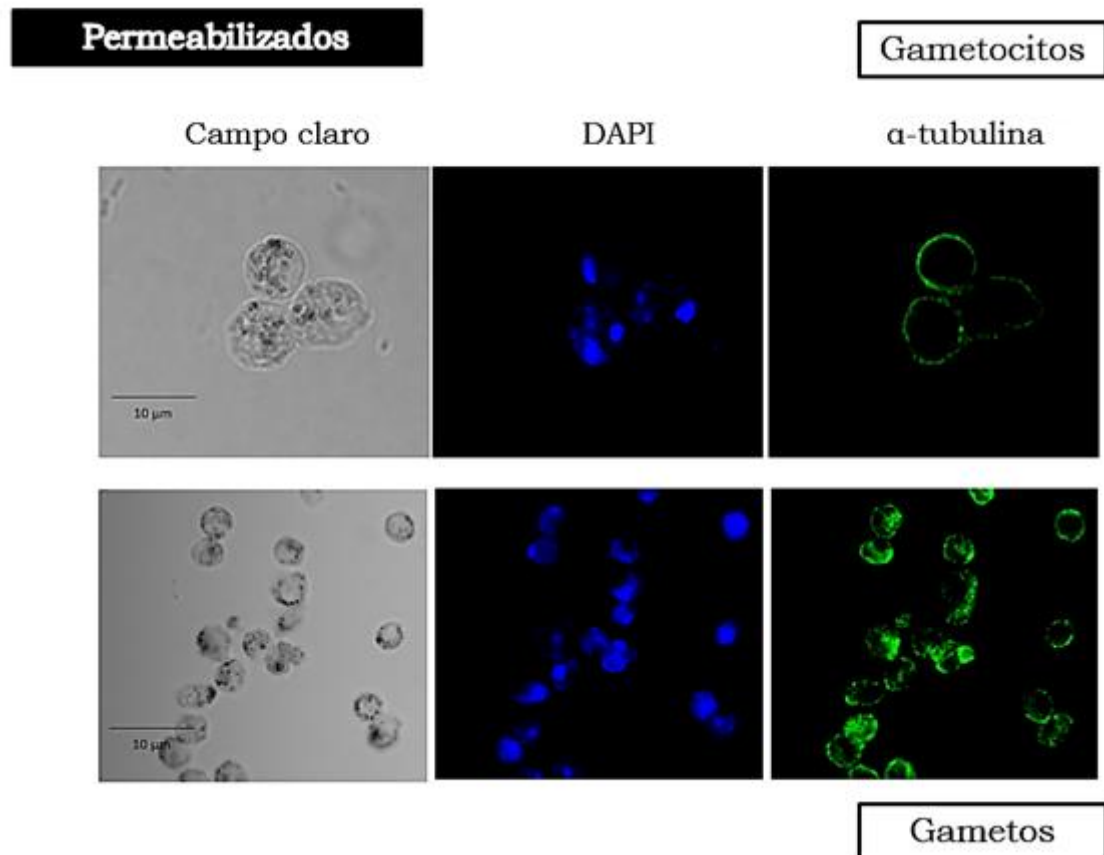


Figura 12a. Localización de la tubulina en gametocitos y gametos. Gametocitos y gametos purificados fueron fijados en paraformaldehído al 2% durante 30 min, posteriormente fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0.2% durante 15 min. Las laminillas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti tubulina y seguido de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las laminillas se analizaron por microscopía con focal (Leica, DMLS).

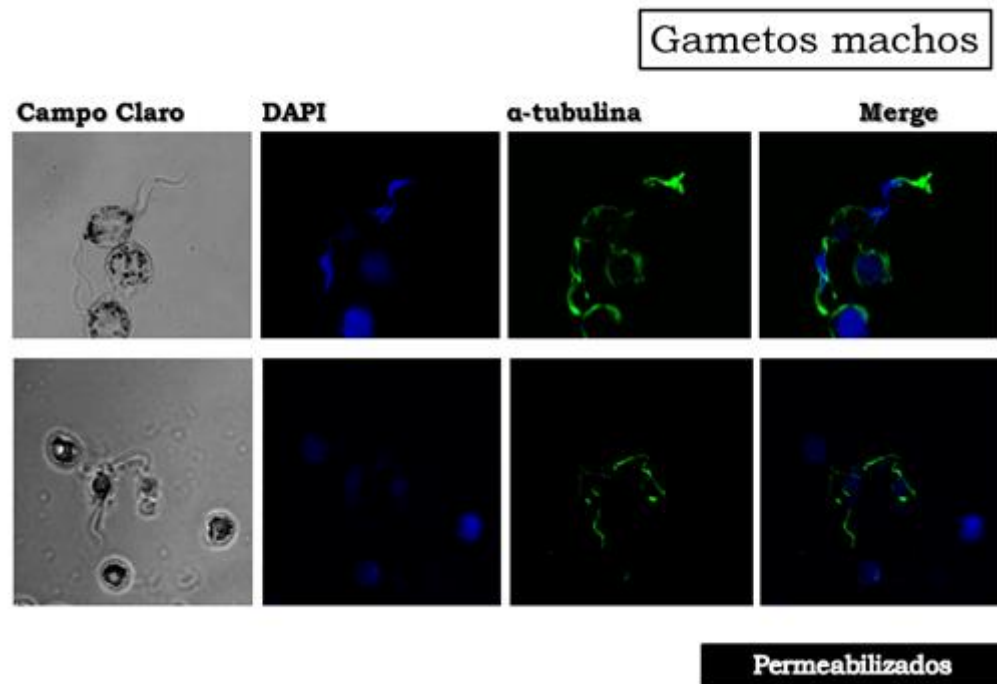


Figura 12b. Localización de la alfa tubulina en gametos machos. Gametos purificados fueron fijados en paraformaldehído al 2% durante 30 min, posteriormente fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0.2% durante 15 min. Las laminillas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti tubulina y seguido de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las laminillas se analizaron por microscopía con focal (Leica, DMLS).

8.6.2.2 Participación de la tubulina en la gametogénesis de *P. berghei*

Dada la importancia de la reorganización de los microtúbulos durante la gametogénesis, se estudió la posible participación de la tubulina en la gametogénesis del parásito, utilizando el anticuerpo monoclonal específico. Para esto, muestras de gametocitos purificados fueron incubados con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-tubulina, el cual se agregó al tiempo cero de la inducción del desarrollo sexual *in vitro.*, a las 24 horas después de la incubación con el anticuerpo, se contó el número de oocinetos diferenciados, encontrando que el anticuerpo inhibe un 25% la diferenciación a oocinetos a una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$, y en una menor cantidad, una inhibición 10% a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y del 80% una concentración 100 $\mu\text{g/ml}$ (figura 13).

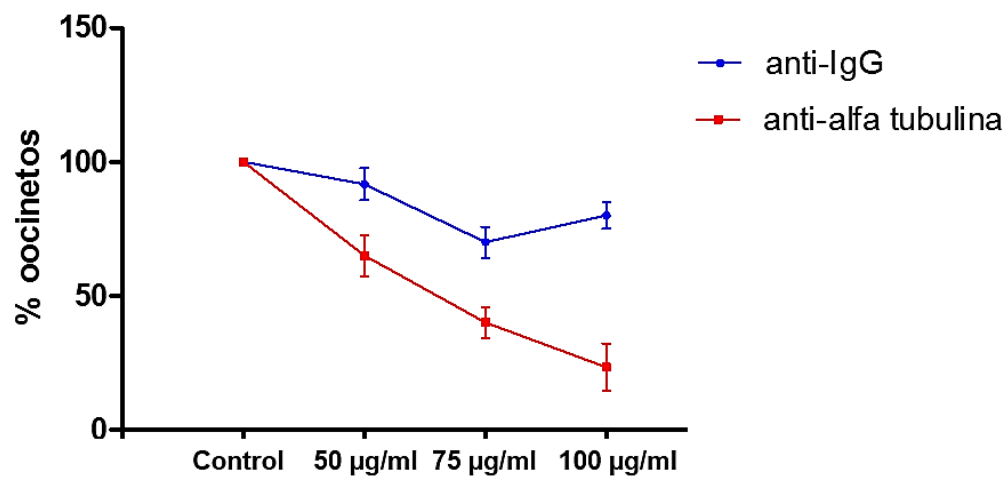


Figura 13. Participación de la tubulina en la gametogénesis de *P. berghei*. Muestras de gametocitos fueron incubadas con diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal anti-tubulina durante 24 h en medio RPMI 1640 pH 8.3 para inducir la gametogénesis. El porcentaje de fertilización fue determinado midiendo el número de oocinetos, los cuales fueron teñidos con Giemsa. Como control se utilizó un anticuerpo anti-IgG no relacionado.

IX. DISCUSIÓN

9.1 La malaria

La malaria, enfermedad producida por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* *sp.*, es la enfermedad infecciosa más importante del mundo por el número de casos y muertes que causa (Informe Mundial de la Malaria, OMS 2013). El ciclo de vida del parásito es complicado, ocurre en dos huéspedes, el mosquito vector y un vertebrado, con varios cambios de morfología y metabolismo, los cuales deben estar finamente regulados para lograr sobrevivir a las condiciones dentro del huésped. Las fases sexuales del ciclo de vida son fundamentales para la sobrevivencia de *Plasmodium*, su diferenciación se inicia en la sangre del huésped vertebrado, pero se detiene hasta que alcanza las condiciones adecuadas dentro del estómago del mosquito vector, donde se lleva a cabo su desarrollo sexual y esporogónico. Las razones de la importancia de las fases sexuales de *Plasmodium* incluyen, entre otras, que se genera variabilidad genética indispensable para la supervivencia de las poblaciones y, por otra parte, las formas sexuales son las únicas que pueden sobrevivir en el estómago del mosquito vector, lo que lleva a mantener la transmisión. Esta última razón ha llevado a proponer que los mecanismos moleculares que determinan el funcionamiento del parásito en el vector deben conocerse para proponer estrategias de control novedosas de la transmisión del parásito.

En el caso de los mecanismos moleculares y vías de señalización que regulan la gametogénesis en *Plasmodium*, éstos han sido difíciles de describir por varios inconvenientes, que incluyen la dificultad para obtener parásitos en fases sexuales. Una alternativa para el estudio de las fases sexuales de *Plasmodium* ha sido la posibilidad de obtener gametocitos de especies de parásitos de roedores como *P. berghei*, la cual se ha adaptado para crecer y desarrollarse en ratas y ratones de laboratorio. Además, los gametocitos de estas especies modelo se pueden cultivar *in vitro* para producir gametos, realizar la fecundación y desarrollar los parásitos hasta la fase de oocineto.

9.2 Inducción de la gametogénesis de *P. berghei* en ausencia de suero

En diversos métodos se ha reportado la inducción de la gametogénesis del parásito en medio RPMI 1640 suplementado con SFB. Sin embargo, en nuestro trabajo fue posible inducir la gametogénesis *in vitro* en ausencia de suero sin afectar el desarrollo del parásito, desde la formación de gametos hasta el desarrollo de oocinetos, lo que nos permitió un análisis más preciso para conocer los cambios que ocurrían en la expresión y fosforilación de ciertas proteínas durante la gametogénesis del parásito. En relación a la diferenciación sexual del parásito en ausencia de suero, Ghosh y Jacobs-Lorena (2011) reportaron que los oocinetos necesitan de ciertas proteínas del eritrocito o del suero para que el parásito atraviese la pared del estómago del mosquito, un paso posterior a la diferenciación a oocineto. En tanto, nuestros resultados sugieren que aunque el parásito no requiere de proteínas o componentes derivados del SFB para su diferenciación, probablemente sí los necesite para la invasión del estómago. Debido a que ambos procesos, la diferenciación hasta oocineto y la invasión del estómago, son secuenciales, se requieren más experimentos para encontrar los factores moleculares que participan en estos eventos que llevan al desarrollo exitoso del parásito *in vitro* y en el estómago del mosquito. Por ello, este sencillo método de inducción de la gametogénesis en ausencia de SFB proporciona la base para nuevos análisis en el campo de la biología celular y molecular en el desarrollo sexual de *Plasmodium*.

9.3 Proteínas fosforiladas durante la gametogénesis de *P. berghei*

En todos los organismos estudiados, incluyendo *Plasmodium*, la fosforilación y defosforilación de proteínas son modificaciones post-traduccionales que tienen un papel muy importante en las vías de señalización. La fosforilación de proteínas, la cual se realiza en los residuos de serina, treonina y tirosina, también juega un papel muy importante en la modificación de las funciones de las proteínas. Estudios realizados en *Plasmodium*, han mostrado que diversas vías de señalización que incluyen la fosforilación reversible de las proteínas, son esenciales para el desarrollo de las fases asexuales y para su desarrollo sexual en el estómago del mosquito y su transmisión a través de las glándulas salivales.

En este estudio se describen los cambios en la fosforilación de proteínas que ocurren durante la gametogénesis *in vitro* de *P. berghei* y el papel que tienen algunas de las fosfoproteínas identificadas en este proceso. Estos resultados fueron obtenidos utilizando un protocolo para obtener muestras de gametocitos y gametos altamente purificados desarrollados en un medio de cultivo libre de suero, con el fin de evitar contaminantes para el análisis proteómico.

Respecto a las proteínas observadas en las fases sexuales de *P. berghei*, se visualizaron más de 700 proteínas en ambas fases, de las cuales más de 120 manchas se detectaron con el colorante específico para proteínas fosforiladas y, mediante análisis por WB bidimensional utilizando anticuerpos específicos anti-pSer, anti-pThr y anti-pTyr por separado, se observaron aproximadamente 75 fosfoproteínas. De éstas, 18 proteínas mostraron diferencias en los niveles de fosforilación durante la gametogénesis y fueron identificados por espectrometría de masas.

Varios estudios reportan más de una proteína en un punto obtenido a partir de una 2-DE, sin embargo, con los parámetros utilizados para el análisis de espectrometría de masas en este trabajo, sólo en cinco de los 18 puntos se observó más de una proteína (puntos 6, 8, 10, 11 y 13). También es interesante hacer notar que sólo cuatro proteínas (endoplasmina, alfa tubulina, actina y la proteína p1/s1) al comparar los geles teñidos con ProQ Diamond y Sypro Ruby presentaron ligeras diferencias en la abundancia relativa, apoyando la hipótesis de que los cambios observados por E-2D/WB se debieron a la fosforilación/defosforilación y no a la concentración de proteínas.

En estudios previos sobre el fosfoproteoma de fases intraeritrocíticas de *P. falciparum* se utilizaron varios métodos de enriquecimiento de fosfoproteínas (IMAC o TiO₂) combinándolos con técnicas basadas en cromatografía líquida y en espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) a partir de muestras líquidas, obteniendo como resultado la identificación de numerosas fosfoproteínas (más de 1900), así como la identificación de sitios fosforilados únicos (aproximadamente 6300), incluyendo sitios de fosforilación en tirosina (Treeck *et al.*, 2011; Lasonder *et al.*, 2012; Collins *et al.*, 2014). En tanto, nuestro trabajo proporciona una caracterización inicial del fosfoproteoma de un proceso poco estudiado, como lo es la

gametogénesis en el ciclo de vida del parásito de la malaria, a partir de proteínas separadas por 2-DE y reconocidas por anticuerpos monoclonales dirigidos contra residuos fosforilados (pSer, pThr, pTyr) mediante WB y seguido también, por espectrometría de masas en tándem.

Además, seis fosfoproteínas fueron reanalizadas mediante el enriquecimiento de fosfopéptidos por TiO₂ y análisis por LC-MS/MS confirmando su identidad y su fosforilación. Asimismo, se identificaron los residuos fosforilados específicos mínimos en cada una de esas proteínas fosforiladas. Aunque los residuos fosforilados específicos de algunas de esas proteínas no coincidieron con los obtenidos por WB; estos resultados también podrían deberse a la pequeña cantidad de muestra recuperada, después del enriquecimiento por TiO₂ a partir de las manchas de proteínas extraídas de los geles originalmente teñidos con azul de Coomassie, ya que podrían tener más residuos fosforilados que los identificados por WB. El análisis *in silico* también predice que las seis proteínas examinadas podrían tener sitios fosforilados en otros residuos, además de los reconocidos por WB.

Es importante hacer notar que varias de las proteínas que se encontraron fosforiladas durante la gametogénesis de *P. berghei* analizadas en este trabajo, también se han encontrado fosforiladas, específicamente en las fases del ciclo de vida durante el desarrollo intraeritrocítico de *P. falciparum* (Collins *et al.*, 2014; Lasonder *et al.*, 2012; Pease *et al.*, 2013; Treeck *et al.*, 2011).

Por otra parte, en este trabajo también se encontraron puntos de proteínas fosforiladas en tirosina, tanto por WB como por el análisis de residuos fosforilados específicos por MS en tándem, como la actina. La detección de proteínas fosforiladas en Tyr es interesante debido a que al analizar las bases de datos disponibles del genoma de varias especies de *Plasmodium* (Ward *et al.*, 2004), no hay genes identificables que codifiquen proteína tirosina cinasas. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con otros reportes, en el hallazgo de proteínas fosforiladas en Tyr (Collins *et al.*, 2014; Lasonder *et al.*, 2012; Treeck *et al.*, 2011). Por ejemplo, recientemente se demostró que Pfnek3 (NIMA-una cinasa *like*), tiene actividad serina/treonina y tirosina cinasa en reacciones de autofosforilación, así como en la fosforilación de un sustrato

exógeno como la proteína básica mielina; los autores de este estudio concluyen que Pfnk3 es una nueva proteína cinasa con actividad dual (Low *et al.*, 2012).

9.4 Ribonucleótido difosfato reductasa

Un grupo de polipéptidos de aproximadamente 100 kDa que incrementó su nivel de fosforilación en serina corresponde a la subunidad pesada de la proteína ribonucleótido difosfato reductasa; además de mostrar cambios en la proporción y movilidad de sus isoformas. La ribonucleótido difosfato reductasa (RNR) es una enzima tetrámerica, compuesta de dos subunidades pesadas (R1) y dos subunidades ligeras (R2), las cuales sintetizan los cuatro deoxyribonucleotidos trifosfato (dNTPs) requeridos para la replicación y reparación del DNA (Nordlund y Reichard, 2006). Reportes de otros organismos confirman que tanto la subunidad pesada como la ligera pueden ser fosforiladas en residuos de serina (Conner, 1999; Chang *et al.*, 2008).

El cambio significativo en los niveles de fosforilación en serina de *PbRNR1*, apoyan la conclusión de que los cambios en las isoformas fosforiladas podrían estar relacionados con la regulación durante la gametogénesis. También, mediante RT-PCR semi-cuantitativa se demostró que *PbRNR1* se expresa en mayor proporción en los gametocitos que en gametos. Con estos resultados sugerimos que esta proteína podría estar participando en la producción de los gametos machos durante la gametogénesis del parásito, proceso en el cual se sintetiza una cantidad significativa de DNA.

En *P. falciparum* se identificó la secuencia completa de DNA tanto de la R1 como de la R2 (PfR1 y PfR2, respectivamente). La subunidad ligera PfR1, tiene una identidad del 59% con respecto a la del humano, mientras que la PfR2 tiene una identidad del 64% (Rubin *et al.*, 1993). La expresión del mensajero y proteína de las subunidades PfR1 y PfR2 durante el desarrollo eritrocítico se ha observado principalmente en la fase de trofozoíto (Bracchi-Ricard *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 1993). La hidroxurea es un inhibidor específico de la RNR, que interrumpe la síntesis de DNA y detiene la maduración del parásito intraeritrocítico, esto en *P. falciparum* (Holland *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la inhibición con RNR reduce

las pozas de dNTPs e induce una pausa en las horquillas de replicación. En acuerdo a lo anterior, con en el tratamiento de los parásitos con hidroxiiurea observamos una disminución en la exflagelación, confirmando un posible papel de la RNR durante la gametogénesis del macho, cuando el parásito presenta altos niveles de síntesis de DNA. Aunado a lo que nosotros encontramos que, recientemente, la RNR se ha propuesto como un blanco para el desarrollo de drogas que inhiban su actividad en el parásito (Munro y Silva, 2012).

9.5 Proteínas de citoesqueleto, tubulina y actina

Varias isoformas de dos proteínas del citoesqueleto, actina, actina-1 y actina-2, y alfa-tubulina y beta-tubulina fueron reconocidas por el colorante específico de fosfoproteínas ProQ Diamond y los anticuerpos específicos anti-pThr y pTyr. Además, en las isoformas actina-1 y actina 2 se identificó un residuo específico de tirosina fosforilada (Y363) por MS en tándem, como se predice en el análisis *in silico*. En *P. berghei* se ha observado que ambas isoformas de actina (actina-1 y actina-2) se expresan en gametocitos, específicamente la actina-2 en los machos, la cual es esencial en la gametogénesis del parásito (Deligianni *et al.*, 2011).

Respecto a la tubulina, en muchos organismos se ha observado que los cambios en la polimerización de los microtúbulos son regulados por la fosforilación en residuos de serina y treonina de la tubulina (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014). En *P. falciparum*, la alfa-tubulina II se expresa en fases sexuales del parásito, específicamente en los gametos machos (Rawlings *et al.*, 1992) y se encuentra localizada en el axonema del microgameto, una estructura importante para la motilidad del parásito. En contraste, en *P. berghei* la alfa-tubulina II no sólo se expresa en gametocitos machos, sino también en las etapas asexuales (Kooij *et al.*, 2005).

Dado que desconocemos cuál pueda ser el papel de la fosforilación de estas proteínas durante la gametogénesis, las vías de señalización relacionadas con este proceso y la reorganización del citoesqueleto deben ser estudiadas con más detalle.

En relación al papel que la tubulina podría estar teniendo durante la gametogénesis de *P. berghei*, se realizaron experimentos de inmunolocalización en las fases de gametocitos y gametos de ambos sexos, esto mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra la tubulina recombinante de *P. berghei*, el cual fue producido en el laboratorio. Por otra parte, para conocer la parte funcional de la tubulina durante la gametogénesis, fertilización o desarrollo a oocinetos, el anticuerpo anti-tubulina se agregó en el tiempo cero de la gametogénesis. En los experimentos de inmunolocalización observamos que la proteína se localiza en la periferia de los gametocitos y gametos, en la parte citoplásmica, cercana a la membrana; además, en gametos se observó que se encuentra de manera abundante en el citoplasma del parásito. La localización de la tubulina en la periferia del parásito probablemente sea como parte de un complejo de membrana, involucrado en la activación de vías de señalización, como lo indica Wolff, 2009; todo esto debido a que, cuando los gametocitos fueron incubados con diferentes concentraciones del anticuerpo, el porcentaje de diferenciación a oocinetos disminuyó notablemente, probablemente debido a la inhibición de una vía de señalización, o a la inhibición de la unión de gametos, antes de la fertilización. En el futuro se tendrán que realizar experimentos con estas herramientas para conocer más sobre la participación de la tubulina durante el desarrollo del parásito, una de las interrogantes que se podrían resolver es, en que momento se inhibe el desarrollo del parásito cuando se incuba con el anticuerpo anti-tubulina.

9.6 Otras proteínas fosforiladas

9.6.1 Chaperonas

Dos fosfoproteínas identificadas en este trabajo son las proteínas de choque térmico, HSP70 y HSP90, las cuales son chaperonas moleculares cuyas funciones son moduladas por co-chaperonas y modificaciones post-traduccionales y son responsables de la producción de proteínas de señalización y reguladores del ciclo celular (Soroka *et al.*, 2012; Truman *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2013). Tanto HSP70 como HSP90 fueron reconocidos por el anticuerpo anti-pSer en gametocitos y se localizaron tres sitios de fosforilación de serina en HSP70 (S106, S585 y S588), además de que se detectó un sitio fosforilado en treonina (T587). Experimentos de co-inmunoprecipitación y análisis *in silico* realizados en *P. falciparum* sugieren que un

complejo formado por la proteína de organización de choque térmico (Hop), HSP70 y HSP90 está presente en la etapa de trofozoito (Gitau *et al.*, 2012; Hatherley *et al.*, 2015). La HSP70 identificada en este trabajo contiene el dominio EEVD localizado en el extremo C-terminal que interactúa con Hop. HSP90 y HSP70 son blancos potenciales para el desarrollo de drogas contra la malaria (Botha *et al.*, 2011; Gitau *et al.*, 2012).

Respecto al posible papel de la Hsp70 en el desarrollo del parásito, en un trabajo realizado en el laboratorio (Torres-Monzón, 2005), se analizó la participación de una Hsp70 de *P. berghei* en la fertilización del parásito. La Hsp70 analizada fue una homóloga a un receptor de fertilización de *Strongylocentrotus purpuratus*, una especie de erizo de mar. Mediante tecnología recombinante se produjo un anticuerpo monoclonal en contra de la Hsp70 de *P. berghei*, y por medio de inmunofluorescencia se observó que la proteína se encontraba en la membrana de los gametos hembra; haciendo ensayos de inhibición con el anticuerpo se encontró que el proceso de fertilización no se llevaba a cabo de manera dosis dependiente, ya que el anticuerpo impedía la unión de los gametos. Estos resultados sugieren que la Hsp70 es importante en la fertilización del parásito, sin embargo faltan más experimentos que permitan conocer más acerca de estas proteínas en el desarrollo de *P. berghei*.

9.6.2 Enolasa

Un grupo de tres proteínas correspondientes a isoformas de enolasa también fueron detectadas por el anticuerpo anti-pThr, sin embargo, el sitio de fosforilación identificado fue serina (S429). La enolasa es una proteína multifuncional, originalmente se le asignó la función de una enzima metabólica ya que cataliza la interconversión de 2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato durante el glicolisis y gluconeogénesis, sin embargo en estudios recientes se ha demostrado que participa en otros procesos celulares (Diaz-Ramos *et al.*, 2012). La enolasa está presente en el núcleo, citoplasma, asociada al citoesqueleto, membrana celular y vacuolas en diferentes fases de *Plasmodium spp.*, además de que se fosforila dependiendo de la localización subcelular (Bhowmick *et al.*, 2009; Shevade *et al.*, 2013). La enolasa en *P. falciparum* se ha observado en la superficie de oocinetos, participando como ligando de receptores presentes en las células epiteliales del estómago del mosquito durante el proceso de invasión (Ghosh y Jacobs-Lorena,

2011; Hernández-Romano *et al.*, 2011). La enolasa en la superficie también puede participar durante la invasión a la célula, por la unión al plasminógeno, un abundante precursor de proteasa. Esta unión genera la plasmina activa, la cual es una serina proteasa que puede degradar la matriz extracelular que rodea la célula blanco, facilitando la invasión del patógeno (Ghosh *et al.*, 2011). Nuestra observación de que la isoforma más abundante de esta proteína presente péptidos fosforilados sugiere su participación durante la gametogénesis, sin embargo, se requieren de otros estudios para determinar cuál es su papel en este proceso.

9.6.3 Proteínas de unión a cromatina

El Supresor Multicopia de IRA (*msi1*, por sus siglas en inglés) y una proteína de unión a histonas N1/N2, incrementaron su fosforilación en la fase de gametos, lo cual puede correlacionar con lo que se sabe en otros sistemas, que están involucradas en el ensamble de la cromatina y son importantes en la expresión de genes (Dumbliauskas *et al.*, 2011; Kleinschmidt *et al.*, 1986). MSI1 es una proteína de andamiaje que contiene una serie de repetidos WD40 a través de los cuales se une a otras proteínas formando complejos; ésta proteína tiene un papel pleiotropico en el ensamble de la cromatina y la regulación de vías de señalización. Debido a que no existe información sobre estas proteínas, se deberá estudiar el papel que pudieran tener durante la gametogénesis y en el ciclo de vida asexual de *Plasmodium*.

9.6.4 Proteínas G pequeñas

Las proteínas G tienen un papel central en la transducción de señales y en otros procesos celulares (Hall, 2012; Oldham y Hamm, 2008). En este trabajo se identificó un ortólogo putativo de la proteína G de *P. chabaudi* que corresponde a la proteína RACK1 de *P. berghei* (PbRACK1), la cual se detectó principalmente con el anticuerpo anti-pTyr. Aunque los sitios de fosforilación en Tyr no fueron localizados por MS, en líneas celulares de mamíferos se ha demostrado que la fosforilación en residuos de tirosina de RACK son importantes para la interacción con otras proteínas para regular la transducción de señales (Chang *et al.*, 2001; Kiely *et al.*, 2008, 2009). Un ortólogo de RACK1 se ha caracterizado en *P. falciparum* y su expresión es constitutiva en las fases asexuales, apoyando la idea de que es importante en los procesos de

regulación del ciclo de vida del parásito (Madeira *et al.*, 2003). Además, en células de mamífero se ha observado que PfRACK1 inhibe directamente la señalización de InsP3 mediada por Ca^{2+} , interfiriendo con las vías de señalización de la célula hospedera, lo cual puede ser un mecanismo importante para la supervivencia del parásito (Sartorello *et al.*, 2009). Dado que RACK1 es una proteína muy conservada, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RACK1 de humano, mediante WB se confirmó la expresión de PbRACK1 en gametocitos y gametos (datos no mostrados). Se requieren de más estudios para determinar su participación de esta proteína durante la gametogénesis de *P. berghei*.

9.6.5 Proteínas del complejo T

Otra proteína con cambios en la fosforilación que se identificó en este trabajo fue la subunidad β de la proteína del complejo T de la cual se encontraron dos isoformas fosforiladas en tirosina. En seres humanos la subunidad β de la proteína del complejo T está codificada por el gen CCT2. Este gen codifica una chaperona molecular que es miembro de las chaperoninas que contiene el complejo TCP1 (CCT), también conocido como el complejo de anillo TCP1 (TRiC) (Valpuesta *et al.*, 2002). CCT2 protege a las proteínas recientemente formadas de otras moléculas (Brackley y Grantham, 2009). El complejo actúa como chaperona para otras proteínas y ayuda al plegamiento de los microfilamentos en la célula con el fin de construir el citoesqueleto (actina y tubulina) (Yebebenes *et al.*, 2011).

9.7 Represión post-transcripcional en *Plasmodium*

Por otro lado, la represión de la traducción de RNAm es un mecanismo regulatorio que ocurre en las células reproductivas de eucariotes multicelulares (Mair *et al.*, 2006). Este mecanismo de regulación post-transcripcional de la síntesis de proteínas también se ha observado en *Plasmodium* durante el switch en el huésped invertebrado: de gametocitos a gametos (Saeed *et al.*, 2013), de cigoto a oocineto (Mair *et al.*, 2006,) dentro del estómago del mosquito; como ejemplo, los miembros de la familia de proteínas LCCL, que son transcritos en el gametocito pero traducidos hasta los oocinetos (Saeed *et al.*, 2013); durante la transmisión al huésped vertebrado: de esporozoito a la invasión del hígado (Hanson y Mair, 2014; Silvie *et al.*,

2014). Como se mencionó en la introducción, las proteínas DOZI y CITH son proteínas de unión a RNA que estabilizan a los RNAm evitando su degradación, manteniéndolos quiescentes y con ello inhiben la traducción por represión post-transcripcional en las formas sexuales de *Plasmodium*. Mediante ensayos de RNA-inmunoprecipitación y análisis por microarreglos se identificaron más de 700 RNAm asociados a DOZI y CITH (represoma D/C) (Guerreiro *et al.*, 2014) y por ensayos de inmunoafinidad, se identificaron 27 proteínas formando complejos con DOZI/CITH, entre las cuales se encuentran la enolasa (Mair *et al.*, 2010). Debido a que la fosforilación es un mecanismo que regula la síntesis y la actividad de las proteínas, nosotros comparamos las proteínas fosforiladas descritas en este trabajo con las moléculas presentes en el represoma D/C y en los complejos protéicos-D/C; de manera interesante, sólo el mRNA de la subunidad pesada de la RNR se encontró asociado en el represoma D/C, sugiriendo la presencia de RNR1 entre los mensajeros reprimidos. Sin embargo, el mRNA de RNR1 aumentó su síntesis en la fase de gametocitos y disminuyó en la fase de gametos, alcanzando un nivel similar al de las fases intraeritrocíticas (desconocemos su comportamiento en los oocinetos). En relación a la proteína, RNR1 mostró cambios en la abundancia y movilidad de sus isoformas debido a su fosforilación. Estos cambios podrían estar relacionados con la síntesis de DNA durante la gametogénesis y considerando su importancia en este proceso, algún inhibidor además de HU de sus mecanismos regulatorios podría ser utilizado para bloquear su actividad en el estómago del mosquito vector.

Al comparar las 23 proteínas, que modificaron su nivel de fosforilación durante la gametogénesis, además de los sitios de fosforilación específicos reconocidos en seis de esas fosfoproteínas en gametocitos y gametos, identificadas en este trabajo con las descritas en otros estudios donde describieron el proteoma de gametocitos de ambos sexos (Khan y col., 2005) y de gametos machos (Talman y col., 2014), con esta información no es posible proponer su participación en los mecanismos regulatorios específicos durante el desarrollo sexual. Sin embargo, estas fosfoproteínas tienen una participación importante en varios procesos celulares descritos en diversos sistemas y estas funciones incluyen la regulación del ciclo celular, expresión genética, ensamble del citoesqueleto y transducción de señales, entre otras; por lo que estas moléculas podrían jugar un papel importante durante la gametogénesis, en la cual la fosforilación podría tener un mecanismo regulatorio. Por estas razones, resulta importante

continuar con el estudio de cada una de ellas, para determinar su participación en el desarrollo del parásito que se lleva a cabo en el mosquito.

X. CONCLUSIONES

- La diferenciación de gametocitos a gametos, cigotos y oocinetos se llevó a cabo en ausencia de suero fetal bovino.
- Se observó que cerca de 75 proteínas cambiaron su fosforilación durante la gametogénesis de *P. berghei*.
- Se observaron fosforilaciones en serina, treonina y tirosina.
- Mediante espectrometría de masas, se identificaron 23 proteínas que cambiaron su fosforilación, estas proteínas están involucradas en la síntesis de DNA, citoesqueleto, señalización, entre otros procesos.
- Se identificó el sitio de fosforilación de seis proteínas mediante enriquecimiento de fosfopéptidos-TiO₂ y LC-MS/MS.
- Una de las proteínas que cambió su fosforilación, y además se identificó su sitio fosforilado fue la ribonucleótido disfosfato reductasa, subunidad pesada, la cual se encontró fosforilada en Ser, mayormente en la fase de gametocito.
- La expresión del mensajero de esta proteína cambia a lo largo del ciclo de vida del parásito, encontrando una mayor expresión en la fase de gametocito.
- Al utilizar la hidroximiurea, un inhibidor de la RNR, se observó que se disminuye la gametogénesis del macho hasta un 50%, a una concentración de 100 mM.
- Otra proteína que cambió su fosforilación fue la tubulina, se encontró fosforilada en Ser, mayormente en la fase de gametocito.
- Se observó que la tubulina se encuentra en la periferia de los gametocitos y gametos, en la parte citoplásmica, cercana a la membrana; además de que, en gametos se observó que se encuentra de manera abundante en el citoplasma del parásito.
- El anticuerpo anti-tubulina, inhibe el desarrollo a oocinetos en un 30%, esto a una concentración de 100 µg/µl.

XI. PERSPECTIVAS

- Continuar con el análisis de la ribonucleótido disfosfato reductasa, generando anticuerpos monoclonales en contra de la RNR1 y RNR2; estos para realizar ensayos de microscopía confocal e inmunoprecipitación, los cuales permitan conocer su localización y la posible formación de complejos que la proteína pudiera tener durante la gametogénesis de *P. berghei*.
- Continuar con el análisis de la tubulina, realizando ensayos de inmunoprecipitación para conocer la posible formación de complejos que la proteína pudiera tener durante la gametogénesis de *P. berghei*; además de analizar su fosforilación durante todo el ciclo de vida del paásito.
- Analizar la fosforilación de las proteínas identificadas en este trabajo, ahora durante todo el ciclo de vida del parásito

XII. REFERENCIAS

- Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular microbiology*. 2007;66(2):291-302.
- Alano P. The sound of sexual commitment breaks the silencing of malaria parasites. *Trends Parasitol*. 2014;30(11):509-10.
- Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:195-221.
- Bhowmick IP, Kumar N, Sharma S, Coppens I, Jarori GK. *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. *Malaria journal*. 2009;8:179.
- Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(10):2829-43.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*. 2004;117(4):503-14.
- Blagborough AM, Sinden RE. *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity *in vivo* and *in vitro*. *Vaccine*. 2009;27(38):5187-94.
- Botha M, Chiang A, Needham P, Stephens L, Hoppe H, Külzer S, et al. *Plasmodium falciparum* encodes a single cytosolic type I Hsp40 that functionally interacts with Hsp70 and is upregulated by heat shock. *Cell Stress and Chaperones*. 2011;16(4):389-401.
- Bracchi-Ricard V, Moe D, Chakrabarti D. Two *Plasmodium falciparum* Ribonucleotide Reductase Small Subunits, PfR2 and PfR4, Interact with Each Other and are Components of the *in vivo* Enzyme Complex. *Journal of Molecular Biology*. 2005;347(4):749-58.
- Brackley KI, Grantham J. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):23-31.
- Butterworth AS, Skinner-Adams TS, Gardiner DL, Trenholme KR. *Plasmodium falciparum* gametocytes: with a view to a kill. *Parasitology*. 2013;140(14):1718-34.

- Carlton JM, Muller R, Yowell CA, Fluegge MR, Sturrock KA, Pritt JR, et al. Profiling the malaria genome: a gene survey of three species of malaria parasite with comparison to other apicomplexan species. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;118(2):201-10.
- Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, Saul A. Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med*. 2000;6(3):241-4.
- Chang L, Zhou B, Hu S, Guo R, Liu X, Jones SN, et al. ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(47):18519-24.
- Collins MO, Wright JC, Jones M, Rayner JC, Choudhary JS. Confident and sensitive phosphoproteomics using combinations of collision induced dissociation and electron transfer dissociation. *Journal of proteomics*. 2014;103:1-14.
- Conner J. The unique N terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue *in Escherichia coli*. *Journal of General Virology*. 1999;80(6):1471-6.
- Cui L, Lindner S, Miao J. Translational regulation during stage transitions in malaria parasites. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1342:1-9.
- Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, Kooij TW, Laforge A, Nahar C, et al. Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite. *Cell Microbiol*. 2011;13(11):1714-30.
- Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Aleman R. alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:156795.
- Dorin D, Le Roch K, Sallicandro P, Alano P, Parzy D, Pouillet P, et al. Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur J Biochem*. 2001;268(9):2600-8.
- Dumbliuskas E, Lechner E, Jaciubek M, Berr A, Pazhouhandeh M, Alioua M, et al. The Arabidopsis CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *EMBO J*. 2011;30(4):731-43.
- Eksi S, Czesny B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Eling W, Williamson KC. Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to

- exflagellating male parasites and oocyst production. *Molecular microbiology*. 2006;61(4):991-8.
- Finoulst I, Pinkse M, Van Dongen W, Verhaert P. Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:245291.
 - Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, et al. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell*. 2006;17(3):1041-50.
 - Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(41):17153-8.
 - Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106 Suppl 1:85-90.
 - Gitau GW, Mandal P, Blatch GL, Przyborski J, Shonhai A. Characterisation of the *Plasmodium falciparum* Hsp70-Hsp90 organising protein (PfHop). *Cell Stress Chaperones*. 2012;17(2):191-202.
 - Goodman CD, McFadden GI. Gamete fusion: key protein identified. *Curr Biol*. 2008;18(13):R571-3.
 - Guerreiro A, Deligianni E, Santos JM, Silva PA, Louis C, Pain A, et al. Genome-wide RIP-Chip analysis of translational repressor-bound mRNAs in the *Plasmodium* gametocyte. *Genome Biol*. 2014;15(11):493.
 - Guttery DS, Holder AA, Tewari R. Sexual development in *Plasmodium*: lessons from functional analyses. *PLoS Pathog*. 2012;8(1):e1002404.
 - Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(6):1378-82.
 - Hanson KK, Mair GR. Stress granules and *Plasmodium* liver stage infection. *Biology open*. 2014;3(1):103-7.
 - Hatherley R, Clitheroe CL, Faya N, Tasthan Bishop O. *Plasmodium falciparum* Hop: detailed analysis on complex formation with Hsp70 and Hsp90. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456(1):440-5.

- Hernandez-Romano J, Rodriguez MH, Pando V, Torres-Monzon JA, Alvarado-Delgado A, Lecona Valera AN, et al. Conserved peptide sequences bind to actin and enolase on the surface of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Parasitology*. 2011;138(11):1341-53.
- Hirai M, Mori T. Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. *Acta Tropica*. 2010;114(3):157-61.
- Holland KP, Elford HL, Bracchi V, Annis CG, Schuster SM, Chakrabarti D. Antimalarial activities of polyhydroxyphenyl and hydroxamic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(9):2456-8.
- Johnson JR, Florens L, Carucci DJ, Yates JR, 3rd. Proteomics in malaria. *Journal of proteome research*. 2004;3(2):296-306.
- Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M, et al. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*. 2005;121(5):675-87.
- Kiely PA, Baillie GS, Barrett R, Buckley DA, Adams DR, Houslay MD, et al. Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2009;284(30):20263-74.
- Kiely PA, Baillie GS, Lynch MJ, Houslay MD, O'Connor R. Tyrosine 302 in RACK1 Is Essential for Insulin-like Growth Factor-I-mediated Competitive Binding of PP2A and β 1 Integrin and for Tumor Cell Proliferation and Migration. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(34):22952-61.
- Kleinschmidt JA, Dingwall C, Maier G, Franke WW. Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *EMBO J*. 1986;5(13):3547-52.
- Kooij TWA, Franke-Fayard B, Renz J, Kroeze H, van Dooren MW, Ramesar J, et al. *Plasmodium berghei* α -tubulin II: A role in both male gamete formation and asexual blood stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2005;144(1):16-26.
- Kuehn A, Pradel G. The coming-out of malaria gametocytes. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:976827.
- Lasonder E, Green JL, Camarda G, Talabani H, Holder AA, Langsley G, et al. The *Plasmodium falciparum* schizont phosphoproteome reveals extensive

- phosphatidylinositol and cAMP-protein kinase A signaling. *Journal of proteome research*. 2012;11(11):5323-37.
- Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. 2003;301(5639):1503-8.
 - Liu Y, Tewari R, Ning J, Blagborough AM, Garbom S, Pei J, et al. The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* gametes. *Genes Dev*. 2008;22(8):1051-68.
 - Low H, Chua CS, Sim TS. *Plasmodium falciparum* possesses a unique dual-specificity serine/threonine and tyrosine kinase, Pfnek3. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2012;69(9):1523-35.
 - Lye YM, Chan M, Sim TS. Pfnek3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006;580(26):6083-92.
 - Madeira L, DeMarco R, Gazarini ML, Verjovski-Almeida S, Garcia CR. Human malaria parasites display a receptor for activated C kinase ortholog. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306(4):995-1001.
 - Mair GR, Braks JAM, Garver LS, Wiegant JCAG, Hall N, Dirks RW, et al. Regulation of Sexual Development of *Plasmodium* by Translational Repression. *Science*. 2006;313(5787):667-9.
 - Mair GR, Lasonder E, Garver LS, Franke-Fayard BM, Carret CK, Wiegant JC, et al. Universal features of post-transcriptional gene regulation are critical for *Plasmodium* zygote development. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000767.
 - Mead DA, McClary JA, Luckey JA, Kostichka AJ, Witney FR, Smith LM. Bst DNA polymerase permits rapid sequence analysis from nanogram amounts of template. *Biotechniques*. 1991;11(1):76-8, 80, 2-7.
 - Morahan B, Garcia-Bustos J. Kinase signalling in *Plasmodium* sexual stages and interventions to stop malaria transmission. *Mol Biochem Parasitol*. 2014;193(1):23-32.
 - Moreira CK, Marrelli MT, Jacobs-Lorena M. Gene expression in *Plasmodium*: from gametocytes to sporozoites. *Int J Parasitol*. 2004;34(13-14):1431-40.
 - Muhia DK, Swales CA, Deng W, Kelly JM, Baker DA. The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase

- activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*. 2001;42(2):553-60.
- Muhia DK, Swales CA, Eckstein-Ludwig U, Saran S, Polley SD, Kelly JM, et al. Multiple splice variants encode a novel adenylyl cyclase of possible plastid origin expressed in the sexual stage of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2003;278(24):22014-22.
 - Muller P, Ruckova E, Halada P, Coates PJ, Hrstka R, Lane DP, et al. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*. 2013;32(25):3101-10.
 - Munro JB, Silva JC. Ribonucleotide reductase as a target to control apicomplexan diseases. *Curr Issues Mol Biol*. 2012;14(1):9-26.
 - Murphy SC, Hiller NL, Harrison T, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Mol Membr Biol*. 2006;23(1):81-8.
 - Ngwa CJ, Scheuermayer M, Mair GR, Kern S, Brugel T, Wirth CC, et al. Changes in the transcriptome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during the initial phase of transmission from the human to the mosquito. *BMC Genomics*. 2013;14:256.
 - Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathog*. 2015;11(6):e1004871.
 - Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:681-706.
 - Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):60-71.
 - Paton MG, Barker GC, Matsuoka H, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP, et al. Structure and expression of a post-transcriptionally regulated malaria gene encoding a surface protein from the sexual stages of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;59(2):263-75.
 - Pease BN, Huttlin EL, Jedrychowski MP, Talevich E, Harmon J, Dillman T, et al. Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. *Journal of proteome research*. 2013;12(9):4028-45.

- Petersen BO, Shuman S. DNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase: hydrolysis and glycerololysis of the covalent protein-DNA intermediate. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(11):2091-7.
- Rawlings DJ, Fujioka H, Fried M, Keister DB, Aikawa M, Kaslow DC. α -Tubulin II is a male-specific protein in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1992;56(2):239-50.
- Rodriguez MC, Margos G, Compton H, Ku M, Lanz H, Rodriguez MH, et al. *Plasmodium berghei*: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. *Exp Parasitol.* 2002;101(1):73-6.
- Rubin H, Salem JS, Li LS, Yang FD, Mama S, Wang ZM, et al. Cloning, sequence determination, and regulation of the ribonucleotide reductase subunits from *Plasmodium falciparum*: a target for antimalarial therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(20):9280-4.
- Saeed S, Carter V, Tremp AZ, Dessens JT. Translational repression controls temporal expression of the *Plasmodium berghei* LCCL protein complex. *Mol Biochem Parasitol.* 2013;189(1-2):38-42.
- Sartorello R, Amaya MJ, Nathanson MH, Garcia CR. The *Plasmodium* receptor for activated C kinase protein inhibits Ca^{2+} signaling in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389(4):586-92.
- Saxena AK, Wu Y, Garboczi DN. *Plasmodium* p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. *Eukaryot Cell.* 2007;6(8):1260-5.
- Schemarova IV. The role of tyrosine phosphorylation in regulation of signal transduction pathways in unicellular eukaryotes. *Curr Issues Mol Biol.* 2006;8(1):27-49.
- Shevade S, Jindal N, Dutta S, Jarori GK. Food vacuole associated enolase in *Plasmodium* undergoes multiple post-translational modifications: evidence for atypical ubiquitination. *PLoS One.* 2013;8(8):e72687.
- Shinondo CJ, Lanners HN, Lowrie RC, Jr., Wisner MF. Effect of pyrimethamine resistance on sporogony in a *Plasmodium berghei/Anopheles stephensi* model. *Exp Parasitol.* 1994;78(2):194-202.

- Shuman S. Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro. *J Biol Chem.* 1991;266(30):20576-7.
- Silva-Neto MA, Atella GC, Shahabuddin M. Inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase blocks morphological differentiation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes to ookinetes. *J Biol Chem.* 2002;277(16):14085-91.
- Silvie O, Briquet S, Müller K, Manzoni G, Matuschewski K. Post-transcriptional silencing of UIS4 in *Plasmodium berghei* sporozoites is important for host switch. *Molecular microbiology.* 2014;91(6):1200-13.
- Sinden RE. The cell biology of malaria infection of mosquito: advances and opportunities. *Cell Microbiol.* 2015;17(4):451-66.
- Soroka J, Wandinger Sebastian K, Mäusbacher N, Schreiber T, Richter K, Daub H, et al. Conformational Switching of the Molecular Chaperone Hsp90 via Regulated Phosphorylation. *Molecular Cell.*45(4):517-28.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science.* 2006;313(5791):1287-90.
- Talman AM, Prieto JH, Marques S, Ubaida-Mohien C, Lawniczak M, Wass MN, et al. Proteomic analysis of the *Plasmodium* male gamete reveals the key role for glycolysis in flagellar motility. *Malaria journal.* 2014;13:315.
- Tarun AS, Peng X, Dumpit RF, Ogata Y, Silva-Rivera H, Camargo N, et al. A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(1):305-10.
- Taylor CJ, McRobert L, Baker DA. Disruption of a *Plasmodium falciparum* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Molecular microbiology.* 2008;69(1):110-8.
- Tewari R, Dorin D, Moon R, Doerig C, Billker O. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Molecular microbiology.* 2005;58(5):1253-63.

- Tiburcio M, Sauerwein R, Lavazec C, Alano P. Erythrocyte remodeling by *Plasmodium falciparum* gametocytes in the human host interplay. Trends Parasitol. 2015;31(6):270-8.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, van Lin LHM, de Koning-Ward TF, Sinha R, et al. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. The EMBO Journal. 2001;20(15):3975-83.
- Treeck M, Sanders JL, Elias JE, Boothroyd JC. The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. Cell host & microbe. 2011;10(4):410-9.
- Truman AW, Kristjansdottir K, Wolfgeher D, Hasin N, Polier S, Zhang H, et al. CDK-dependent Hsp70 Phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. Cell. 2012;151(6):1308-18.
- Valpuesta JM, Martin-Benito J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Willison KR. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. FEBS Lett. 2002;529(1):11-6.
- van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J, Waters AP, Braks JA, Dodemont HJ, et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. Cell. 2001;104(1):153-64.
- Vernick KD. Gamete interruptus; a novel calcium-dependent kinase is essential for malaria sexual reproduction. Cell. 2004;117(4):419-20.
- Wang K, Zhao Y, Li M, Gao F, Yang MK, Wang X, et al. Analysis of phosphoproteome in rice pistil. Proteomics. 2014;14(20):2319-34.
- Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. BMC Genomics. 2004;5:79.
- Wolff J. Plasma membrane tubulin. Biochim Biophys Acta. 2009;1788(7):1415-33.
- Wu Y, Nelson MM, Quaile A, Xia D, Wastling JM, Craig A. Identification of phosphorylated proteins in erythrocytes infected by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Malaria journal. 2009;8:105.
- Yebenes H, Mesa P, Munoz IG, Montoya G, Valpuesta JM. Chaperonins: two rings for folding. Trends Biochem Sci. 2011;36(8):424-32.

- Young JA, Fivelman QL, Blair PL, de la Vega P, Le Roch KG, Zhou Y, et al. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(1):67-79