

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Ubiquitinación durante el ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium chabaudi*

TESIS

Que presenta

M. en C. LORENA GONZÁLEZ LÓPEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

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

México, D.F.

DICIEMBRE, 2015

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Entomología molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, con el apoyo de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyectos: 83866 y 18054), UC-MEXUS-CONACyT (CN-10479), ICyTDF (PIFUTP09-298) y Fundación Miguel Alemán A. C (2012 #19).

Durante el desarrollo de la tesis se recibió apoyo de una beca de doctorado del CONACyT con número de registro 225016.

Agradecimientos

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por permitirme ser parte de su equipo y por creer en mí. Gracias por todo este tiempo de apoyo académico y personal, por el apoyo en los momentos difíciles. Te agradezco por ser mi guía, mi psicólogo y sobre todo por tu amistad y cariño.

A la Dra. Febe Cázares Raga por las ideas aportadas, por el análisis de los datos y tu ayuda académica y personal. Gracias por la paciencia y por la amistad a lo largo de todos estos años.

A la Biol. Exp. Leticia Cortés, infinitas gracias por tu apoyo en el trabajo experimental, por tu paciencia y por la entrega en el laboratorio. Gracias por estar al pendiente de todo lo necesario para que pudiera desarrollar este trabajo. Sin tu ayuda y apoyo esto no hubiese sido posible. Infinitas gracias.

A la Dra. Rebe Carballar por tu apoyo, por tu trabajo experimental y aportaciones. Gracias por tu cariño y por ser una guía para este trabajo, pero sobre todo por tu invaluable amistad.

Al Dr. Fernando Favela, por tu apoyo y disposición para en la realización de los análisis *in silico*. Gracias infinitas por la discusión de resultados y por tu amistad.

A las personas del Bioterio del Cinvestav-IPN: Sra. María Teresa Hernández, Secretaria de la Unidad, MVZ. Benjamin Chavez Alvarez, MVZ. Rafael Leyva Muñoz, MVZ Ricardo Gaxiola Centeno, MVZ Octavio Ramos Flores. Gracias por su apoyo con los animales utilizados para este proyecto así como su disposición para cualquier trabajo experimental que se realizó.

Al Dr. Mario Henry Rodríguez por sus valiosas aportaciones, por la discusión y análisis de resultados. Gracias por las enseñanzas, su tiempo y su paciencia.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas, por sus aportaciones, paciencia, entrega y apoyo en todo momento. Con admiración total a su trabajo y perseverancia en un sistema de estudio nada sencillo. Infinitas gracias por todo.

A mi comité tutorial: Dr. Mario Alberto Rodríguez, Dra. Patricia Talamás Rohana, Dra. Rosa María del Ángel, Dra. Guadalupe Reyes por su tiempo, sus aportaciones, por estar cuando lo necesite. Gracias.

A mis compañeros del laboratorio 12 de Entomología Molecular: Juan Manuel, M. En C. Antonio Celestino, Sr. Juan, García, Dr. Hugo Sánchez, Dra. Cecilia González, Dr. Alberto Alonso, M. en C. Abel Trujillo, M. en C. Ángel Rubio, Ileana gracias por su paciencia, por sus aportaciones, por su apoyo durante estos años de camino juntos. No hubiera sido lo mismo sin cada uno de ustedes.

Dedicatorias

A mis padres, Pilar López y Ezequiel González. Gracias por su paciencia, por creer en mi, por su infinito amor y por su apoyo en todo momento. Hoy después de algunos años (más de los que creí) completo esta etapa de mi vida y este logro es de ustedes también. Infinitas gracias por formarme y fomentar en mi una actitud de trabajo, de estudio, gracias por ayudarme a ser la persona que hoy soy.

A mi hermano Carlos, mi cuñada Vero por la hermosa familia que son y por enseñarme que además del trabajo hay vida y que puede ser corta por lo que tenemos que disfrutarla a cada momento. A mi sobrino Jero, porque me diste los motivos y fuerza para no desertar y seguir adelante (**Te amo angelito**).

A PW Jacob Antonio Andrade, algunos años y mucho amor. Gracias por enseñarme que pueden haber cosas malas pero cuando uno esta acompañado no hay batalla que no se gane. Gracias por creer en mi, por tu paciencia, por las risas, por alentarme y hacerme tan feliz. Gracias por enseñarme que vale la pena vivir y soñar; por enseñarme a luchar y levantarme después de caer. **TE AMO.**

A la Rebequita Carballar, ¿qué sería de mi sin ti? Gracias por ser mi paño de lágrimas, mi amiga incondicional, por alentarme, por escucharme y regañarme. Te quiero muchísimo y espero la vida nos de muchas naranjas.

Al Dr. Adolfo Martínez Palomo, por su apoyo incondicional, mi admiración y cariño total para toda la vida.

A mis amigas de toda la vida: Paola, Mony, Andi, Sofi, Claudia, Anita, Guille por enseñarme que la verdadera amistad existe y que es para toda la vida. ¡Las quiero!

A mis amigos del Cinvestav, #132, UNAM: Mike, Jaeson Calla, Héctor Jiménez, Juanks, Edgar Zazo, Alma, Deyanira, Héctor Martínez, César Baez, Fernando Favela, Salvador, Alonso, Camacho, David, César Alan Ruíz, Ubaldo, Dashi, Juan Manuel, Iván Eliab y Santiago Rosales, a todos ustedes por su apoyo, su cariño, por el aprendizaje y las lecciones de vida. ¡Los quiero!

A mis compañeros y amigos de foto de Casa del Lago, UNAM: Dolores, Federico, Fernando, Gloria, Paty porque en lo más negro y gris su visión del mundo y de la vida me hizo renacer. Los admiro y quiero.

A mis niños del 2206 (Facultad de Medicina, UNAM) y en especial a la Dra. Aurora Candil porque cada año aprendo más de ustedes y me han hecho ser mejor profesionista, docente y sobre todo persona.

RESUMEN

El ciclo celular de una célula eucarionte típica se encuentra regulado por diversos mecanismos, entre estos están las modificaciones postraduccionales; las más estudiadas son las fosforilaciones y ubiquitinaciones que determinan que la progresión del ciclo sea de forma ordenada y específica. En particular la ubiquitina, es una molécula de 76 aminoácidos que va a marcar a su proteína blanco por medio de una reacción enzimática dependiente de energía que involucra, en términos generales, la acción de tres enzimas (E1, E2 y E3). La molécula de ubiquitina posee siete residuos de lisina que, a su vez, son aceptores de otras moléculas de ubiquitina, posibilitando la formación de cadenas. La cadena de poliubiquitina de Lys-48, es la cadena de ubiquitina más estudiada y cuando ésta modifica a las proteínas las dirige al complejo 26S (proteasoma) para su destrucción (proteasoma). En *Plasmodium sp.* se desconoce cómo el parásito regula el paso de una fase a la siguiente a lo largo de su ciclo de vida. En el ciclo eritrocítico, actualmente se sabe que hay genes que se expresan en forma cíclica y que muchos de estos presentan un pico máximo en alguna de sus fases. El conocer los cambios en abundancia que presentan las proteínas y los mecanismos que las regulan, nos ayudará a identificar moléculas esenciales para el desarrollo del parásito y su uso potencial como blancos para el desarrollo de nuevos medicamentos contra el parásito.

En este trabajo usando al parásito murino *P. chabaudi* como modelo de estudio identificamos que el esquizonte es la fase con mayor abundancia de proteínas ubiquitinadas, tanto en forma de ubiquitina total como en el residuo Lys-48. Además se seleccionaron proteínas ubiquitinadas de las tres fases (anillos, trofozoitos y esquizontes) de las cuales 28 se identificaron por espectrometría de masas y dos se seleccionaron para la identificación del sitio de ubiquitinación en donde se identificaron en el mismo punto dos proteínas de choque térmico de la familia de las Hsp70 con un residuo ubiquitinado en la posición 437 (HSP70 de 74 kDa) y en la posición 222 (HSP70 de 73 kDa). La segunda proteína correspondió a la uridina fosforilasa que presentaba ubiquitina en las posiciones 101 y 211. En los tres estadios la mayor cantidad de las proteínas ubiquitinadas identificadas participan en la síntesis de nucleótidos (25%) seguido por la glucólisis (18%) y el metabolismo de proteínas (14%). Además, identificamos componentes similares a los complejos de E3 ligasas de tipo RING-Cullina en *P. chabaudi*, que presentaron una expresión transcripcional cíclica con un máximo de expresión durante la fase de esquizonte. Finalmente, para identificar la proteína similar a ubiquitina, Nedd8, que se conoce que modifica a las proteínas cullinas, se identificó a la proteína *moonlighting* factor de alargamiento 1 alfa como posiblemente está neddylado durante todas las fases del ciclo intraeritrocítico. En conjunto, estos resultados indican que *P. chabaudi* posee la maquinaria para ubiquitinar proteínas y sugiere que el parásito puede utilizar este mecanismo para regular la concentración de las proteínas a lo largo del ciclo intraeritrocítico.

ABSTRACT

A typical eukaryotic cell cycle is regulated by diverse mechanisms, such as posttranslational modifications; the most studied are the phosphorylation and ubiquitination that determine that the cell cycle progress occurs in an order and specific manner. In particular, ubiquitin is a 76 amino acid molecule that tag a target protein by an energy dependent enzymatic reaction that involves the action of three enzymes (E1, E2, and E3). Also, the ubiquitin molecule has seven lysine residues that are acceptors of other ubiquitin molecules, facilitating the chain formation (polyubiquitin). The Lys48 polyubiquitin chains are the most studied since tag proteins for their destruction by the ubiquitin proteasome system. In *Plasmodium sp.* it is unknown how the parasite determines and regulates each phase throughout its life cycle. To date, it is known that during the erythrocytic cycle there are genes that presents a cyclic expression and many of them are expressed with a maximum peak in one phase. Determining which proteins presents this behavior and the mechanisms that regulate protein abundance will help us to understand which molecules that are essential for the parasite's development and eventually, their potential use as drug targets or the development of new medications against the parasite.

In this work, using the murine parasite *P. chabaudi* as a research model, we identified that either total ubiquitin and the Lys48 polyubiquitin were more relevant during the schizont stage. Furthermore, 28 ubiquitinated proteins from the three stages (rings, trophozoites and schizontes) were identified by mass spectrometry and two were selected for ubiquitinated site identification wherein two proteins within the same spot belonging to the heat shock protein family were identified, Hsp70 with an ubiquitinated residue at position 437 (HSP70 of 74 kDa) and position 222 (HSP70 of 73 kDa). The second protein was the uridine phosphorylase with ubiquitination in positions 101 and 211. In the three stages the majority of the identified ubiquitinated proteins were involved in the nucleic acid synthesis (25%) followed by glycolysis (18%) and protein metabolism (14%). In addition, we identified similar components of the Cullin-RING E3 ligase (CRL) in *P. chabaudi* that showed a cyclical transcriptional expression with a maximum abundance during the schizont stage. Finally, to identify the ubiquitin-like protein Nedd8, which is known to modify cullins for their activation, we identified the moonlighting protein elongation factor 1 alpha as possibly neddylated during all phases of the intraerythrocytic cycle. Together, these results indicate that *P. chabaudi* possesses the machinery to ubiquitinate proteins and suggest that the parasite can use this mechanism to regulate protein abundance throughout the intraerythrocytic cycle.

I. ÍNDICE	
I. Índice	1
II. Lista de Figuras	3
III. Lista de Tablas	5
IV. Lista de abreviaturas	6
V. Introducción	9
5.1 GENERALIDADES	9
5.2 CICLO DE VIDA DE <i>PLASMODIUM SPP.</i>	10
5.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	17
5.4 MALARIA DE ROEDORES	20
VI. Antecedentes	22
6.1 UBIQUITINA	22
6.2 UBIQUITINACIÓN.....	24
6.2.1 <i>E3 ligasas de tipo ring</i>	27
6.3 CÓDIGO DE UBIQUITINA	30
6.4 PROTEASOMA.....	33
6.4.1 <i>Inhibidores de proteasoma</i>	36
6.4.1.1 Lactacistina	36
6.5 CICLO CELULAR	38
6.5.1 <i>Fase G₁</i>	42
6.5.2 <i>Fase S</i>	44
6.5.3 <i>Fase G2-M</i>	46
6.6 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR UBIQUITINACIÓN	47
6.7 CICLO CELULAR EN <i>PLASMODIUM SPP.</i>	51
6.7.1 <i>Modificaciones postraduccionales en proteínas de Plasmodium sp.</i>	53
6.7.1.1 Fosforilación	53
6.7.1.2 Ubiquitina.....	55
6.7.1.2.1 Complejos de ubiquitinación en <i>Plasmodium sp.</i>	57
6.7.1.2.2 Proteasoma en <i>Plasmodium</i>	59
6.7.1.2.2.1 Inhibidores de proteasoma en <i>plasmodium sp.</i>	61
VII. Justificación	64
VIII. Hipótesis	64
IX. Objetivos	65
9.1 OBJETIVO GENERAL	65
9.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	65
X. Materiales y Métodos	66
10.1 PARÁSITOS Y ANIMALES.....	66
10.2 PURIFICACIÓN POR GRADIENTES DE PERCOLL-SACAROSA	66
10.3 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	67
10.4 INTERACCIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO SCF.....	67
10.5 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE CDNA.....	68

10.6	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEÍCOS DE <i>P. CHABAUDI</i>	68
10.7	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)	69
10.8	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	69
10.9	WESTERN BLOT	70
10.10	MICROSCOPÍA CONFOCAL	71
10.11	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	71
10.12	ESPECTROMETRÍA DE MASAS	72
10.13	ANÁLISIS DE RT-PCR CUANTITATIVA POR TIEMPO REAL	74
XI	Resultados	75
11.1	ABUNDANCIA DE FASES EN EL CICLO INTRAERITROCÍTICO DE <i>P. CHABAUDI</i>	75
11.2	UBIQUITINA EN <i>P. CHABAUDI</i>	77
11.3	ABUNDANCIA Y LOCALIZACIÓN DE UBIQUITINA TOTAL Y POLIUBIQUITINACIÓN EN LYS48 DURANTE EL CICLO INTRAERITROCÍTICO DE <i>P. CHABAUDI</i>	80
11.4	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS.....	83
11.4.1	<i>Inmunodetección de proteínas ubiquitinadas en el ciclo intraeritrocítico de P. chabaudi</i>	83
11.5	ANÁLISIS DEL COMPLEJO DE UBIQUITINACIÓN SIMILAR A SCF EN <i>P. CHABAUDI</i>	99
11.5.1	<i>E3 ligasa de tipo ring en P. chabaudi</i>	99
11.5.2	<i>Proteínas similares a cullina de P. chabaudi</i>	104
11.5.3	<i>Gen de P. chabaudi que codifica una molécula similar a la proteína de asociación a cinasa de fase S-1 (Skp-1)</i>	110
11.5.4	<i>Docking molecular entre las proteínas del complejo SCF en P. chabaudi</i>	115
11.6	DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA SIMILAR A UBIQUITINA- NEDD8 DURANTE EL CICLO INTRAERITROCÍTICO.....	119
XII.	Discusión	127
12.1	UBIQUITINA	127
12.2	PROTEÍNAS UBIQUITINADAS	130
12.3	IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UBIQUITINACIÓN.....	137
12.4	COMPLEJO DE UBIQUITINACIÓN SIMILAR A SCF	138
12.5	NEDDYLACIÓN	141
XIII.	Conclusiones	144
XIV.	Perspectivas	146
XV.	Referencias	147

II. Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	11
Figura 2. Esquizogonia eritrocítica de <i>P. falciparum</i>	15
Figura 3. Esporogonia en el mosquito <i>Anopheles sp.</i> infectado.....	17
Figura 4. Casos confirmados de malaria en el 2013 por cada 1000 habitantes	18
Figura 5. Estimación del porcentaje de enfermos por malaria en América en el 2005.....	19
Figura 6. Esquema de ubiquitina y sus genes en humanos..	24
Figura 7. Vía de ubiquitinación.....	27
Figura 8. Dominio RING y estructura general del complejo cullina-RING ligasa (CRL) en eucariontes superiores.....	30
Figura 9. Formas de ubiquitinación.	33
Figura 10. Estructura del Proteasoma 26S.	35
Figura 11. Mecanismo de inhibición del proteasoma por lactacistina y β -lactona.	37
Figura 12. Modelo clásico del ciclo celular mitótico en mamíferos.	39
Figura 13. Cinasas dependientes de ciclina (CDK) y su papel en la progresión a través del ciclo celular y su papel en la progresión del ciclo celular.	41
Figura 14. Transducción de señales en el control del ciclo celular entre las fases G1 a S.	45
Figura 15. Control del ciclo celular entre las fases G2 a M.....	47
Figura 16. Degradación mediada por ubiquitina de reguladores del ciclo celular: complejos APC/C y SCF.	50
Figura 17. Esquema general del ciclo de división asexual intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	53
Figura 18. Ubiquitina en <i>P. falciparum</i>	57
Figura 19. Localización subcelular de la subunidad β y γ en fases sanguíneas y gametocitos de <i>P. falciparum</i>	60
Figura 20. Transcritoma del ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	61
Figura 21. Parasitemia de <i>P. chabaudi</i> en ratones BALB/c machos.	76
Figura 22. Formas del ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i> purificadas.....	76
Figura 23. Representación de los tres genes de ubiquitina en <i>P. chabaudi</i>	77
Figura 24. Estructura y organización del gen de poliubiquitina en diferentes especies de <i>Plasmodium</i>	78
Figura 25. Monómero de ubiquitina en <i>Plasmodium spp.</i>	79
Figura 26. Abundancia de ubiquitina a lo largo del ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i>	81
Figura 27. Localización de Ub en el ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i>	81
Figura 28. Proteínas ubiquitinadas en el ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i>	85
Figura 29. Comparación de las proteínas de las fases del ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i>	86

Figura 30. Detección de proteínas ubiquitinadas en la fase de anillo de <i>P. chabaudi</i> .	87
Figura 31. Detección de proteínas ubiquitinadas en la fase de trofozoito de <i>P. chabaudi</i> .	88
Figura 32. Detección de proteínas ubiquitinadas en la fase de esquizonte de <i>P. chabaudi</i> .	89
Figura 33. Funciones de las proteínas identificadas por ms en las tres fases del ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i> .	95
Figura 34. Identificación por MS/MS del sitio de ubiquitinación de Hsp70-I.	96
Figura 35. Identificación por MS/MS del sitio de ubiquitinación de Hsp70-III.	96
Figura 36. Identificación por MS/MS del sitio de ubiquitinación de uridina fosforilasa.	97
Figura 37. Abundancia de Hsp70 en el ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i> .	98
Figura 38. Esquema del gen <i>PcRbx1</i> .	99
Figura 39. Expresión relativa del gen similar a Rbx-1 en <i>P. chabaudi</i> .	101
Figura 40. Alineamiento de la secuencia de la E3 ligasa tipo RING Rbx1 de <i>P. chabaudi</i> con la de diferentes especies.	102
Figura 41. Estructura terciaria y superposición de la enzima E3 ligasa de <i>P. chabaudi</i> .	102
Figura 42. Esquema de dos genes similares a cullina en <i>P. chabaudi</i> .	104
Figura 43. Expresión relativa del gen similar a <i>cul1</i> en <i>P. chabaudi</i> .	107
Figura 44. Expresión relativa del gen similar a <i>cul2</i> en <i>P. chabaudi</i> .	107
Figura 45. Árbol filogenético de las dos proteínas similares a cullina en <i>P. chabaudi</i> .	108
Figura 46. Dominios funcionales en las dos proteínas similares a cullina en <i>P. chabaudi</i> .	109
Figura 47. Estructura terciaria y superposición de la proteína similar a cullina PcCul2 de <i>P. chabaudi</i> .	109
Figura 48. Esquema del mRNA de <i>PcSkp1</i> .	110
Figura 49. Expresión relativa del gen similar a <i>skp1</i> en <i>P. chabaudi</i> .	112
Figura 50. Análisis de la secuencia y dominios de Skp1 en <i>P. chabaudi</i> .	113
Figura 51. Estructura terciaria y superposición de la proteína similar a Skp1 en <i>P. chabaudi</i> .	114
Figura 52. Acoplamiento de las proteínas cullina (PcCul2) y Rbx1(PcRbx1) de <i>P. chabaudi</i> .	116
Figura 53. Acoplamiento de las proteínas cullina y Rbx1 de <i>P. chabaudi</i> y <i>H. sapiens</i> .	117
Figura 54. Acoplamiento de las proteínas cul2 (PcCul2) y skp1 (PcSkp1) de <i>P. chabaudi</i> .	118
Figura 55. Alineamiento de la proteína similar a ubiquitina Nedd8.	120
Figura 56. Presencia de Nedd8 en las fases intraeritrocíticas de <i>P. chabaudi</i> .	121
Figura 57. Presencia de una proteína neddylada a lo largo del ciclo intraeritrocítico de <i>P. chabaudi</i> .	122
Figura 58. Identificación por LC- MS/MS del sitio de neddylación por de la proteína de 55 kda aislada de esquizontes de <i>P. chabaudi</i> .	126

III. Lista de Tablas

TABLA 1. PORCENTAJE DE FASE PARASITARIA DURANTE EL CICLO INTRAERITROCÍTICO DE 24 H DE <i>P. CHABAUDI</i> ..	75
TABLA 2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS EN LA FASE DE ANILLO (A), TROFOZOITO (T) Y ESQUIZONTE (E) POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	90
TABLA 3. SECUENCIAS DE PÉPTIDOS DONDE SE IDENTIFICÓ EL SITIO DE UBIQUITINACIÓN	95
TABLA 4. INICIADORES PARA LA QRT-PCR DEL GEN <i>PCRBX-1</i> DE <i>P. CHABAUDI</i>	99
TABLA 5. INICIADORES PARA LA QRT-PCR DEL LOS DOS GENES SIMILARES A CULLINA DE <i>P. CHABAUDI</i>	105
TABLA 6. INICIADORES PARA LA QRT-PCR DEL GENE SIMILAR A SKP-1 DE <i>P. CHABAUDI</i>	110
TABLA 7. IDENTIFICACIÓN POR LC-MS/MS DE LA PROTEÍNA DE 55 KDA Y PI 10 NEDDYLADA AISLADA DE ESQUIZONTES DE <i>P. CHABAUDI</i>	123
TABLA 8. SECUENCIAS DE PÉPTIDOS DONDE SE IDENTIFICÓ EL SITIO DE NEDDYLACIÓN	123

IV. Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AMA-1	Antígeno de membrana apical-1
APC	Complejo promotor de la anafase
Atg-8/-12	proteína de autofagia-8/-12
ATP	Adenosín trifosfato
bp	pares de bases
BT	Amortiguador de Transferencia
Camk	Cinasas dependientes de calcio/calmodulina
CDK	Cinasa dependiente de Ciclina
CDPK	Cinasa dependiente de Calcio
CHIP	Proteína de interacción con C-terminal de Hsp70
CK1	Caseína cinasa 1
CKI	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclina
CSP	Proteína del circumsporozoito
CTD	Dominio carboxilo terminal
C-terminal	Carboxilo terminal
CP	Partícula central
CR1	Receptor del complemento 1
CRL	Ligasas E3 RING-cullinas
CUL	Cullina
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
DUB	Desubiquitinasa
DYRK	Cinasas reguladoras de tirosina de actividad dual
EBL	Ligandos de unión al eritrocito
EF1A	Factor de elongación 1 alfa
ESI	Ionización por electrospray
EST	Marcador de secuencia expresada
FA	Ácido Fórmico
FDR	Tasa de falsos descubrimientos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HECT	Homólogo al carboxilo terminal de E6-AP
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de rábano
HSPG	Proteoglicanos tipo heparán sulfato
Hub1	Proteína homóloga a ubiquitina-1
IBR	Entre Ring (<i>"in between-RING"</i>)
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
ISG15	Proteína estimulada por interferón de 15 kDa
KAHRP	Proteínas ricas en histidinas asociadas al knob

kDa	KiloDalton
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
Lys	Lisina
MAP	Proteína activada por mitógeno
MAPK	Cinasa activada por mitógeno
MS	Espectrometría de masas
MSP1	Proteína de superficie del merozoito 1
Nedd8	Precursor neuronal expresado en la célula regulado hacia abajo en el desarrollo-8
N-terminal	Amino terminal
NTD	Dominio amino terminal
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PBS	Amortiguador Fosfato Salino
PDB	Protein data bank
PEXEL	Elemento de exportación de <i>Plasmodium</i>
PfEMP1	Proteína de membrana del eritrocito 1 de <i>Plasmodium falciparum</i>
pI	Punto isoeléctrico
PK	Proteína cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPM	Membrana plasmática del parásito
PTM	Modificaciones postraduccionales
PV	Vacuola parasitófora
PVM	Membrana vacuolar parasitófora
RING	Nuevo gen realmente interesante
RMSD	Desviación de la raíz cuadrada media
RNA	Ácido Ribonucleico
ROC	Regulador de cullinas
RP	Partícula regulatoria
Rpt	Partícula regulatoria triple A
Rpn	Partícula regulatoria no ATPasa
SCF	Complejo SKP-Cullina-proteína de caja F
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal de bovino
Skp	Proteína asociada a cinasa de fase S
SR	Receptor de sustrato
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Amortiguador salino-Tris
TBS-T	TBS-Tween20
TFA	Ácido trifluoroacético
ToF	Tiempo de vuelo
TRAP	Proteína de adhesión relacionada a trombospondina
TyrK	Cinasas de tirosina

Ub	Ubiquitina
UFD	Ubiquitina de fusión
Ufm1	Proteína modificadora del plegamiento de ubiquitina
Urm1	Modificador relacionado a ubiquitina-1
UTR	Región no traducida
WB	Western-blot
WHO	Organización Mundial de la Salud

V. Introducción

5.1 Generalidades

Los protozoarios del phylum Apicomplexa se separaron de otros linajes de eucariontes antes de la divergencia de animales y hongos. Se cree que los apicomplexa se encuentran más relacionados a dinoflagelados y ciliados, que en conjunto forman el grupo de los alveolados (Wolters, 1991). El phylum Apicomplexa incluye a más de 5000 especies que son parásitos intracelulares obligados, de los que algunos son agentes etiológicos de enfermedades en vertebrados (Arisue and Hashimoto, 2015). Dentro de las enfermedades más importantes causadas por miembros de este Phylum están las relacionadas con los géneros *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*. En particular, *T. gondii* es un protozoario zoonótico que infecta a más de 200 especies de mamíferos y aves. La mayoría de las infecciones en humanos inmunocompetentes son asintomáticas; sin embargo, pueden causar enfermedades severas en el feto durante y después del embarazo y en pacientes inmunocomprometidos. En el caso de *C. parvum* este parásito se encuentra relacionado a epidemias de diarrea, incluso en áreas urbanas a través de agua contaminada (Li *et al.*, 2004).

Dentro de este phylum, el género *Plasmodium*, responsable de la malaria o paludismo, es el que causa la infección más importante en el humano y es un grave problema de salud pública en las áreas tropicales y sub-tropicales con un estimado de 219 millones de casos y 660,000 defunciones en 2010 (WHO, 2014).

Malaria en italiano significa “mal aire”, este nombre proviene de la creencia de que esta enfermedad provenía del aire pútrido del agua estancada. Ronald Ross descubrió el 20 de agosto de 1897, en Secunderabad, India, que los mosquitos son los transmisores de la Malaria. Alphonse Laveran, descubrió a los parásitos en glóbulos rojos de pacientes con malaria en 1880 (Knell and Wellcome Tropical Institute., 1991).

Cinco especies de malaria infectan al humano:

- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi* (White, 2008)

En la actualidad, se han generado avances tecnológicos importantes para el análisis de la biología molecular de los Apicomplexa. En 1996, se estableció un consorcio internacional para determinar la secuencia de 23 Mb del genoma de *P. falciparum* cepa 3D7, resultando su publicación en 2006 (Gardner *et al.*, 2002). Esta secuencia terminada se encuentra en la página PlasmoDB versión 13.0, que se liberó desde Octubre del 2002 (Bahl, *et al.*, 2003).

Complementariamente, en varios apicomplexa también se han generado bases de datos de ESTs (de las siglas en inglés: expressed sequence tag) las cuales permiten tener una visión general de los mensajeros expresados en un momento dado de la vida de un organismo. En la actualidad se ha generado un número relativamente grande de datos de EST para *T. gondii*, *Eimeria tenella* y *P. falciparum* y números sustanciales de ESTs para *Neurospora caninum*, *P.berghei*, *P. yoelii*, *Sarcocystis neurona* y *T. parva* (Li *et al.*, 2004).

En el sitio de ApiEST-DB, a partir del 2004, se tiene acceso a bases de datos de ESTs, con a 61,116 entradas de *P. falciparum*, 10,023 de *T. gondii*, 28,550 de *E. tenella*, 4,949 de *S. neurona* y 3,121 de *N. caninum*. Actualmente, estos datos de EST están accesibles en el sitio NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>)

5.2 Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

El ciclo de vida de *Plasmodium* es extremadamente complejo, requiriendo de la expresión de proteínas especializadas en los hospederos vertebrado e invertebrado, para la supervivencia intracelular y extracelular, invasión de diferentes tipos de células y evasión de la respuesta inmune. El ciclo de vida puede separarse en una secuencia de cuatro etapas, las cuales son:

1. Fertilización, la fase sexual, se lleva a cabo en el estómago de un mosquito
2. Esporogonia, la primera fase asexual, en la pared del estómago y cuerpo del mosquito.
3. Esquizogonia hepática, la segunda fase asexual, en el hígado de vertebrados
4. Esquizogonia eritrocítica, la tercera fase asexual, en eritrocitos de vertebrados.

Para que el parásito complete estas cuatro fases requiere de formas invasivas las cuales son cuatro: oocineto, esporozoíto, merozoíto hepático y merozoíto eritrocítico.

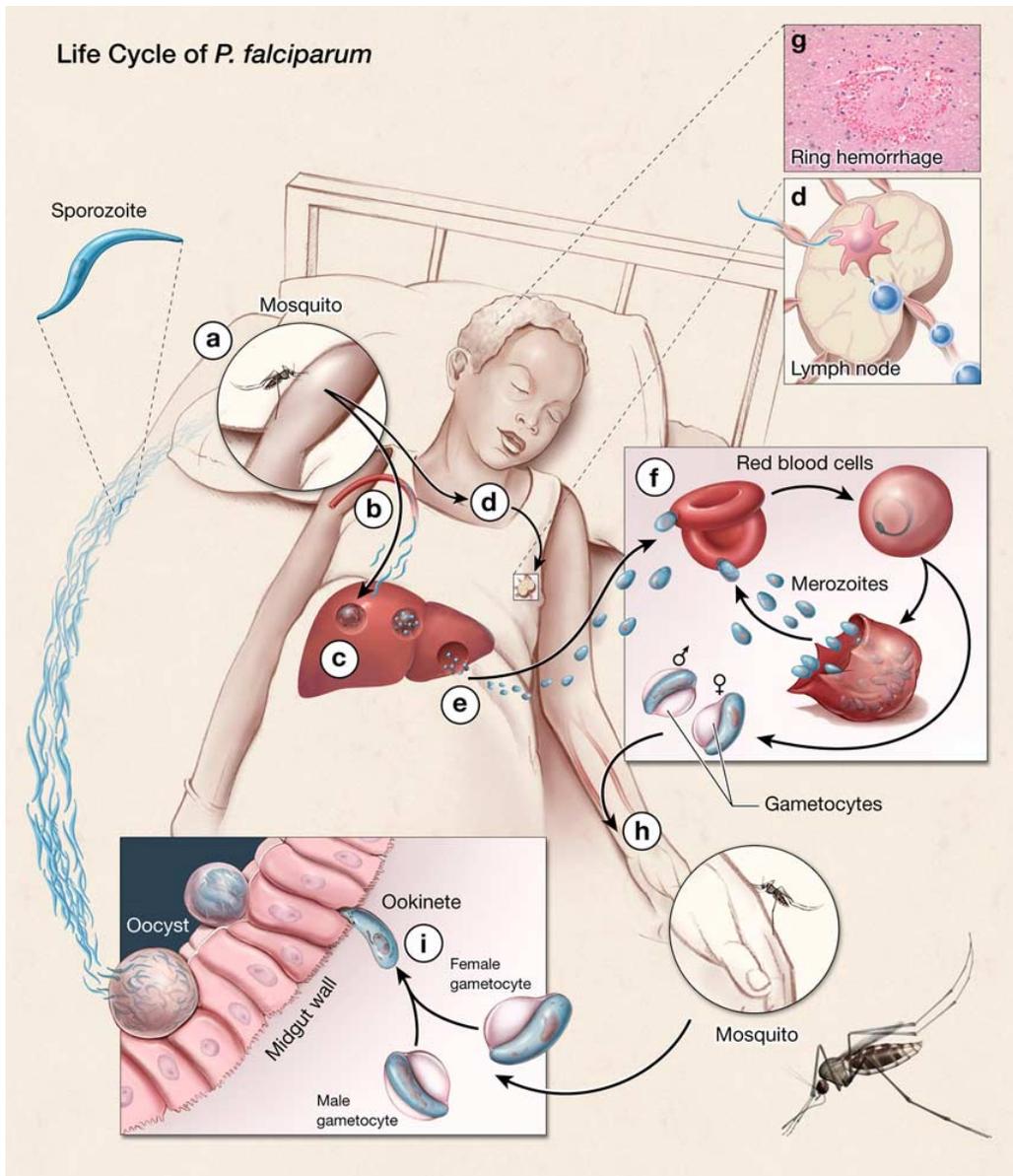


Figura 1. Ciclo de Vida de *Plasmodium falciparum* a) Inoculación de esporozoítos al huésped humano; b) Migración de esporozoítos al hígado; c) Esquizogonia hepática; d) Migración de esporozoítos a ganglio linfático; e) Liberación de merozoítos a torrente circulatorio; f) Esquizogonia eritrocítica; h) Ingestión de macro y microgametocitos; i) Esporogonia dentro del Anofelino (Pierce and Miller, 2009)

a) Fase asexual (esquizogonia hepática)

Durante la alimentación, el mosquito hembra del género *Anopheles* (o bien, *Aedins* y *Culicinos* dependiendo de la especie de *Plasmodium*), pica en repetidas ocasiones antes de obtener sangre ("probing"). Un mosquito infectado en promedio inyecta 100 esporozoítos (Ejigiri and Sinnis, 2009). Los esporozoítos contenidos en las glándulas salivales del mosquito son liberados

predominantemente en la dermis. La mayoría de estos parásitos residen en la piel durante 1 a 6 h, mientras que el 20% migra a través de la linfa directamente a los nódulos linfáticos de la piel, en donde se inicia una respuesta inmune adaptativa (Ejigiri and Sinnis 2009) (Figura 1b, 1d). La mayoría de los esporozoítos no logra migrar a los nódulos linfáticos y son destruídos en el sitio de inoculación, mientras que una pequeña proporción encuentra la forma de llegar al vaso sanguíneo más cercano. Después de cruzar la barrera endotelial, los esporozoítos entran a la circulación y llegar al hígado, donde son detenidos en los sinusoides hepáticos (Bertolino and Bowen, 2015, Suarez *et al.*, 2013). El sinusoides hepático está compuesto de células endoteliales fenestradas y células de Kupffer, que son macrófagos residentes. Las células endoteliales fenestradas son pequeñas y permiten el paso libre de los esporozoítos. Además, se ha reconocido que las células de Kupffer son utilizadas como portal para el ingreso a las células hepáticas (Ejigiri and Sinnis, 2009, Frevert *et al.*, 2006).

La especificidad de la relación del esporozoíto con los hepatocitos sobre otras células del organismo se debe al reconocimiento de los proteoglicanos tipo heparán sulfato (HSPG) del hígado, este contacto activa a los parásitos por medio de la proteína cinasa dependiente de calcio 6 (CDPK6) para cambiar al parásito de un modo migratorio a uno invasivo (Ejigiri and Sinnis, 2009).

La invasión del hepatocito es un proceso activo que requiere de una liberación coordinada de proteínas de los organelos apicales. Las proteínas secretadas contienen dominios de adhesión a la célula. Las proteínas mejor caracterizadas son la proteína circumsporozoítica (CSP), la proteína de superficie más representada en el esporozoito, y dos proteínas del micronema, la proteína de adhesión relacionada a trombospondina (TRAP) y el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) (Ejigiri and Sinnis, 2009). El esporozoíto se envuelve en una membrana intracelular denominada vacuola parasitófora. Después de un periodo inicial de desarrollo no replicativo, que tiene una duración de aproximadamente 24 horas en *P. berghei*. El parásito intracelular inicia un programa de replicación asexual. Este inicia con varias rondas de división nuclear para formar un sincicio multinucleado o esquizonte, junto con un gran aumento en el tamaño de la vacuola parasitófora para acomodar al parásito en crecimiento. Este proceso da lugar a miles de merozoítos. Aproximadamente 55 h después de la invasión del hepatocito, la membrana plasmática del esquizonte comienza a invaginarse alrededor de grupos de núcleos del parásito (Suarez *et al.*, 2013). Al final de la fase hepática, estos merozoítos son empaquetados en merosomas, lo que

facilita su transporte al torrente circulatorio (Figura 1c, 1e). Una vez que estos alcanzan los capilares pulmonares, los merozomas se rompen y liberan a merozoítos para infectar a la nueva célula blanco, los eritrocitos (Graewe *et al.*, 2011).

En el caso específico de *P. vivax* y *P. ovale*, algunos esporozoitos entran al hígado y no se desarrollan inmediatamente. Algunos se quedan en forma de parásitos dormidos denominados **hipnozoítos**. Estos persisten por meses e inclusive en años y causan las recaídas tardías (Prudencio *et al.*, 2006).

b) Fase asexual (esquizogonia eritrocítica)

La fase eritrocítica del parásito es responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Después de la ruptura de los esquizontes hepáticos, cada merozoito liberado puede invadir de manera rápida un eritrocito. Diferentes estudios han demostrado que moléculas de superficie del eritrocito, tales como el ácido siálico, las glucoforinas A, B y C, el receptor del complemento 1 (CR1) en el caso de *P. falciparum* y el receptor de antígenos duffy para quimocinas (DARC) para *P. vivax*, son receptores para la invasión del merozoíto (Hafalla *et al.*, 2011). Por parte del parásito, los ligandos de unión al eritrocito (EBLs) son una familia de proteínas transmembranales que permiten la interacción y reconocimiento del eritrocito. En caso de *P. falciparum* se han descrito la PfEBA175 y PfEBL1 (Hafalla *et al.*, 2011).

Además, la proteína de superficie del merozoito 1 (MSP1) es una molécula central en los merozoítos para la invasión del eritrocito (Hafalla *et al.*, 2011). Para ingresar al glóbulo rojo, el parásito induce una ruptura controlada y transitoria de la organización normal de la membrana del eritrocito. Junto con la invasión de la célula hospedera, el parásito forma la vacuola parasitófora (PV) (Maier *et al.*, 2009). Durante el ciclo intraeritrocítico el parásito se rodea de tres membranas: la membrana vacuolar parasitófora (PVM) que se deriva de la membrana del eritrocito huésped después de la invasión, la membrana plasmática del parásito (PPM) y la membrana del eritrocito (Lazarus *et al.*, 2008).

Los cambios inducidos en la célula huésped por el parásito incluyen la disminución de la deformabilidad de la membrana del eritrocito y un aumento notable de la permeabilidad de la membrana a solutos de bajo peso molecular. Este incremento es mediado por “nuevas vías de

permeabilidad” que juegan un papel importante para la obtención de nutrientes esenciales, la exportación de metabolitos de desecho y para alterar la composición del citoplasma de la célula hospedera (Tilley *et al.*, 2011).

Después de la infección del eritrocito por el parásito, aparecen nuevas vías de permeabilización con propiedades un poco distintas a cualquiera de los sistemas propios de los eritrocitos. La mayoría de las proteínas exportadas poseen una secuencia señal pentamérica (RxLxE/Q) denominada “elemento de exportación de *Plasmodium*” (PEXEL). Este motivo se procesa en el retículo endoplásmico por una proteasa, Plasmepsina V y las proteínas son transportadas a la vacuola parasitófora (Tilley *et al.*, 2011).

Durante su vida dentro del eritrocito, el parásito digiere el 80% de la hemoglobina del eritrocito para el crecimiento y replicación asexual. La internalización de la hemoglobina es mediada por estructuras endocíticas (citostomas) en la membrana plasmática del parásito y en la membrana vacuolar parasitófora y se transfiere a la vacuola digestiva por medio de vesículas (Lazarus *et al.*, 2008). Aquí la hemoglobina se degrada por proteasas; algunos de los aminoácidos liberados se usan para síntesis de proteínas y el resto produce hematina. La hematina se secuestra en una forma cristalina conocida como hemozoina (Tilley *et al.*, 2011, Lazarus *et al.*, 2008). Además, para hacer su microambiente más adecuado el parásito exporta un estimado de 400 proteínas (incluyendo cinasas, lipasas, adhesinas, proteasas y proteínas similares a chaperonas) a la célula hospedera (Tilley *et al.*, 2011).

Una vez establecido, el parásito entra en una fase de maduración altamente metabólica, la fase de trofozoíto, previo a su replicación. Desde las 15 h post-invasión, en el ciclo de *P. falciparum*, hay un aumento progresivo en la actividad metabólica y biosintética dentro del eritrocito, la tasa de utilización de la glucosa y la producción de ácido láctico por las células parasitadas aumenta hasta 50-100 veces en comparación de aquéllas que no lo están (Roth, 1990). Además, en esta fase inicia la replicación del material genético. En *P. falciparum*, la síntesis de DNA inicia en cultivos sincrónicos entre las 28 y 31 h después de la invasión de merozoitos y el contenido de DNA aumenta en un lapso de 8 a 10 h (Arnot and Gull, 1998). Una vez completada la replicación del DNA y el consumo casi completo del eritrocito, los trofozoítos llevan a cabo el proceso denominado esquizogonia, donde se lleva a cabo una serie de divisiones nucleares sin citocinesis

para formar, en el caso de *P. falciparum*, entre 18 y 36 merozoítos, los que romperán el glóbulo rojo para invadir nuevos eritrocitos. Cada uno de los merozoítos que se liberan tiene la capacidad de infecta a un nuevo eritrocito (Figura 2) (van Dooren *et al.*, 2005).

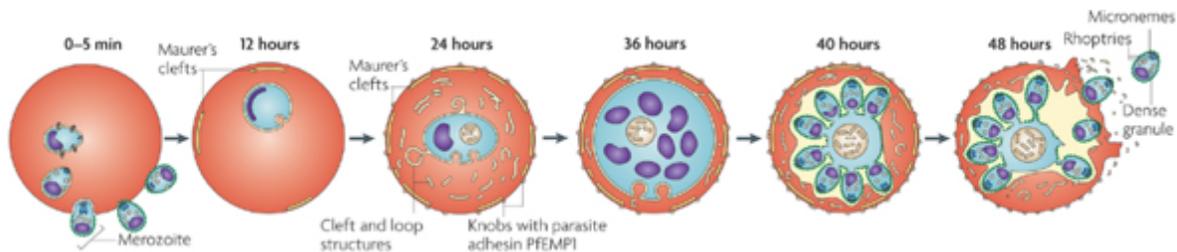


Figura 2. Esquizogonia eritrocítica de *Plasmodium falciparum*. Los merozoítos de *P. falciparum* se adhieren e invaden a glóbulos rojos maduros y se desarrollan en una vacuola parasitófora. El parásito pasa por diferentes fases: anillo (0-18 hpi), trofozoíto (18-36 hpi) y esquizonte (40-48 hpi). Después de aproximadamente 48 horas el glóbulo rojo se rompe liberando de 16 a 32 merozoítos (Maier *et al.*, 2009)

La depuración por medio del bazo se considera un mecanismo de regulación de crecimiento del parásito. Sin embargo, el parásito ha desarrollado mecanismos para evitar esta destrucción al expresar antígenos de superficie variables en los glóbulos rojos para que sean secuestrados en células endoteliales y evitar ser destruidos (Gerald *et al.*, 2011). Como ya se mencionó, existen cambios en la morfología de la célula infectada, convirtiendo al eritrocito de una célula biconcava a una célula de forma irregular cuya superficie, en el caso de *P. falciparum*, se ve cubierta completamente de protuberancias electro densas conocidas como “knobs” (Boddey and Cowman, 2013). En los knobs se localizan varias proteínas derivadas del parásito incluyendo a la proteína de membrana del eritrocito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) o las proteínas ricas en histidinas asociadas al knob (KAHRP) (Boddey and Cowman, 2013). En específico, PfEMP1 es una de las adhesinas mejor estudiadas en el parásito y es producto de una gran familia de genes denominada *var* que media la citoadherencia de los glóbulos rojos con varios receptores celulares (ICAM-1, CD31, CD36, glucosaminoglicanos) y se ha reconocido como un factor de virulencia importante (Scherf *et al.*, 2008).

Después de varios ciclos de división, algunos individuos de la población de parásitos siguen una vía alterna, produciendo gametocitos (gametocitogénesis) (Baker, 2010, Gerald *et al.*, 2011). Las formas maduras de los gametocitos son las formas que son transmitidas al mosquito, no son

replicativas y pueden persistir durante semanas en circulación. Los gametocitos de *P. falciparum* se desarrollan durante cuatro estados morfológicos distintos (I al IV) que se llevan a cabo durante 10 a 12 días para la maduración completa. Las formas inmaduras de gametocitos (I al III) son sensibles a los antimaláricos que matan a las formas asexuales (Wiley *et al.*, 2015).

i) Fase Sexual

Cuando el mosquito ingiere la sangre del huésped infectado, los gametocitos entran al tubo digestivo del insecto y sufren una maduración dramática para desarrollar gametos funcionales (gametogénesis) (Figura 1h). La lisis de los eritrocitos libera al microgametocito (macho) y macrogametocito (hembra) en el lumen del estómago. La gametogénesis ocurre en alrededor de 12 min después de la ingesta de sangre del mosquito en respuesta a la caída en la temperatura, cambio en el pH y presencia del ácido xanturénico (Wiley *et al.*, 2015). Aquí, el microgametocito lleva a cabo un proceso de maduración denominado exflagelación, durante el cual el núcleo sufre tres rondas rápidas de replicación del DNA produciendo ocho copias haploides del genoma (Gerald *et al.*, 2011). Se han identificado dos reguladores clave de la exflagelación en *P. berghei*: la cinasa dependiente de ciclina (CDPK4) que controla el inicio de la replicación del genoma y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP-2) que regula el inicio de la citosinesis y la liberación de microgametos. La cariocinesis y citocinesis, así como la liberación posterior de los ocho gametos se facilita por axonemas citoplasmáticos, los cuales llevan una copia del genoma en un microgameto flagelado (Bushell *et al.*, 2009). El microgameto móvil fertiliza a un macrogameto para formar un cigoto diploide que se desarrollará de 12 a 24 horas en un **oocineto móvil** (Figura 3) (Wiley *et al.*, 2015). La proteína P48/45 en la superficie de los microgametos es esencial para las fases iniciales de la fertilización. En *P. berghei*, la fusión es mediada por el factor de esterilidad del macho HAP2 (Bushell *et al.*, 2009).

El oocineto atraviesa el epitelio del estómago del mosquito para alcanzar la lámina basal, donde se desarrolla en forma de **ooquiste** aproximadamente 40 horas después de la alimentación con sangre infectada. Este se encierra en una pared quística formada por proteínas secretadas por el parásito y la membrana basal. El quiste se proyecta en el hemocele y crece de 4 a 5 veces en tamaño. Conforme progresa el desarrollo del parásito, el núcleo se vuelve poliploide a través de múltiples rondas de endomitosis mientras que el plasmalema se invagina formando esporoblastos. En el ooquiste maduro, divisiones nucleares sincrónicas llevan a la liberación de los esporozoítos de

los esporoblastos, generando así miles de esporozoítos haploides. Estos son liberados en el hemocele, invaden las glándulas salivales e infectan a nuevos hospederos a través de la alimentación con sangre, cerrando de esta manera el ciclo (Bushell *et al.*, 2009).

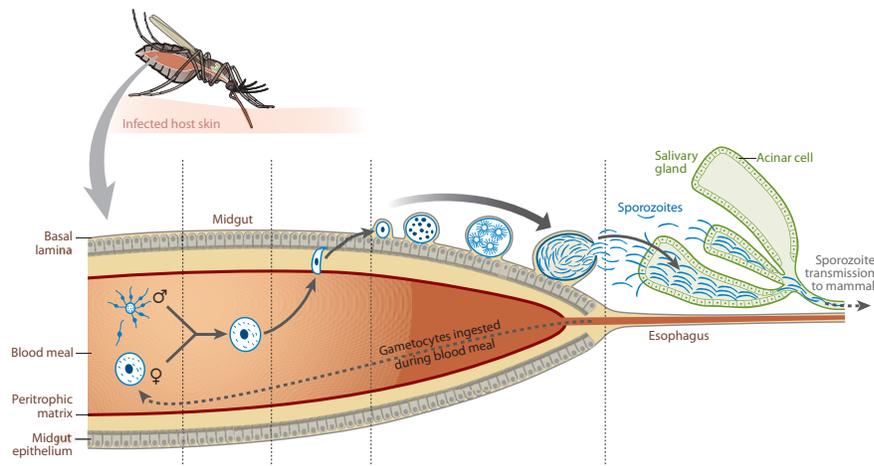


Figura 3. Esporogonia en el mosquito *Anopheles sp.* Infectado. Durante la ingestión con sangre, el mosquito ingiere eritrocitos infectados con gametocitos. Los gametocitos maduran gracias a las condiciones de temperatura y pH para formar a los gametos masculino (microgameto) y femenino (macrogameto). Se realiza la fertilización, formación de cigoto y oocineto (forma móvil) que atravesará el epitelio intestinal para el establecimiento del ooquiste en el hemocele del insecto, la liberación de esporozoítos y su migración a glándulas salivales (Aly *et al.*, 2009).

5.3 Epidemiología

En 2012 la Organización Mundial de la Salud estimó que ocurrieron 207 millones de casos de malaria alrededor del mundo. La mayoría de los casos (80%) fueron de la región de África, seguido por la región del Sur y Este de Asia y la Región del Mediterraneo Este (6%) (Figura 4). Hubo un estimado de 584 000 muertes por malaria alrededor del mundo en el 2013. El 90% de los casos de defunciones en 2013 fueron de la Región de África, seguido de la Región del Sur y Este de Asia (7%) y la Región del Mediterraneo Este (3%). Se estima que aproximadamente 437 000 de las defunciones por malaria se estimaron que ocurrieron en niños menores de 5 años de edad, principalmente en la región de África. La mayoría de las muertes estuvieron relacionadas con *P. falciparum*; sin embargo, *P. vivax* se está reconociendo como una de las causas de malaria severa y muerte (WHO, 2014).

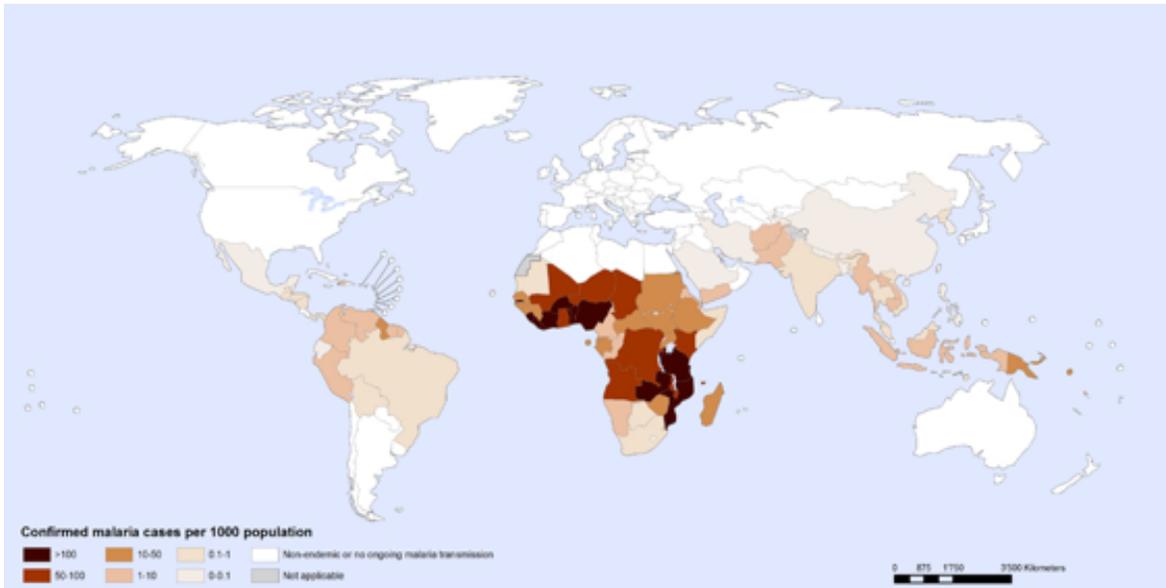


Figura 4. Casos confirmados de malaria en el 2013 por cada 1000 habitantes (Tomado del Reporte Mundial de la Malaria, 2013)

En América, el paludismo se presenta en 21 países con una población conjunta de 504 millones de habitantes, de los cuales 21.56% (108.7 millones) se encuentra con riesgo de padecer la enfermedad. En el año 2005, se registraron 1 046 955 casos de paludismo en América, con 109 muertes, lo que representa un incremento de 15.72% en el número de enfermos y una reducción a menos de la mitad en las defunciones (-43.10%) en relación con el año anterior. El mayor número de casos ocurrió en países que comparten la selva amazónica, de los cuales Brasil concentró 57.39% de los casos, seguido por Colombia (11.29%), Perú (8.94%) y Venezuela (4.30%) (Rodríguez, 2008).

En la subregión de mesoamérica y el Caribe, 11.75% de los casos se concentró en Guatemala (3.78%), Guyana (3.72%), Haití (2.08%), Honduras (1.54%) y Nicaragua (0.63%). El 26.07% de los casos lo ocasionó *P. falciparum*, 73.73% *P. vivax* y 0.20% *P. malariae* (2 097 casos). Estos últimos casos fueron registrados en Guyana (61.56%), Surinam (27.75%), Guyana Francesa (3.38%), Guatemala (2.29%), Brasil (2.38%), Venezuela (1.81%) y Colombia (0.81%). México registró en 2005 un total de 2 967 casos (0.28%), la mayor parte (99.25%) ocasionados por *P. vivax*. (Figura 5) (Rodríguez, 2008).

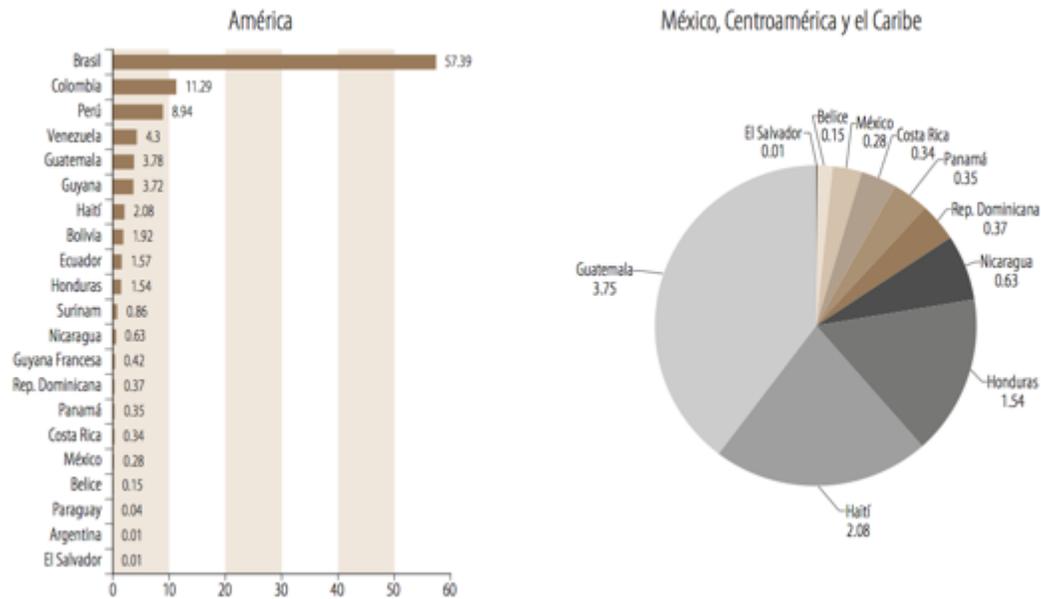


Figura 5. Estimación del porcentaje de enfermos por malaria en América en el 2005 (Manual Para la Vigilancia y el Control de Paludismo en Mesoamérica, 2008)

En México y en Centroamérica la transmisión de la malaria no es un fenómeno constante y se acompaña de una diversidad de condiciones que la determinan: los vectores, las características socioeconómicas, culturales y las intervenciones de control (cobertura, intensidad, calidad y continuidad de las acciones) (Reyes, 2011)

En México, la Malaria ocurre a lo largo del país. Hasta la semana 13 del 2015, se han registrado 103 casos de malaria por *P. vivax* y ninguno para malaria por *P. falciparum*. Los estados que presentan mayor incidencia hasta el momento son Campeche, Chiapas y Quintana Roo con 52, 22 y 16, respectivamente (<http://www.dgepi.salud.gob.mx>).

Para México se tienen reportadas 26 especies de mosquitos del género *Anopheles* distribuidas en tres Subgéneros: *Anopheles* con 21 especies, *Nyssorhynchus* que agrupa cuatro y *Kerteszia* con una (Gerardo Reyes Cabrera, 2014). Entre las especies más importantes se encuentran *An. (Ano.) pseudopunctipennis*, *An. (Nys.) albimanus*, *An.(Ano.) vestitipennis* y *An. (Nys.) darlingi*. *Anopheles (Ano.) aztecus* es potencial vector de paludismo en el Altiplano y *An. (Ano.) hermsi*, tiene importancia en estados del norte y noroeste de México (http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5192591&fecha=01/06/2011)

5.4 Malaria de Roedores

Los parásitos que causan malaria en roedores se han usado ampliamente como modelos de la malaria en humanos. Cuatro especies diferentes que afectan a roedores en África han sido adaptados para uso en laboratorio: *P. berghei*, *P. yoelli*, *P. vinckei* y *P. chabaudi*. Existen diferencias en la biología de estas especies en ratones de laboratorio (Craig *et al.*, 2012); sin embargo, éstas son modelos atractivos para investigar diferentes aspectos de la malaria en humanos.

Estos parásitos son modelos prácticos para el estudio experimental de esta enfermedad. Algunas de estas ventajas radican en que se pueden mantener parásitos disponibles a bajo costo y que son un modelo excelente para la investigación de la biología del desarrollo, interacciones hospedero – parásito, desarrollo de vacunas y pruebas de fármacos (Leiden Malaria Research Group, www.lumc.nl). Lo anterior se debe a que:

- a) La biología básica de los parásitos de roedores y humanos es similar
- b) La organización del genoma se encuentra conservada entre los parásitos de roedores y de humanos
- c) Los genes “*housekeeping*” y los procesos bioquímicos se encuentran bien conservados entre los parásitos de roedores y los de humanos
- d) La base molecular de la sensibilidad y resistencia a fármacos muestra características similares en los parásitos de roedores y en los de humanos
- e) La estructura y función de antígenos blanco candidatos a vacunas se conservan entre los parásitos de roedores y los de humanos
- f) La manipulación del ciclo de vida completo de los parásitos de roedores, incluyendo la infección del mosquito, es segura y en términos generales es simple
- g) Las metodologías para su modificación genética se encuentran accesibles
- h) Los parásitos de roedores permiten investigaciones de las interacciones parásito-célula hospedera y para pruebas de fármacos *in vivo*.
- i) La manipulación de hospederos con una extensa caracterización genética y el uso de líneas transgénicas de los mismos, permiten la investigación inmunológica de esta patología.

En particular, *P. chabaudi* es un modelo para investigar mecanismos de resistencia a fármacos y evasión de la respuesta inmune, en particular variación antigénica. Esta especie invade normocitos y reticulocitos y produce principalmente infecciones crónicas y no letales (Otto *et al.*, 2014). Esta

especie de malaria fue descrita por Landau en 1965. Todas las cepas son sincrónicas (a diferencia de *P. berghei* ANKA o *P. yoelii*) y poseen un espectro diferente de severidad de la enfermedad, y diferentes niveles de secuestro y transmisibilidad a los mosquitos (Stephens *et al.*, 2012).

La cepa más utilizada es *P. chabaudi chabaudi* (AS) que en general, no es letal y es similar a la malaria que causa *P. falciparum* en humanos, dado que infecta tanto normocitos como reticulocitos, se secuestra (adhiera) en el endotelio vascular durante la fase de esquizonte y se adhiere a eritrocitos no infectados (formación de rosetas). En algunos casos induce una infección crónica y puede ser transmitida de manera fácil a través de mosquitos *An. stephensi*; sin embargo, se ha demostrado que pases sucesivos en roedores aumentan la virulencia de esta especie, mientras que la transmisión por el mosquito de un aislado o cepa, modifica al parásito en su ciclo intraeritrocítico regulando su virulencia y de esta manera, transformando el curso y desenlace de la infección (Spence *et al.*, 2012).

VI. Antecedentes

6.1 Ubiquitina

La ubiquitinación de proteínas se descubrió a principios de la década de los 80 como una modificación postraduccional, en donde los residuos de lisina eran modificados con una proteína pequeña denominada ubiquitina (Ub), un polipéptido de 76 aminoácidos con un peso molecular de 8.5 kDa (Komander, 2009). Esta proteína adopta un plegamiento globular compuesto de cinco láminas β empaquetadas en una sola α -hélice (Figura 6C). La estructura central es rígida, excepto por el bucle entre $\beta 1$ - $\beta 2$ formado por los residuos 8-11 y los residuos 72-76 (Leu-Arg-Gly-Gly) en el carboxilo terminal (C-terminal) que muestran una flexibilidad conformacional (Trempe, 2011).

Esta modificación postraduccional juega un papel importante en la regulación de varios procesos celulares, entre ellos el tráfico proteico, regulación del ciclo celular, reparación del DNA, apoptosis, transducción de señales y el más conocido, la degradación de proteínas a través del complejo 26S proteasoma (Radici, 2013).

La ubiquitina típicamente se sintetiza como una proteína de fusión a proteínas que se procesa de manera co-traduccional en su forma madura y en mamíferos se obtiene a partir de 4 genes. Dos de estos genes, UBA52 y RPS27a codifican para una copia sencilla de ubiquitina que se fusiona a las proteínas ribosomales L40 y S27, mientras que UbB y UbC son genes de poliubiquitina que codifican para 3 y 9 repetidos de “cabeza-a-cola” de ubiquitina, respectivamente (Figura 6A) (Radici, 2013, Bianchi *et al.*, 2013).

Tanto el gen UbC como el UbB se describieron como genes inducibles por estrés, regulados en aumento bajo diferentes tratamientos, así como en algunas condiciones patológicas (Bianchi, Crinelli *et al.* 2013). La respuesta a choque térmico del gen de poliubiquitina fue descrito por primera vez en 1985. Se encontró que el gen UbC era el que presentaba una mayor respuesta a irradiación con UV, estrés oxidativo y deterioro en la traducción por ciclohexamida en comparación a los otros genes de ubiquitina (Radici, 2013). En 1989 se describió por primera ocasión, al expresar las ubiquitinas de fusión a proteínas ribosomales UBA52 y RPS27a en *Saccharomyces cerevisiae*, el mecanismo responsable de generar monómeros de ubiquitina libre en células eucariontes, en el que está involucrado un proceso proteolítico en el que participan hidrolasas de la familia DUB (desubiquitininas) (Monia *et al.*, 1989).

La Ub es una de las proteínas más abundantes en células eucariontes, constituye del ~0.1% al 5% de las proteínas totales pero, a pesar de su función y del gran número de sustratos que pueden estar ubiquitinados en una célula, parece ser que la Ub se mantiene en un nivel adecuado dependiendo de las condiciones fisiológicas de la célula. La homeostasis de la ubiquitina se mantiene por diferentes mecanismos: reciclaje de las cadenas de ubiquitina por enzimas desubiquitinadas (DUBs) y síntesis *de novo* (Radici, 2013).

Esta proteína es altamente conservada y se conjuga a otras proteínas por medio de un enlace isopeptídico entre el grupo ϵ -amino de una lisina dentro de una proteína blanco y la glicina carboxilo terminal de la Ub (Radici, 2013). La Ub por si misma contiene siete residuos de lisina (Lys-6, -11, -27, -29, -33, -48 y -63). Estas lisinas residen en diferentes sitios de la superficie de la molécula y se orientan en diferentes direcciones (Figura 6B) (Radici, 2013, Woelk *et al.*, 2007). Los siete residuos de lisina así como la metionina 1 (Met1) en el amino terminal (N-terminal) son solubles y están expuestos y por tanto, pueden formar un enlace con el C-terminal de otra ubiquitina (Trempe, 2011).

Las proteínas sustrato pueden ser modificadas por Ub de diferentes maneras. La adición de una sola molécula de Ub a un sólo residuo de lisina da lugar a la monoubiquitinación. Una variación de monoubiquitinación ocurre cuando varios residuos de lisina son modificados por una sola molécula de Ub, lo que da lugar a múltiples monoubiquitinaciones (multi mono-ubiquitinación) (Figura 9A). Por otra parte, los siete residuos de lisina de la Ub pueden servir como aceptores para la adición de otra molécula de Ub, permitiendo la formación de diferentes tipos de cadenas de Ub (poliubiquitinación) (Woelk *et al.*, 2007).

Además, existen proteínas relacionadas en secuencia con la Ub y con una estructura tridimensional similar. Estas proteínas son denominadas proteínas similares a ubiquitina (UBL) (van der Veen and Ploegh 2012). La modificación por proteínas similar a ubiquitina usa una cascada enzimática similar a la usada para ubiquitina. Algunas de estas proteínas han sido poco caracterizadas y entre éstas se encuentran: el precursor neuronal expresado en la célula, regulado hacia abajo en el desarrollo-8 (Nedd8) ó Rub1 (relacionada a ubiquitina-1) en *S. cerevisiae* y que está relacionada a la activación de complejos SCF; la proteína modificadora relacionada a

ubiquitina pequeña (SUMO) que se encuentra relacionada a la localización de sustratos, control del ciclo celular y la interacción de proteínas, entre otras; la proteína modificadora del plegamiento de ubiquitina (Ufm1) involucrada en desarrollo; la proteína homóloga a ubiquitina-1 (Hub1) en “*splicing*” de RNA; la proteína estimulada por interferón de 15 kDa (ISG15), involucrada en defensa inmune ante infecciones virales, el modificador relacionado a ubiquitina-1 (Urm1), involucrado en la transferencia de azufre y la proteína de autofagia-8/-12 (Atg-8/-12), relacionada a la formación del autofagosoma (van der Veen and Ploegh, 2012, Kerscher *et al.*, 2006).

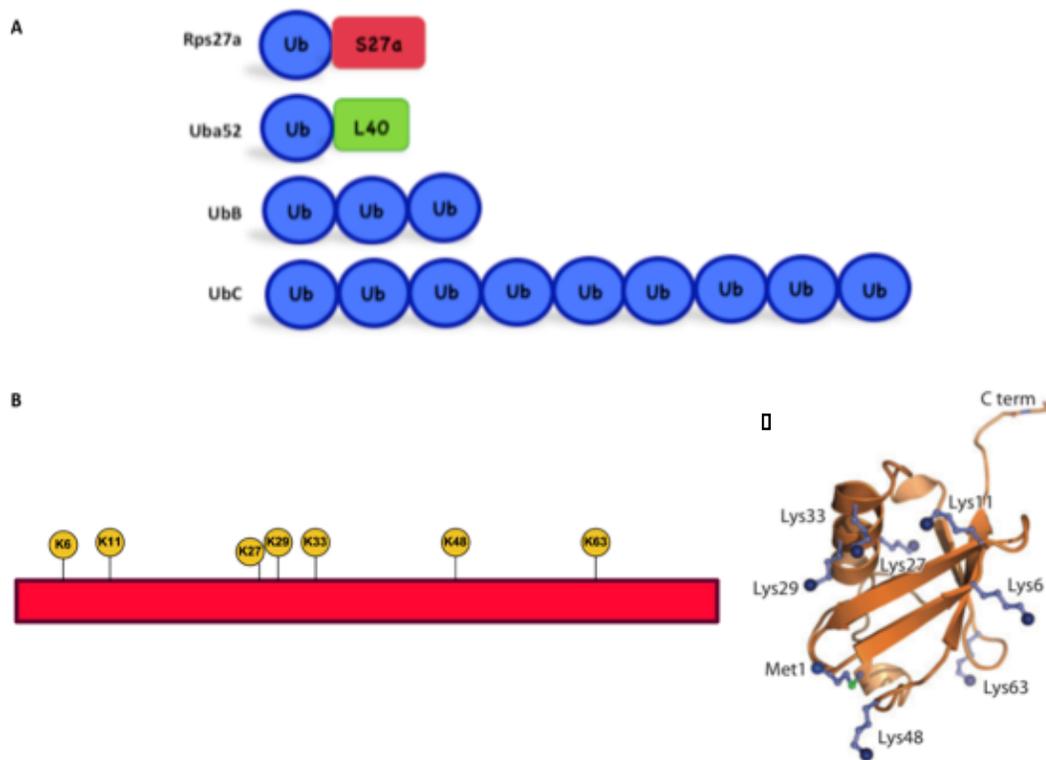


Figura 6. Esquema de Ubiquitina y sus genes en humanos. A) Esquema de los cuatro genes de ubiquitina en humanos; Rps27a y Uba52 codifican Ub como una proteína de fusión con las subunidades ribosomales S27a (en rosa) y L40 (en verde), respectivamente, mientras que UbB y UbC codifican para unidades en tandem de Ub con 3 y 9 repetidos, respectivamente. En azul se muestran los repetidos en tándem de la ubiquitina. **B)** La molécula de Ubiquitina presenta siete lisinas (en amarillo) que pueden ser utilizadas para unir nuevas moléculas de Ub. **C)** Modelo tridimensional de la ubiquitina mostrando su estructura globular y los siete residuos de lisina que pueden ser utilizados para la formación de cadenas (Figuras modificadas de Woelk T. *et al.*, 2007 y Oh C. *et al.*, 2013).

6.2 Ubiquitinación

La ubiquitinación de una proteína depende de la acción de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por tres enzimas (Weissman, 2001) . Inicialmente, la Ub tiene que ser activada por enzimas E1 (enzima activadora de la Ub) al formar un enlace tioéster entre un residuo de cisteína conservado en el sitio activo de la enzima y la glicina en la posición 76 en el carboxilo terminal de la molécula de Ub. Esta reacción depende de Adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Figura 7A). Posteriormente, la Ub es transferida a una enzima conjugadora de la Ub o enzima E2. La transferencia de la Ub también depende de un enlace tioéster entre la Ub y la enzima E2 (Figura 7B). Finalmente, la enzima E2 transfiere la Ub activada a un residuo de la proteína sustrato mediante un enlace isopeptídico entre la lisina del sustrato y el extremo carboxilo terminal de la Ub (Husnjak and Dikic, 2012). La enzima E2 puede transferir la Ub de manera directa o con ayuda de enzimas ubiquitin ligasas específicas ó E3 ligasas (Figura 7C). La mayoría de las especies poseen sólo una o dos enzimas E1 y múltiples enzimas E2 y E3 (Dubiel and Gordon, 1999). En el genoma humano se han identificado dos E1 activadoras, 37 enzimas conjugadoras E2 y cerca de 600 E3 ligasas (Bulatov and Ciulli, 2015).

La característica más notable de la vía de conjugación de la Ub es la extraordinaria diversidad de sustratos. Esta característica, que explica la amplia gama de funciones biológicas que tiene la Ub, es un reflejo directo de un gran número de enzimas E3. Se ha observado que varias E3 trabajan como una sola proteína; sin embargo, en otros casos la función de ubiquitin ligasa se realiza por complejos multiproteicos. En este sentido, se han descrito tres familias de E3 ligasas hasta el momento: las de tipo HECT (homólogo al carboxilo terminal de E6-AP "*homologous to E6-AP carboxyl terminus*"), las de tipo RING (Nuevo gen realmente interesante "*Really Interesting New Gene*") y las tipo U-box (homólogo a UFD2) (Pickart and Eddins, 2004). Recientemente se ha identificado un híbrido de E3 ligasas RING/HECT, denominado como E3 ligasas ring-entre-ring (*ring-between-ring*) ó RBR (Suryadinata *et al.*, 2014).

Las familia de E3 ligasas de tipo U-box representan un grupo relativamente pequeño y se identificaron por primera vez en levadura. Poseen un dominio de unión a E2 y estudios sugieren que no es una enzima E3 típica dado que en ciertas situaciones se une a E2 y facilita la conjugación de ubiquitina, en otras se autoubiquitina y en otras reconoce como su sustrato a la ubiquitina que ha sido conjugada por otra E3. Esto ha causado que este tipo de enzimas sean clasificadas como "E4" (Pickart and Eddins, 2004).

Las enzimas E3 de tipo HECT primero aceptan a la Ub de la enzima E2 y posteriormente la transfieren a una lisina sustrato para formar el enlace isopeptídico (Sadowski *et al.*, 2012).

Las ligasas E3 de tipo RING unen a la enzima E2 cargada con la ubiquitina y la proteína sustrato para mediar la transferencia del C-terminal de la Ub a la lisina sustrato para formar un enlace isopeptídico, lo que resulta en la ubiquitinación de la proteína (Sadowski *et al.*, 2012).

Por otra parte, las E3 ligasas de tipo RBR contienen dos dominios RING separados por un dominio “entre ring” (*in-between-ring*) o IBR. El RING1 N-terminal adopta la función canónica de las E3 ligasas de tipo RING al unir y reconocer a la E2 conjugada a la ubiquitina, mientras que el dominio RING2 posee una cisteína catalítica que acepta a la ubiquitina de la E2 antes de transferirla al sustrato de lisina (Suryadinata *et al.*, 2014).

La ubiquitinación es un proceso reversible y el enlace isopeptídico puede ser hidrolizado por proteasas denominadas desubiquitininasas (DUB) de las que se han identificado alrededor de 80 en el genoma humano (Bulatov and Ciulli, 2015).

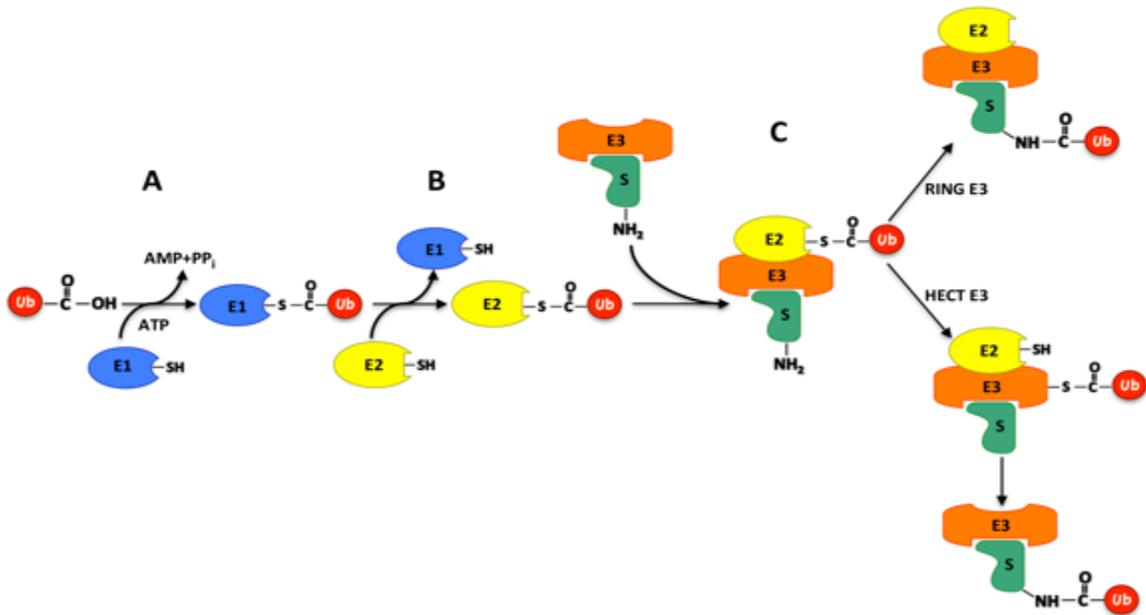


Figura 7. Vía de Ubiquitinación. A) La ubiquitina (Ub) libre es activada de manera dependiente de ATP con la formación de un enlace tiol-éster entre E1 y el carboxilo terminal de la ubiquitina. **B)** La ubiquitina es transferida a un número diferente de enzimas E2s. **C)** La E2 se asocia con E3 que pueden tener o no unida la proteína sustrato (S) en ese momento. Para las E3 con dominio HECT, la ubiquitina es transferida a la cisteína del sitio activo del dominio HECT seguido por la transferencia al sustrato. Para las E3 de tipo RING, la ubiquitina es transferida directamente de la E2 al Sustrato (Weissman, 2001).

6.2.1 E3 ligasas de tipo RING

Las E3 ligasas de tipo RING forman una de las familias más numerosas de E3 ligasas (Wei and Sun, 2010). Las E3 ligasas de tipo RING se pueden dividir en dos grandes grupos dependiendo de los complejos proteicos que formen: ligasas E3 RING-cullinas (CRL) y los complejos promotores de la anafase/ciclosoma (APC/C). Las CRLs son complejos proteicos modulares que comprenden una proteína adaptadora del sustrato, una proteína cullina que actúa como una proteína de andamiaje y una proteína de tipo RING (Marin, 2009, Harper and Tan, 2012). Estos complejos fueron descritos hace casi dos décadas y son una superfamilia que es responsable de casi el 20% de la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina en las células (Wei and Sun, 2010).

El dominio RING consiste de un motivo corto rico en residuos de cisteína e histidina (Cys-X₂-Cys-

X(9-39) -Cys-X(1-3) -His- X(2-3) -Cys-X2 -Cys-X(4-48) -Cys-X2 -Cys; donde X es cualquier aminoácido). Estos residuos conservados de cisteínas e histidinas ayudan a mantener la estructura general al estabilizar a la molécula a través de la unión de dos átomos de zinc (Figura 8A-B). (Deshaies and Joazeiro, 2009).

Las cullinas fueron nombradas por su papel en “seleccionar, clasificar” proteínas celulares para la degradación por proteasoma mediada por ubiquitina (Sarikas *et al.*, 2011). La familia de genes de cullina se encuentra conservada a lo largo de la evolución. En mamíferos existen siete proteínas cullinas estrechamente relacionadas Cul1-Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul 5 y Cul7 (*Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*); seis en *C. elegans* (Cul1 a Cul6) y cinco en *Drosophila* (CUL1 a CUL5). *Arabidopsis* tiene cinco cullinas (CUL1, CUL2, CUL3A, CUL4 y CUL5) y los genomas de levaduras codifican para tres proteínas cullinas (cul1, cul3, cul8 en *Saccharomyces cerevisiae*; cul1, cul3 y cul4 en *Schizosaccharomyces pombe*) (Sarikas *et al.*, 2011).

Las cullinas no tienen una actividad catalítica intrínseca, pero en su lugar sirven como andamios que facilitan el ensamblaje de complejos E3 multiméricos y transfieren la ubiquitina de la enzima conjugadora E2 al sustrato (Lee and Zhou, 2010). Las propiedades de las cullinas se han revelado en el contexto de las CRL gracias a estudios estructurales de alta resolución y experimentos de reconstitución bioquímica. Cul1 a Cul5 tienen un dominio amino terminal (NTD) similar a un tallo largo que consiste de tres repetidos de cullina (CR1 a CR3) y un dominio carboxilo terminal (CTD) globular, que alberga un dominio de homología de cullinas, una secuencia de aproximadamente 200 aminoácidos (Sarikas *et al.*, 2011).

El CTD de la cullina se une a la E3 ligasa de tipo RING (conocidas como Regulador de cullinas 1 (ROC1) o ROC2 ó proteínas con caja RING (Rbx)1 y Rbx2, respectivamente), que recluta a las enzimas E2 cargadas con ubiquitina para catálisis (Figura 8C-D). La asociación de la Cul1-ROC1 se establece por interacciones múltiples, involucrando principalmente los dominios de la cullina y la hebra S1 amino terminal de ROC1, que permite la formación de un núcleo hidrofóbico intermolecular que deja a la CUL-ROC1 físicamente inseparables. Esta interacción crea un núcleo catalítico y es la característica estructural más característica que define a las CRLs (Sarikas *et al.*, 2011).

Para reconocer a las proteínas blanco, cada complejo Cullina-RING puede ensamblarse con su familia de proteínas receptoras de sustrato (SR), que generan un puente individual a la cullina por medio de una proteína adaptadora (Figura 8C). Estas proteínas SR incluyen varios dominios de interacción proteína-proteína para unir secuencias específicas de sustratos conocidos como “degrones”(Zimmerman *et al.*, 2010). Además de la identificación de la secuencia, estas SR reconocen modificaciones postraduccionales en los sustratos, incluyendo fosforilación e hidroxilación. Cada receptor puede unir diferentes sustratos, expandiendo así el rango funcional de la actividad del complejo CRL (Bulatov and Ciulli, 2015). Los módulos de las SR para CUL1, CUL2/5, CUL3 y CUL7 están relacionados estructuralmente, mientras que para la CUL4A/B son divergentes y contienen motivos distintos a otras CRLs.

En varios casos, el funcionamiento normal de las CRLs bajo condiciones fisiológicas depende de proteínas regulatorias. Entre ellas se encuentra la modificación postraduccionale de la proteína similar a ubiquitina, el precursor celular neuronal expresado en el desarrollo con regulación a la baja-8 (Nedd8) que tiene un 59% de identidad con la ubiquitina (Enchev *et al.*, 2015). Esta proteína se une de manera covalente a un residuo de lisina conservado en el motivo *winged-helix* del extremo carboxilo terminal (Lys 720 en la CUL1). De manera similar a la Ubiquitina, la vía de modificación por Nedd8 requiere su conjunto de enzimas E1 y E2. Esta modificación postraduccionale se ha demostrado que regula la actividad de las CRLs al potenciar la ubiquitinación de sustratos y se ha demostrado para casi todos los miembros de la familia de Cullina, excepto para Cullina 7 (Bulatov and Ciulli, 2015).

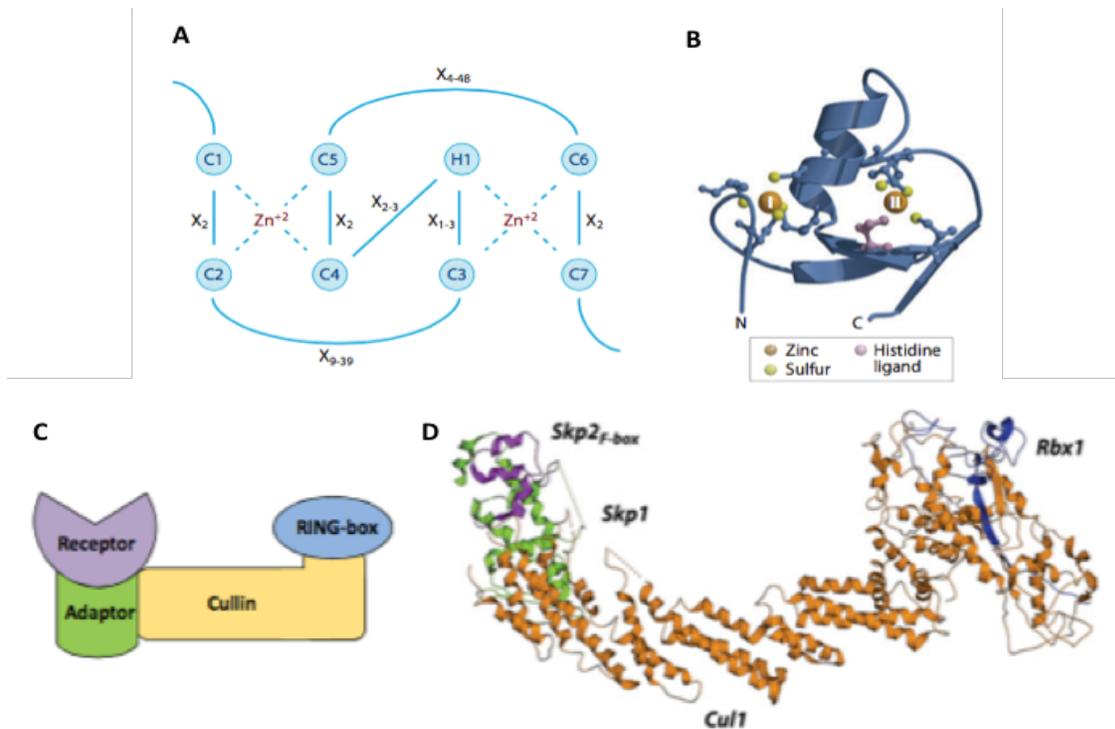


Figura 8. Dominio RING y estructura general del complejo Cullina-Ring Ligasa (CRL) en eucariontes superiores. A) Organización de la secuencia primaria del dominio RING. La primera cisteína que coordina el zinc está etiquetada como C1 y así sucesivamente. H1 se refiere al ligando de Histidina. X_n se refiere al número de aminoácidos en las regiones espaciadoras entre los ligandos del zinc. **B)** Esquema de la estructura tridimensional del dominio RING. Los átomos de zinc se encuentran en los sitios I y II. **C)** Los complejos CRL se componen de una proteína de andamiaje denominada Cullina, una E3 ligasa de tipo Ring en el extremo C-terminal y una proteína adaptadora que se unirá con la proteína de reconocimiento a sustrato. **D)** Estructura cristalizada del complejo SCF con la proteína de caja F, Skp2 como la receptora del sustrato (código de PDB 1LDK). (Bulatov and Ciulli, 2015, Deshaies and Joazeiro, 2009)

6.3 Código de Ubiquitina

En las últimas décadas, se ha evidenciado un alto grado de complejidad en el rango de señales de Ub que gobiernan distintos procesos celulares. La variedad de eventos que puede desencadenar la unión de Ub depende del tipo de unión entre las ubiquitinas, la longitud y el sitio de anclaje de la cadena de poliubiquitina, así como el contexto celular (estrés, división celular) (Woelk *et al.*, 2007). La especificidad se genera principalmente por enzimas que reconocen a las proteínas sustratos y median la ubiquitinación, pero es evidente que el destino de las proteínas

ubiquitinadas es determinado por la cantidad de ubiquitinas asociadas a la proteína y de la cadena de ubiquitina que se pueda formar (Kravtsova-Ivantsiv and Ciechanover, 2012)

La monoubiquitinación es la adición de una molécula de Ub a un único residuo de lisina (Figura 9A). Esta modificación es reversible, es una señal no proteolítica involucrada en endocitosis, organización endosomal, regulación de histonas como H2B con efecto en la actividad transcripcional, reparación de DNA, gemación viral y exporte nuclear. Una variación de este tipo de ubiquitinación ocurre cuando varios residuos de lisina de un sustrato son modificados por una sola molécula de Ub, dando lugar a ubiquitinación múltiple que juega un papel en internalización de receptor y endocitosis (Woelk *et al.*, 2007).

La poliubiquitinación es la adición de cadenas de ubiquitina que se forman por medio de enlaces entre los siete residuos de lisina presentes en la Ub y el amino terminal de la siguiente Ub (Figura 9C). Una cadena de poliubiquitina puede formarse por un sólo grupo (homotípica) o múltiples grupos (heterotípica) de lisinas en la ubiquitina (Figura 9B). Las cadenas de poliubiquitina heterotípica pueden ser clasificadas en cadenas lineares y cadenas ramificadas (Trempe, 2011). Los ejemplos mejor estudiados son cadenas de cuatro o más moléculas de Ub unidas entre sí a través de la Lys48. Esta forma de cadena marca a las proteínas para degradación por medio del proteasoma 26S (Kravtsova-Ivantsiv and Ciechanover, 2012). De manera interesante, los estudios de cristalografía han revelado que las cadenas de Lys48 adoptan una conformación cerrada. Este atributo estructural parece ser requerido para el reconocimiento por las subunidades del proteasoma (Woelk *et al.*, 2007, Trempe, 2011).

Por otra parte, en los últimos años se ha observado que las cadenas unidas en Lys11 juegan un papel clave en el control del ciclo celular y la vía de degradación por medio del sistema de degradación vía retículo endoplásmico (ERAD)/ proteasoma (Kulathu and Komander, 2012). En levaduras, es el segundo tipo más abundante de cadenas de Ub (28%) después de las cadenas de Lys48 (Trempe, 2011).

Las cadenas de Ub formadas a través de Lys63, al igual que en la monoubiquitinación, generan una señal no proteolítica involucrada en la reparación de DNA, regulación transcripcional, endocitosis y activación de cinasas. En este caso, la conformación de la cadena adopta una formación lineal

extendida. Este tipo de estructura sugiere que las cadenas de Lys63 pueden ser reconocidas como una señal topológicamente similar a monoubiquitina (Woelk *et al.*, 2007).

En el caso de las cadenas unidas por Lys6, -27, -29 y -33, se tiene aún menos información sobre la función precisa y sobre su topología (Woelk *et al.*, 2007). Un método libre de enzimas *in vitro* demostró que, en el caso de Lys6, podría estar implicada en la señalización de proteínas relacionadas con la reparación de DNA. En el caso de las cadenas de Lys27, varios hallazgos sugieren un papel en la biología mitocondrial. El daño a la mitocondria lleva a la despolarización mitocondrial, lo que resulta en la translocación y activación de la RBR E3 ligasa parkina, que ensambla cadenas de Lys27 a varias proteínas mitocondriales lo que genera la depuración de la mitocondria dañada por mitofagia (Kulathu and Komander, 2012).

Además, durante la poliubiquitinación se pueden generar cadenas ramificadas de Ub. De hecho, se requiere autoubiquitinación de la ligasa RING E3 la cual genera cadenas ramificadas de Ub vía lisinas -6, -27 y -48 para ser activa y así monoubiquitar a la histona H2A (Suryadinata *et al.*, 2014). Estudios recientes han mostrado que el complejo promotor de la anafase (APC) también puede generar cadenas ramificadas de Ub en las proteína sustrato, lo que promueve su reconocimiento y degradación por proteasoma en comparación a cadenas homogéneas enlazadas a través de Lys11 (Suryadinata *et al.*, 2014).

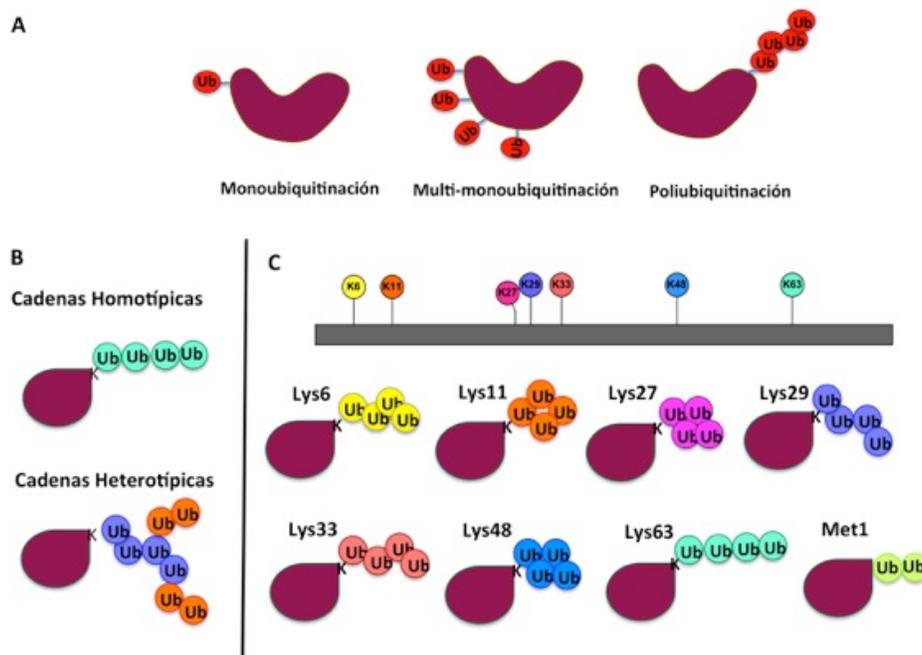


Figura 9. Formas de Ubiquitinación. **A)** Las proteínas pueden ser modificadas con ubiquitina de tres maneras diferentes: por monoubiquitinación, multi-monoubiquitinación y poliubiquitinación. **B)** Las cadenas pueden formarse con ubiquitina con un solo tipo de enlace (cadenas homotípicas) o con enlaces mixtos (cadenas heterotípicas) las que pueden estar ramificadas o bifurcadas. **C)** En el caso de las cadenas homotípicas, cada tipo de enlace (K-6, -11, -27, -29, -33, -48, -63) puede llevar a distintas conformaciones de cadenas (Komander, 2009).

6.4 Proteasoma

La degradación de proteínas (proteólisis) es mediada por proteasas, que van desde proteínas monoméricas relativamente pequeñas a grandes complejos multiméricos denominados 26S proteasoma. El proteasoma es un complejo de enzimas multicatalítico dependiente de ATP que se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de todas las células eucariontes y *Archeobacterias* y en algunas *Eubacterias* (Konstantinova *et al.*, 2008). Los proteasomas son responsables de la degradación dependiente de ubiquitina de la mayor parte de las proteínas celulares y juegan un papel crucial en los procesos celulares, como lo es la regulación de la progresión del ciclo celular, expresión génica, transcripción y control de calidad de proteínas recién sintetizadas (Gu and Enenkel 2014). El proteasoma consiste de una partícula central proteolítica (CP o 20S proteasoma) y una partícula regulatoria (RP, 19 S proteasoma o Activador del Proteasoma PA700). En conjunto, estas dos subunidades tienen un peso molecular de aproximadamente 2.5 MDa. La configuración

RP-CP del proteasoma se denomina como 26S proteasoma, mientras que una configuración RP-CP-RP se menciona como 30S proteasoma (Liu and Jacobson, 2013, Gu and Enenkel, 2014).

El complejo PA700/19S posee la habilidad de reconocer el sustrato ubiquitinado, desubiquitar y desplegar las proteínas ubiquitinadas, abrir el canal central del proteasoma y translocar el polipéptido en su forma primaria hacia los sitios catalíticos en el proteasoma 20S para su degradación (Liu and Jacobson 2013). El peso molecular de este complejo es de aproximadamente 900 kDa. Este está compuesto de al menos 19 subunidades proteicas y se subdivide en dos complejos distintos, denominados cubierta y base (Figura 10). La base del subcomplejo contiene seis ATPasas tipo AAA denominadas Partícula Regulatoria Triple A-proteína 1 (Rpt1)-Rpt6 y tres subunidades no ATPasa designadas Partícula Regulatoria No ATPasa 1 (Rpn1), Rpn2 y Rpn13 (Konstantinova *et al.*, 2008, Murata *et al.*, 2009). Las subunidades de ATPasa se requieren para desplegar el sustrato y para la apertura del canal de anillos α , para insertar los sustratos en el proteasoma 20S. RPN1, RPN13, RPT5 y RPN10 capturan a las proteínas ubiquitinadas de manera directa o a través de proteínas que contienen dominios similares a ubiquitina (UBL) y dominios asociados a ubiquitina (UBA), tal como las proteínas Sensible a Radiación 23 (RAD23), Supresor Dominante de Kar1 2 (DSK2) y la proteína Inducible a Daño al DNA 1 (DDI1). RPN10 se asume que se sienta en la interfaz de la tapa y base. El complejo de la cubierta está formado por al menos nueve subunidades no ATPasa (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 y Rpn15). Una de las actividades bioquímicas definidas de la cubierta es la desubiquitinación de los sustratos capturados para facilitar su degradación, un proceso en el que la metaloisopeptidasa Rpn11 tiene un papel esencial. El complejo 19S en conjunto se adhiere a uno o ambos extremos del proteasoma 20S, formando de esta manera el proteasoma 26S (Murata *et al.*, 2009).

El proteasoma 20S posee forma de cilindro largo con un peso molecular aproximado de 700 kDa. Este complejo está formado por 28 subunidades, que se arreglan en cuatro anillos heptaméricos en una configuración $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ (Figura 10) (Konstantinova *et al.*, 2008). Los dos anillos externos están compuestos de subunidades α mientras que los anillos internos corresponden a subunidades β . Tres subunidades β diferentes por cada anillo poseen una treonina (Thr) amino terminal libre, lo que forma el sitio activo proteolítico y por tanto son responsables de la actividad proteolítica del proteasoma con especificidades diferentes (Konstantinova *et al.*, 2008). Dos, denominadas “similares a quimiotripsina” cortan de manera preferencial después de residuos

hidrofóbicos y tienen sus residuos catalíticos en las subunidades β 5. Dos sitios, localizados en las subunidades β 2 son “similares a tripsina” y cortan después de aminoácidos básicos. Los dos sitios restantes, se localizan en las subunidades β 1, que cortan los enlaces peptídicos preferencialmente después de residuos ácidos. Estos sitios son denominados de manera tradicional “peptidil glutamil hidrolasa”; sin embargo, se encontró que estas enzimas cortan después de residuos de ácido aspártico más rápido que después de glutamatos, y por tanto se sugirió que estos sitios se denominaran “post-ácido” ó “similar a caspasa” (Kisselev and Goldberg, 2001).

En células de mamífero, los proteasomas están localizados principalmente en el citosol pero también presentan una asociación significativa con elementos del citoesqueleto, retículo endoplásmico (RE), núcleo y membrana plasmática. Sin embargo, la localización de los proteasomas en diferentes momentos depende del estado fisiológico de la célula (Nandi *et al.*, 2006).

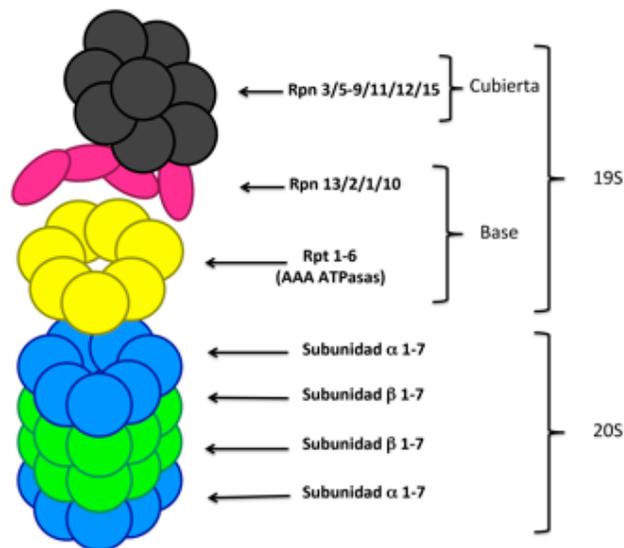


Figura 10. Estructura del proteasoma 26S. La subunidad 19S del proteasoma se subdivide en dos subcomplejos: la cubierta y la base. La cubierta (negro) está compuesta por 9 subunidades no ATPasa (Rpn) y la base (rosa y amarillo) está compuesta por seis ATPasas tipo AAA y cuatro no ATPasas. En conjunto, la subunidad 19S se encarga del reconocimiento, desubiquitinación, desplegamiento y translocación de la proteína ubiquitinada. La subunidad 20S está constituida por 4 cadenas de anillos. Las dos cadenas de anillos en la parte media (verde) corresponden a las siete subunidades β , que constituyen la porción catalítica del proteasoma; las dos cadenas de anillos externas (azul) corresponden a las siete subunidades α (Konstantinova I, *et al.*, 2008 y Aminake M., *et al.*, 2012).

6.4.1 Inhibidores de Proteasoma

La mayoría de los inhibidores de la vía de degradación de proteínas ubiquitinadas por proteasoma están dirigidos específicamente e inhiben el proteasoma 20S. Éstos compuestos inhiben de manera reversible o irreversible debido a la formación de aductos covalentes entre el inhibidor y el sitio catalítico de la enzima (Nandi *et al.*, 2006). En general, estos inhibidores se clasifican en dos grupos: análogos sintéticos y productos naturales. Los inhibidores sintéticos son compuestos basados en péptidos con diversos farmacóforos. Estos incluyen benzamidas, α -cetoamidas, aldehídos peptídicos, α -cetoaldehídos peptídicos, vinil sulfonas peptídicas y ácidos borónicos peptídicos. Por otra parte, los inhibidores de productos naturales muestran una variedad de estructuras y farmacóforos. Ejemplos de estos son la lactacistina, epoxicetonas, la toxina epipolitiiodioxopiperacina, entre otros (Myung *et al.*, 2001).

Los primeros inhibidores de proteasoma descubiertos fueron los aldehídos peptídicos (por ejemplo la N-acetil-Leu-Leu-Norleucinal ó inhibidor Calpaina I). Estos compuestos inhiben el sitio similar a quimiotripsina y son de unión lenta; inhiben de manera reversible a los proteasomas al modificar el grupo hidroxilo catalítico de la treonina, al formar un enlace hemiacetal. Éstos pueden disociarse rápidamente de los proteasomas y se oxidan rápidamente en ácidos inactivos. En este grupo de inhibidores se han sintetizados nuevos compuestos que son más potentes y selectivos hacia el proteasoma, tales como MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al ó Cbz-LL), PSI (Z-Ile-Glu(Ot- Bu)-Ala-Leu-al), CEP1612 (Kisselev and Goldberg, 2001). Los boronatos peptídicos son inhibidores del proteasoma mucho más potentes en comparación con los aldehídos y se disocian de manera más lenta. Los boronatos también comparten el modo de inhibición con los aldehídos peptídicos, al formar un aducto tetrahedral con el sitio activo en el N-terminal de la treonina. Las vinil sulfonas son inhibidores irreversibles que modifican de manera covalente la Thr1 presente en todas las subunidades β del proteasoma activas (Nandi *et al.*, 2006).

6.4.1.1 Lactacistina

La lactacistina es un metabolito de *Streptomyces lactacystinaeus* y es un inhibidor irreversible del proteasoma. Es uno de los compuestos que inhibe de manera específica al proteasoma y no inhibe la degradación de proteínas por lisosomas. Se ha encontrado que la lactacistina inhibe la progresión del ciclo celular en las fases G_0/G_1 y G_2/M del ciclo celular (Fenteany and Schreiber, 1998).

Este compuesto modifica de manera selectiva e irreversible al proteasoma al unirse de manera covalente al N-terminal de la Thr1 de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma por medio de un enlace éster. Otros sitios proteolíticos del proteasoma también se modifican e inhiben, de manera reversible, pero a tasas más bajas (Fenteany *et al.*, 1995, Nandi *et al.*, 2006).

La lactacistina tiene que llevar a cabo una transición a *clasto*-lactacistina- β -lactona en un pH neutro. Este compuesto es el que reacciona con las treoninas del sitio activo del proteasoma, reaccionando con el grupo hidroxilo de la treonina amino terminal para formar un aducto éster (Figura 11). (Dick *et al.*, 1997, Myung *et al.*, 2001). Las membranas de las células de mamífero y levaduras no son permeables a la lactacistina pero sí a la β -lactona, la cual se forma de manera espontánea en el medio de cultivo.

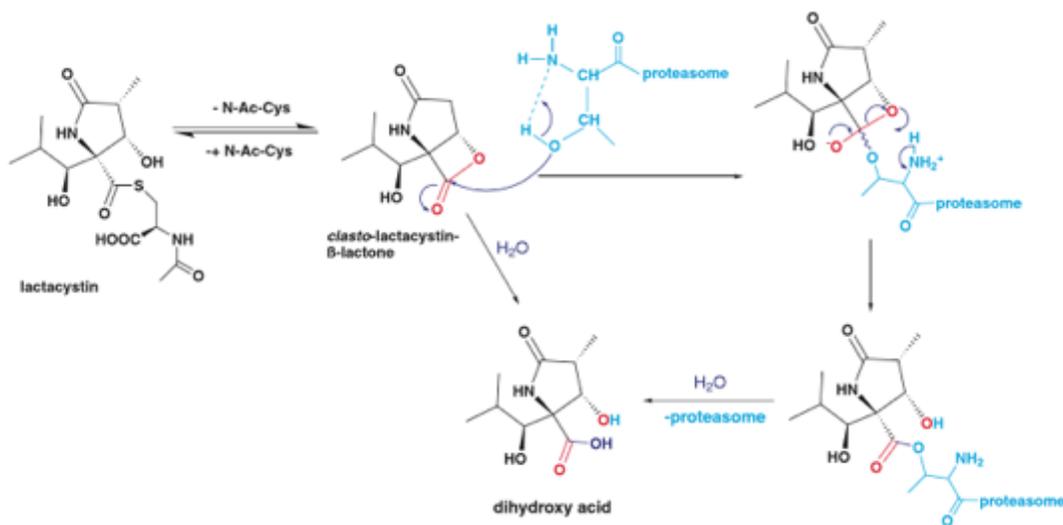


Figura 11. Mecanismo de inhibición del proteasoma por lactacistina y β -lactona. La N-acetilcisteína (N-Ac-Cys) reacciona con la clasto-lactacistina β -lactona para formar un tioéster análogo a la lactacistina. La evidencia experimental sugiere que la β -lactona puede cruzar la membrana celular y que interactúa con la subunidad β del proteasoma. El ácido dihidroxilo, es el producto de hidrólisis del tioéster de la lactacistina (Kisselev and Goldberg, 2001).

6.5 Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo durante el cual ocurre crecimiento y proliferación de células, desarrollo del organismo, regulación de la reparación del daño al DNA, hiperplasia de tejidos como respuesta a una lesión y enfermedades como cáncer. El ciclo celular involucra muchas proteínas regulatorias que dirigen el ciclo a través de una secuencia específica de eventos que culminan en mitosis y en términos generales en la producción de dos células hijas (Schafer, 1998, Hochegger *et al.*, 2008). Para llevar a cabo esa regulación, las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y las ciclinas son las proteínas centrales que regulan la progresión de la célula a través de las fases del ciclo celular denominadas fases G_1 , S, G_2 y M.

El ciclo celular se divide con base a criterios morfológicos en interfase y fase mitótica (fase M) que incluye profase, metafase, anafase y telofase. Durante la interfase se llevan a cabo las fases G_1 , S y G_2 . En la primera fase G_1 , la célula se prepara para la síntesis de DNA, durante la fase S las células sintetizan DNA y por tanto, tienen un contenido aneuploide de DNA entre $2N$ y $4N$. La fase G_2 es un intervalo donde la célula se prepara para la mitosis o fase M. En algunos casos, se ha denominado una fase G_0 , la cual se relaciona con el hecho de que la célula no está en un ciclo activo de división, pero posee potencial para llevarlo a cabo (Figura 12) (Schafer, 1998, Hochegger *et al.*, 2008). Existen variaciones de este esquema, algunas asociadas con la longitud de las fases debido a la presencia o ausencia de fases G (G_1 y G_2) separando las fases principales S y M y un estado quiascente (G_0) donde el ciclo celular se detiene. A pesar de las diferencias en este proceso, la estructura y el papel de las moléculas regulatorias, principalmente las cinasas dependientes de ciclinas, parecen estar conservados en todos los eucariontes (Naughton and Bell, 2007).

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular. Las vías de señalización mitogénicas y la regulación del ciclo celular están unidas de forma estrecha debido a que la estimulación de receptores para factores de crecimiento inicia cascadas de señalización que llevan a la activación de la maquinaria del ciclo celular, resultando en la proliferación celular (Besson y Yong 2001). Las células en G_0 (quiascentes) o en G_1 pueden estimularse por mitógenos (factores de crecimiento) para progresar de G_1 a la fase S. Esta transición es dependiente de mitógeno hasta

que las células alcanzan el “punto de restricción”. Después de este punto, las células se comprometen de forma irreversible a la síntesis de DNA a pesar de la ausencia de la señal mitogénica. Debido a su naturaleza irreversible, el punto de restricción es altamente regulado. Pasar a través de este punto de revisión se determina por factores de regulación del ciclo celular positivos y negativos (Bretones *et al.*, 2015). Estos puntos de revisión aseguran el tiempo apropiado para que ocurran eventos específicos en el ciclo celular y que se lleve a cabo la síntesis del DNA (Besson and Yong, 2001, Stewart *et al.*, 2001).

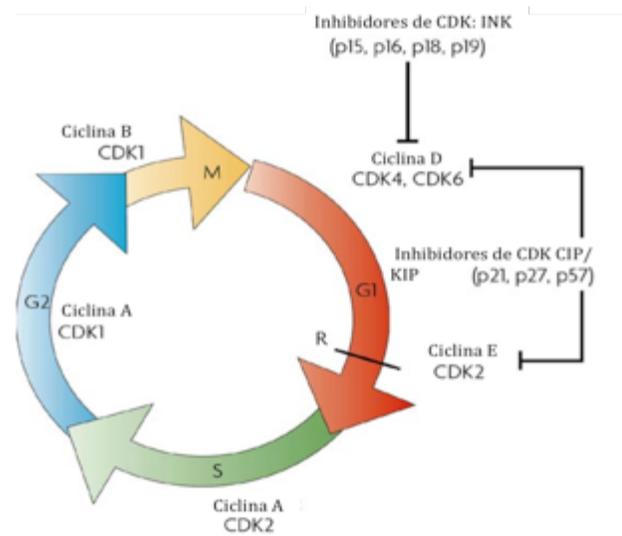


Figura 12. Modelo clásico del ciclo celular mitótico en mamíferos. En el esquema se muestran las cuatro fases del ciclo celular. La interfase que comprende las fases G1 (en rojo), S (en verde) y G2 (en azul) y la fase Mitótica o M (en amarillo). A los lados se muestran las proteínas reguladoras para cada una de las fases. Con las flechas flechas planas se muestran algunas proteínas que inhiben la progresión del ciclo a través de la unión con una cinasa dependiente de ciclina (CDK) (Tomado de Dehay y Kennedy, 2007).

La mayoría de los mitógenos controlan la tasa de división celular uniéndose a receptores de membrana con actividad de tirosina-cinasas. No obstante, múltiples receptores incluyendo receptores de tipo integrinas, de tipo serpentina, receptores de citocinas y proteínas G-heterodiméricas son capaces de ser activados por mitógenos y de activar, al igual que los receptores de tirocina cinasas, a la proteína G pequeña Ras (Molina and Adjei, 2006). En la vía de Ras, la unión del ligando con el receptor induce la oligomerización del receptor, un proceso que resulta en la yuxtaposición de los dominios citoplasmáticos y catalítico en un una forma que se

permite la activación de cinasas y transfosforilación. De esta manera, proteínas como: la proteína de unión al receptor de factor de crecimiento 2 (Grb2) son capaces de reconocer los dominios de homología 2 (SH2) como Shc, que a su vez reclutan factores intercambiadores de guanina (GEFs) como SOS-1 a la membrana celular (McCubrey *et al.*, 2007). Los GEFs son capaces de interactuar con Ras en la membrana celular para promover un cambio conformacional y el cambio de GDP por GTP. Después de la activación de Ras, Raf (que es un miembro de cinasas de serina/treonina) se recluta a la membrana celular uniéndose con esta. La activación de Raf desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (cinasas activadas por mitógenos) ((Molina and Adjei, 2006, McCubrey *et al.*, 2007). A su vez estas proteínas MAPK transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras (cinasas de proteínas o factores de transcripción). Esta cascada de fosforilaciones ocasiona la transcripción de genes tempranos (entre los que destacan los que codifican a las ciclinas de G₁), algunos de estos genes a su vez activan la transcripción de otros genes denominados genes tardíos. De esta manera la vía de señalización Ras-MAPK transmite señales extracelulares al núcleo activando la maquinaria del ciclo celular (Molina and Adjei, 2006).

En el entorno intracelular, el ciclo celular se regula principalmente por complejos de cinasas dependientes de ciclina (CDK) y ciclinas (Sherr and Roberts, 2004). Las CDKs son proteínas cinasa de serina/treonina que se activan en puntos específicos en el ciclo celular. Las CDKs son críticas para la progresión del ciclo celular y su regulación se determina por un estado de fosforilación en residuos de treonina y tirosina. La actividad de las CDKs requiere de la unión de cofactores específicos, las ciclinas e inhibidores de CDKs (CKIs). Las ciclinas juegan un papel dual como activadores y como identificadores de sustratos específicos, mientras que los CKIs se unen e inhiben a las CDKs (Bendris *et al.*, 2015).

Las ciclinas son sintetizadas y destruidas en momentos específicos durante el ciclo celular, por tanto regulan la actividad de las CDKs en una manera temporal (Figura 13 c-b). Además, las ciclinas tienen la propiedad de ayudar a la internalización de CDKs al núcleo, gracias a que contienen señales de localización nuclear que no se encuentran presentes en las CDKs. Algunas CDKs se unen a más de una ciclina (Figura 13c) (Malumbres and Barbacid, 2009). En conjunto, el complejo CDK-ciclina fosforila para regular procesos importantes en la célula como la replicación del DNA o la condensación de los cromosomas de forma directa o indirecta, a través de varias cinasas efectoras. Parte de la expresión cíclica se debe a una degradación regulada. Las ciclinas

contienen secuencias PEST, motivos ricos en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T), los cuales son blancos para degradación por ubiquitinación en momentos específicos. En general, antes de que una célula pueda entrar a la siguiente fase del ciclo, la ciclina apropiada de la fase previa se degrada y la ciclina de la siguiente fase se sintetiza (Figura 13 c y d) (Besson and Yong, 2001).

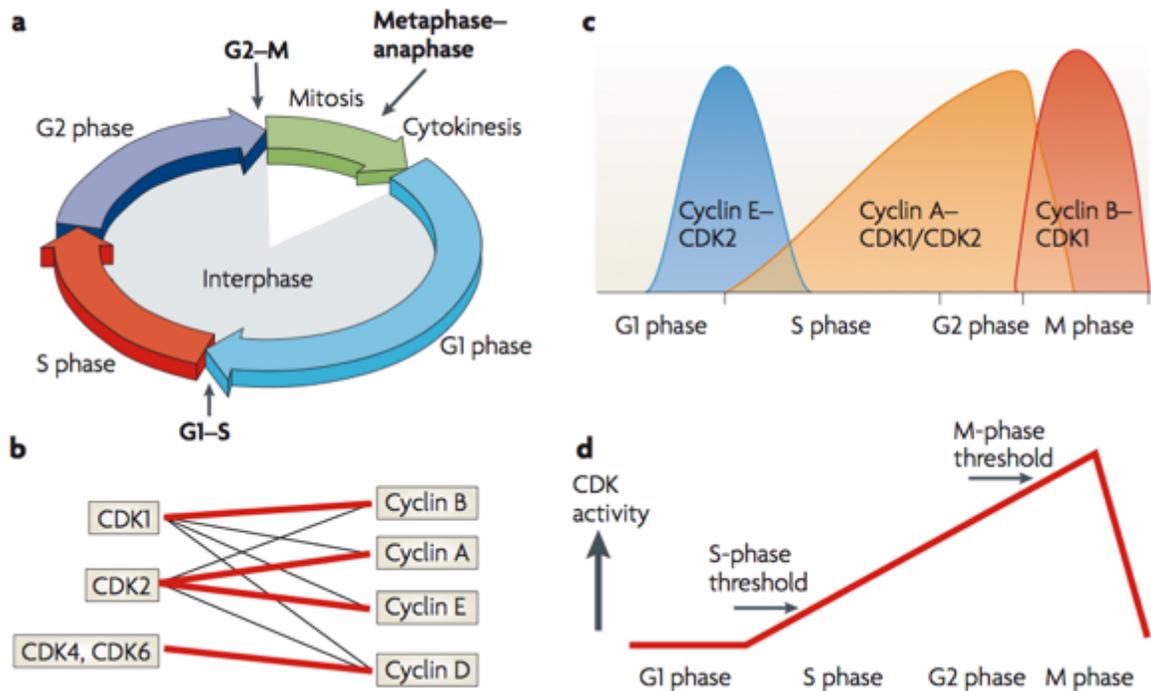


Figura 13. Cinasas Dependientes de Ciclina (CDK) y su papel en la progresión a través del ciclo celular y su papel en la progresión del ciclo celular. (a) Durante las diferentes fases del ciclo celular, los niveles de ciclinas se elevan y se asocian con sus CDKs (b) Cada CDK1 y CDK2 pueden unirse a diferentes ciclinas mientras que la CDK4 y CDK6 sólo se unen a Ciclinas de tipo D. En rojo se muestra la Ciclina preferencial por cada CDK (c) De acuerdo al ciclo clásico del control del ciclo celular, se muestran las ciclinas y CDKs que regulan cada una de sus fases. (d) La actividad de las CDKs promueve el paso de las células a las siguientes fases del ciclo (Esquema tomado de Hoehegger, *et al.*, 2008).

Aunque, en esencia, el ciclo celular entre levaduras y mamíferos es similar, los mamíferos varían las CDKs y ciclinas durante cada fase del ciclo celular para asegurar la progresión secuencial a lo largo del ciclo de una manera ordenada (Lim and Kaldis, 2013). Las células de humano contienen múltiples *loci* que codifican para 13 CDKs y 25 ciclinas. Sin embargo, solo un cierto subconjunto de CDK-ciclinas está involucrado de manera directa con el ciclo celular. Estas incluyen tres CDKs de interfase (CDK2, CDK4 y CDK6) una CDK mitótica (CDK1, también conocida como proteína de

control en la división 2 o CDC2) y diez ciclinas que pertenecen a cuatro clases diferentes (ciclinas A, B, D y E) (Malumbres and Barbacid, 2009).

6.5.1 Fase G₁

Durante la fase G₁ en mamíferos, se expresan las ciclinas tipo D (ciclinas D1, D2 y D3) y sus parejas catalíticas CDK4 y CDK6. La transducción de señales inducida por mitógeno promueve la activación de complejos CDK-ciclina D en varios niveles, incluyendo la transcripción de genes, traducción de ciclina D, ensamblaje de ciclinas D con sus parejas CDK y que éstas se importen al núcleo para fosforilar sus sustratos. La presencia de estas ciclinas después de un estímulo mitogénico generalmente ocurre de manera altamente regulada para que se de el inicio del ciclo celular. La falla en la expresión de estas ciclinas resulta en el paro del ciclo celular en puntos específicos (Sherr and Roberts, 2004).

Los reguladores negativos del ciclo celular difieren entre las fases. Un nivel de regulación de los complejos CDK-ciclina se da por la unión de inhibidores de CDK (CKIs). La familia de genes INK4, que codifica a p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INKd}, se unen a CDK4 y CDK6 e inhiben la actividad de cinasa al interferir con su asociación con ciclinas tipo D (Santamarina *et al.*, 2008, Besson *et al.*, 2008). Por otra parte, los miembros de la familia Cip/Kip p21^{CIP/Warf1/Sdi1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} comparten un dominio N-terminal conservado que media la unión con ciclinas y CDKs pero divergen en la parte restante de su secuencia, lo que sugiere que estas proteínas pueden tener funciones y regulación distintas. En específico, p21 es un blanco transcripcional de p53 y media el paro del ciclo celular en G₁ o G₂ inducido por daño al DNA. Además, la expresión de p21 y p27 se eleva generalmente en células privadas de mitógeno y otros estados quiescentes y se regula negativamente de forma rápida cuando la célula entra al ciclo celular. Por otra parte, p57 es muy importante en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo del embrión (Besson *et al.*, 2008).

Una vez que se activa el ciclo por señales mitogénicas, las ciclinas D en asociación con sus subunidades catalíticas CDK4 y CDK6 promueven la división celular al inactivar dos clases de inhibidores del ciclo celular: reguladores negativos de la expresión de genes de la fase S y una clase de proteínas inhibidoras de Cdk. El complejo CDK-ciclina D fosforilan a los miembros de la familia Rb o de Retinoblastoma (Rb, p107 y p130). La pRb hipofosforilada se une al factor de

transcripción E2F, haciéndolo incapaz de transcribir. Los miembros de esta familia E2F se unen formando heterodímeros con las proteínas de la familia DP, DP-1, -2 o -3 (Sherr and Roberts, 2004).

Una vez que CDK 4/6-ciclina D fosforilan a Rb, éste libera a E2F-DP, dejándolo libre para que se transcriban una serie de genes cuyos productos se requieren para el metabolismo y replicación del DNA y la transcripción de los genes de las ciclinas tipo E (E1 y E2). Se ha demostrado que el complejo CDK4-ciclina D también fosforila a Smad3 (proteínas que pertenecen a la familia TGF), regulando de forma negativa las funciones de complejos transcripcionales que median la inhibición del crecimiento celular por proteínas de la familia TGF- β (Sherr and Roberts, 2004).

La actividad de ciclina E-CDK2 es periódica y máxima en la transición de G₁ a S. No obstante, las ciclinas E parecen exhibir algunos de los atributos clásicos de las ciclinas G₁: específicamente, su expresión y actividad es al menos en parte dependiente de mitógeno y sus blancos incluyen una serie de inhibidores de G₁ que también son blancos de las ciclinas D – Rb y p27^{Kip1}. La CDK2-ciclina E fosforilan a p27^{Kip1} en un residuo de treonina (Thr 187) proporcionando un motivo de reconocimiento para la ligasa de ubiquitina E3 (SCF^{Skp2}) para su ubiquitinación y su posterior degradación en el proteasoma. Además, este complejo fosforila un segundo conjunto de sustratos que se encuentran directamente involucrados con la replicación celular; estos eventos afectan la expresión de genes de histonas, duplicación del centrosoma, licenciamiento del origen de replicación, entre otras (Sherr and Roberts, 2004). La CDK2 puede fosforilar a otros factores transcripcionales como FoxO1, inhibiendo su actividad transcripcional por exportación nuclear, de esta forma permitiendo la sobrevivencia y proliferación celular (Hedrick, 2009).

La transcripción de genes de las ciclinas E y A2 son dependientes de E2F y su síntesis aumenta después de la fosforilación de Rb por el complejo CDK-ciclina D. Además, la actividad de ciclina E-Cdk2 y ciclina A-Cdk2 mantienen un nivel bajo de p27^{Kip1} en las células en la fase S a través de proteólisis dirigida por fosforilación (Sherr and Roberts, 2004). Una vez que el programa de transcripción de E2F se inicia y se alcanza una actividad significativa de CDK2 dependiente de ciclina E y A2, las células ya no dependen de CDK4/6-ciclina D ni de las señales mitogénicas para mantener la fosforilación de Rb. Por lo tanto, la activación de CDK2 puede determinar el mecanismo por el cual la inactivación de los dos inhibidores del ciclo celular, Rb y p27^{Kip1}, cambia a

las células de forma irreversible de un estado dependiente de mitógeno a uno independiente de éste (punto de restricción) (Sherr and Roberts, 2004).

6.5.2 Fase S

La degradación de la ciclina E determina la disminución abrupta de la actividad de ciclina E-CDK2 en la fase S temprana. La fosforilación de GSK-3 y CDK2, es necesaria para fosforilar a la ciclina E para su ubiquitinación por la ligasa E3 (SCF^{Fbw7}) para su destrucción en el proteasoma. La participación de GSK-3 β , una enzima que se inhibe por la vía de señalización del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, en determinar la estabilidad de la ciclina E, implica que ésta se puede influenciar directamente por al menos una cascada de señalización de cinasa dependiente de mitógeno. Además, la cinasa AKT controla la localización subcelular de las proteínas Cip/Kip al fosforilar y afectar la importación nuclear, proporcionando otra forma de regulación de CDK2-ciclina E en respuesta a estímulos externos (Sherr and Roberts, 2004).

En la fase S, se piensa que el complejo ciclina A-CDK2 fosforila sustratos que inician la replicación del DNA y que se requiere para la terminación coordinada de la fase S con la activación de CDKs mitóticas (fase G₂). Debido a que CDK2 organiza numerosas actividades que se requieren para entrar y progresar en la fase S, progresar en la fase S y entrar en mitosis, esta cinasa se ha visto como un regulador maestro esencial (Sherr and Roberts, 2004). Finalmente, se piensa que CDK1 es activada por las ciclinas-A al final de la interfase para facilitar el inicio de la mitosis. Después de la ruptura de la envoltura nuclear, las ciclinas A se degradan, facilitando así la formación del complejo CDK1-ciclina B, lo cuales son responsables de llevar a la célula a mitosis (Malumbres and Barbacid, 2009).

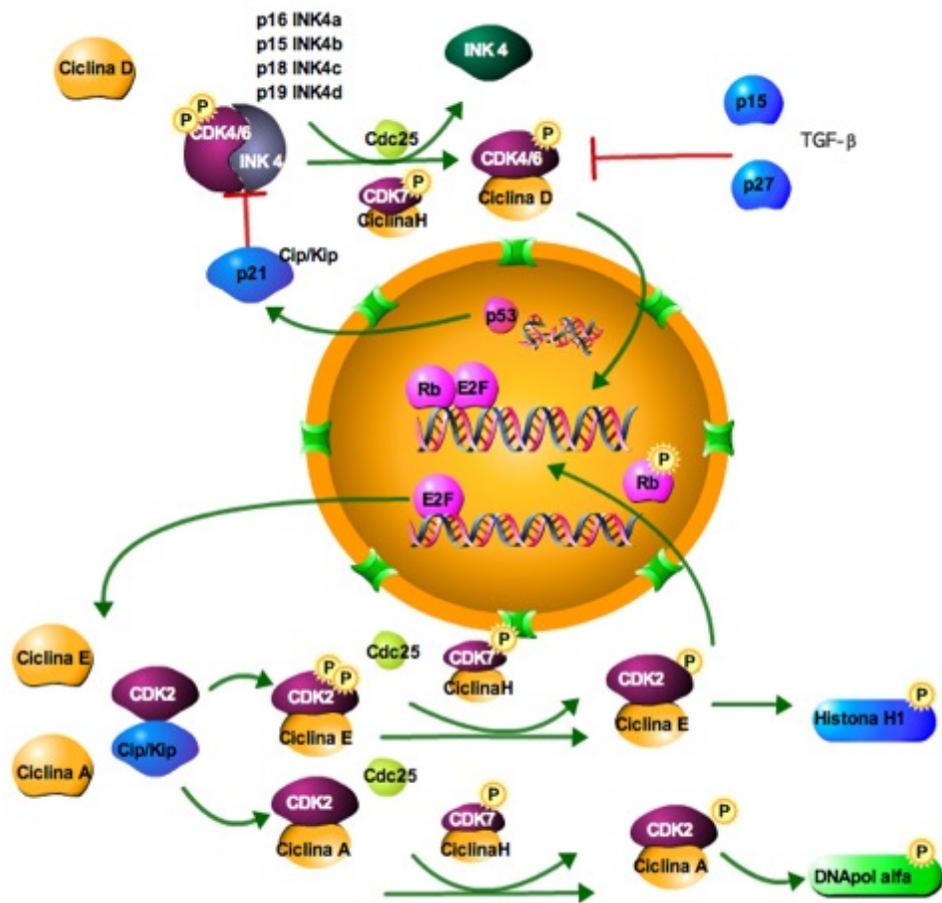


Figura 14. Transducción de señales en el control del ciclo celular entre las fases G1 a S. Las señales mitogénicas inducen la expresión de ciclinas G1, los complejos CDK-ciclina G1 fosforilan la proteína Rb, que a su vez, liberan a los factores de transcripción E2F, lo que inicia la transcripción de genes que se requieren para la entrada a la fase S (por ejemplo, ciclina E). Los miembros de la familia INK4 pueden inhibir CDK4/6, lo que previene la hiperfosforilación de Rb y la progresión a la fase S. Los miembros de la familia Cip/Kip pueden actuar como inhibidores de CDK-ciclina. En amarillo se muestran Ciclinas, en guinda las proteínas CDK, en verde claro las proteínas de actividad dual de la familia Cdc25. Círculos pequeños en gris, verde oscuro y azul proteínas inhibidoras de la familia CIP/KIP. (Imagen realizada con ChemBio)

Las CDKs también pueden ser reguladas por fosforilaciones inhibitorias de dos residuos conservados en el extremo N-terminal (Thr14 y Tyr15 en la CDK1 y CDK2 de humano) localizados dentro del sitio de unión al ATP de la enzima. La fosforilación en estos residuos se lleva a cabo por las cinasas Wee1 y Myt1. La desfosforilación de ambos residuos se requiere para la activación de CDK y la regulación del ciclo celular, en particular en la mitosis para el control de la activación de CDK1 y esto se lleva a cabo por la familia de fosfatasa de actividad dual CDC25 (Bretones *et al.*,

2015). En el genoma humano se han encontrado tres genes cuyos productos se denominan CDC25A, B y C. En términos generales se ha establecido que CDC25A está involucrada en el control de la transición de G₁ a S y es responsable de la desfosforilación y activación de CDK2/ciclina E y CDK2/ciclina A. En el caso de CDC25B y CDC25C son las fosfatasas principales requeridas para la entrada a la mitosis. CDC25B se propone que es responsable de la activación inicial de CDK-1/ciclina B en el centrosoma durante la transición G₂-M, la que es seguida por la activación completa de CDK1/ciclina B por CDC25 en el núcleo al inicio de la mitosis (Boutros *et al.*, 2007).

6.5.3 Fase G2-M

A lo largo del ciclo celular existen “puntos de supervisión” del ciclo celular, existen puntos de supervisión que detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a daño a DNA o carencia de nutrientes para que éste pueda ser reparado y pueda ocurrir una correcta transmisión de la información genética. Los componentes de estos puntos de revisión actúan sobre los reguladores del ciclo celular para detener el ciclo como parte de la respuesta al DNA dañado (Lim and Kaldis, 2013).

El módulo ATM/Chk2 se activa después de la ruptura en las dos cadenas de DNA y la vía ATR/Chk1 responde principalmente a la ruptura de una sola cadena de DNA o a lesiones grandes (Reinhardt and Yaffe, 2009). La primera cascada inhibe rápidamente la progresión a mitosis: las cinasas Chk fosforilan e inactivan a CDC25 lo que previene la activación de CDK1. La segunda cascada constituye la regulación corriente abajo de p53 que incluye a las proteínas 14-3-3 que se unen al complejo CDK1-ciclina B y lo exportan del núcleo al citoplasma (Hermeking and Benzinger, 2006); GADD45 disocia al complejo CDK1-ciclina B por medio del dominio de interacción de GADD45 con CDK1 (Jin *et al.*, 2000) y, p21^{cip1} que es un inhibidor de CDK1 (Abbas and Dutta, 2009) (Figura 15).

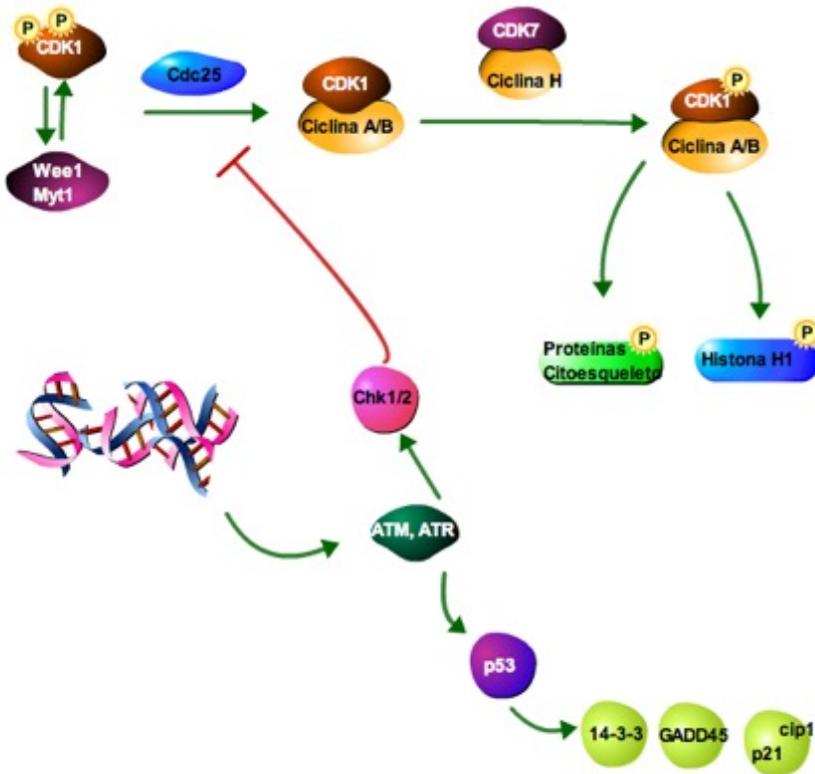


Figura 15. Control del ciclo celular entre las fases G2 a M. Chk1 media el paro del ciclo celular inducido por ATR. ATR activa Chk1 que fosforila e inactiva a CDC25 A y C. CDC25 fosforilada se ubiquitina y degrada, dejando a los complejos CDK/ciclina en su forma inactiva, lo que resulta en el paro en la fase S y G2. CDK1/CiclinaB se unen a 14-3-3 y se exporta del núcleo a citoplasma; GADD45 disocia al complejo CDK1/CiclinaB; p21 al ser un inhibidor de CDK se une a CDK1 inhibiendo la formación del complejo CDK/Ciclina. Lo anterior resulta en el paro en G2 (Imagen realizada con ChemBio).

6.6 Regulación del Ciclo Celular por Ubiquitinación

La degradación selectiva y programada de proteínas proporciona dirección, orden y tiempos adecuados para los eventos del ciclo celular. La ubiquitinación en este sentido regula la estabilidad, localización y función de ciertos sustratos. La desregulación de la ubiquitinación de proteínas o los procesos de degradación pueden llevar a la proliferación aberrante de células y al cáncer (Teixeira and Reed, 2013).

Los dos complejos de E3 ligasas que están involucrados en la proteólisis de proteínas regulatorias clave del ciclo celular son del tipo cullina-RING ligasas (CRL). Estos dos complejos CRL están estructuralmente relacionados: el complejo SCF (Skp/cullina/F-box) y el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) (Teixeira and Reed, 2013). Ambos complejos forman estructuras rígidas que seleccionan, unen y posicionan sustratos para transferir ubiquitinas por medio de enzimas E2.

En cuanto a los complejos SCF, éstos juegan un papel central en la regulación del ciclo celular, incluyendo el control del inicio de la fase S y mitótica al ubiquitinar CKIs, ciclinas de fase G1 y S e inhibidores mitóticos. Los complejos SCF se encuentran constituidos por tres componentes no variables- RBX1 (proteínas RING), Cullina 1 (CUL1, que es la proteína de andamiaje) y SKP1 (proteína adaptadora); así como un componente variable, que se une a través de un motivo caja F a SKP1 y son las responsables del reconocimiento al sustrato (Nakayama and Nakayama, 2006).

Se han identificado cerca de 70 proteínas caja F en humanos y se pueden clasificar en tres categorías: aquellas con repetidos WD40 (FBXW), con repetidos ricos en leucinas (FBXL) y otros dominios (FBXO)(Nakayama and Nakayama, 2006). Los complejos SCF que tienen los papeles más dominantes en el control del ciclo celular contienen las proteínas de caja F: SKP2 (proteína asociada a la cinasa de fase S-2, también conocida como Fbl1), FBW7 (proteína caja F que contiene repetidos WD40-7, también conocida como Cdc4, Sel-10 y Archipelago) y β -TRCP (proteína que contiene repetidos de transducina β , también conocida como Slimb y Fbw1) (Teixeira and Reed, 2013). La fosforilación de secuencias específicas en sustratos blanco, conocidos como fosfodegrones (uno o una serie de residuos fosforilados en los sustratos) se requiere para el reconocimiento de las proteínas de caja F mejor caracterizadas, lo que lleva a la formación de cadenas de ubiquitina unidas en Lys48 y su posterior degradación (Teixeira and Reed, 2013).

SKP2 se descubrió originalmente como una proteína que se asocia a ciclina A-CDK2. En conjunto con SKP2, el complejo SCF tiene como blancos a los Inhibidores de CDK: p27, p21 y p57 para su degradación. También se conoce que SKP2 tiene como objetivo p130, ciclina A, ciclina D1, ciclina E libre, E2F1, ORC1, CDT1, CDK9, MYC, B-MYB, SMAD4, RAG2, UBP43, FOXO1 y la E7 de papilomavirus. Sin embargo, p27 parece ser el objetivo principal de SKP2. FBW7 tiene como blanco varias oncoproteínas incluyendo ciclina E, MYC, JUN, Notch 1 y Notch 4 para su degradación. β -TRCP es una proteína de caja F que tiene varios reguladores del ciclo como blancos. Algunos ejemplos son EMI1/2, WEE1A y CDC25A/B (Nakayama and Nakayama, 2006).

El complejo APC/C controla la progresión a través del intervalo G1 y la mitosis, al ubiquitinar varios reguladores del ciclo importantes, incluyendo ciclinas mitóticas, reguladores de la anafase, factores de ensamblaje del huso (SAFs) y proteínas de replicación del DNA (Teixeira and Reed, 2013).

El APC/C es estructuralmente similar al complejo SCF y consiste de componentes centrales invariables –APC11 (proteína RING relacionada a RBX1), APC2 (proteína de andamiaje relacionada a CUL1) y al menos 11 componentes sin un papel definido- así como el componente variable conocido como activador (Nakayama and Nakayama, 2006). La activación del APC/C se logra a través de la asociación con una o dos subunidades coactivadoras, que también sirven como sustratos adaptadores: la proteína de ciclo de división celular Cdc20 (también conocida como Slp1 y Fzy) y Cdh1 (homólogo de Cdc20-1, también conocida como Hct1, Ste9 y Fzr). Ambos adaptadores reconocen motivos de destrucción cortos (degrones) en los sustratos blanco a través de dominios C-terminal compuestos de repetidos WD40. Los motivos de destrucción canónica reconocidos por APC/C son la caja D (secuencia consenso RXXLXXXXN) y la caja KEN (secuencia consenso KENXXXN). Mientras que la Cdc20 reconoce preferencialmente motivos caja D, Cdh1 reconoce los de caja D y KEN (Teixeira and Reed, 2013).

Después de la replicación, las cromátidas hermanas se acompañan hasta la anafase por medio del complejo multiproteico cohesina. La separasa corta la cohesina, pero su actividad está suprimida por la securina. La degradación de la securina por APC/C^{CDC20} activa la separasa, lo que resulta en el corte de la cohesina y la separación de las cromátidas hermanas. Otras moléculas blanco son las ciclinas mitóticas. Por otra parte, CDH1 reconoce otras proteínas en la fase M tardía y G1, como ciclinas mitóticas, CDC20, CDH1, Aurora A, Aurora B, PLK1, NEK2A, geminina, CDC6, mE2-C, SNO1, ribonucleótido reductasa R2, timidina cinasa 1, TPX2 y SKP2. A diferencia de CDC20, los niveles de CDH1 son constantes a lo largo del ciclo. La actividad de CDH1 es regulada por fosforilación y desfosforilación dependiente del ciclo celular, siendo desfosforilada en la fase M tardía y G1 y fosforilada durante la fase S, G2 y M temprana. La fosforilación de CDH1 por complejos ciclina/CDK inhiben la activación del complejo APC/C al evitar que CDH1 se una a las subunidades del APC/C, mientras que la desfosforilación de CDH1 por la fosfatasa CDC14 induce la activación del APC/C al permitir que CDH1 tenga acceso a las subunidades del APC (Nakayama and Nakayama, 2006).

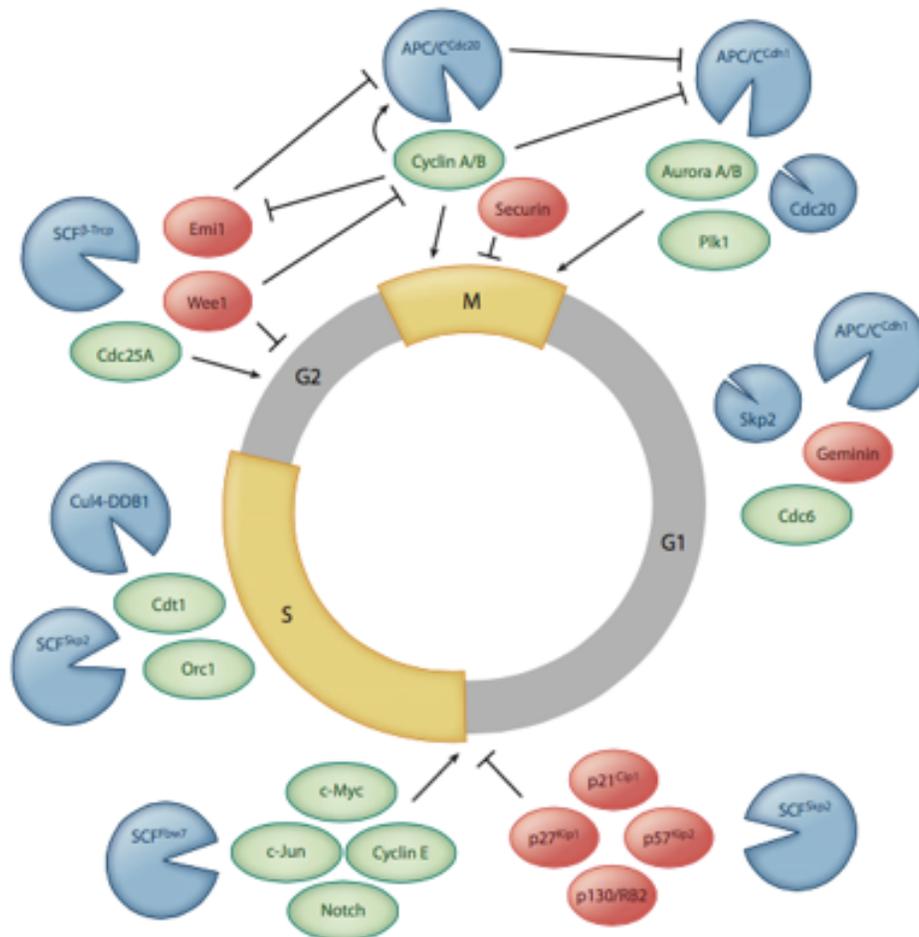


Figura 16. Degradación mediada por ubiquitina de reguladores del ciclo celular: Complejos APC/C y SCF. Las E3 ligasas (círculos azules) llevan a cabo la ubiquitinación de activadores del ciclo celular (óvalos verdes y flechas) e inhibidores (óvalos rojos y flechas planas) en fases específicas del ciclo celular: G1, S, G2 y M. El complejo APC/C ubiquitina sustratos blanco de la mitad de la fase M al final de la fase G1, mientras que las ligasas SCF están activas desde la fase G1 tardía a la fase M temprana. El complejo Cul4-DDB1 muestra actividad de ligasa de ubiquitina en la fase S (Teixeira and Reed, 2013).

6.7 Ciclo celular en *Plasmodium* spp.

En los miembros del Phylum Apicomplexa el ciclo celular puede diferir de un ciclo “típico” dependiendo de la fase del ciclo de vida que está ocurriendo y además, sus divisiones celulares difieren de la que se observan en otros eucariontes y por lo tanto, la regulación de la división celular parece ser única en estos organismos. Mientras que los zoítos invasivos son similares en todo el phylum, las fases intracelulares difieren en tamaño, forma y arquitectura. Los Apicomplexa mezclan y empalman de forma variable tres elementos: replicación del DNA y segregación nuclear, división nuclear y al final, citocinesis o gemación. Mientras que *Toxoplasma* sp. completa todos estos elementos del ciclo al final de cada ronda de replicación del DNA, *Plasmodium* y *Sarcocystis* llevan a cabo citocinesis y/o divisiones nucleares durante múltiples ciclos, formando fases que son multinucleadas o que contienen un sólo núcleo poliploide (estas formas de división se conocen como endodiogenia, esquizogonia y endopoliogenia, respectivamente) (Striepen *et al.*, 2007).

Estudios utilizando inhibidores de la síntesis de DNA (por ejemplo, afidicolina) y agentes disruptores de microtúbulos, sugirieron que los puntos de revisión del ciclo celular clásico podían estar ausentes en los apicomplexa. Sin embargo, estudios usando diferentes agentes bloqueadores (timidina, ditiocarbamato de pirrolidina) y la caracterización de una serie de mutantes sensibles a temperatura encontraron que el ciclo celular en *Toxoplasma* sp. podía ser detenido en lo que parecían ser puntos específicos, incluyendo los límites de G1/S y S/M. Además, la búsqueda de proteínas asociadas con los puntos de revisión en el ciclo celular han identificado numerosos candidatos, incluyendo ciclinas y CDKs en *Plasmodium* sp. y *Toxoplasma* sp. (Striepen *et al.*, 2007, Butler *et al.*, 2014).

En el ciclo de vida de *Plasmodium* sp. al menos existen cuatro fases de síntesis de DNA. Dentro del mosquito ocurre la microgametogénesis y la formación de esporozoitos. Dentro del hospedero vertebrado existe una esquizogonia pre-eritrocítica en el hígado y la esquizogonia eritrocítica (Arnot and Gull, 1998). Dado que ésta última fase es la que se encuentra más relacionada con la patogénesis de la malaria, éste es uno de los procesos más estudiados y el que se describirá en adelante. Durante cada una de estas fases dentro del ciclo de vida del parásito, éste aumenta su número al usar rondas sucesivas de síntesis de material nucleico para crear células multinucleadas y posteriormente orquestar eventos de citocinesis en masa para liberar a su progenie (Gerald *et al.*, 2011)

El ciclo de desarrollo intraeritrocítico de *P. falciparum* tiene una duración de 2 días y se divide en etapas de manera inicial con base en la morfología de las células parasitadas. Los anillos y trofozoítos, que siguen después de la invasión de un glóbulo rojo por un merozoíto haploide, son las fases de división pre-nuclear, donde la célula crece y se prepara para que ocurra la replicación. La fase de esquizonte se define morfológicamente por el aumento en cantidad y la distribución heterogénea del material nuclear. La esquizogonia termina con la aparición de merozoítos segmentados, condensados que son liberados por la ruptura de la membrana del eritrocito (Arnot and Gull, 1998).

En general, el modelo que se ha establecido para relacionar el desarrollo asexual del parásito y el ciclo celular, es como sigue: 1) Los merozoítos se encuentran en un estado similar a G_0 , con la cromatina condensada. Desde la fase de anillo a la de trofozoíto temprano se encuentran en una fase similar a G_1 de células de mamífero o levaduras. La síntesis de DNA inicia en trofozoítos, el cual se llevan a cabo de tres a cuatro rondas de síntesis de DNA; sin embargo, la división del material nuclear (el inicio definido morfológicamente de la esquizogonia) no aparece hasta que el trofozoíto se ha agrandado y crecido. La síntesis de DNA puede continuar en esquizontes tempranos (definido como la presencia de más de un núcleo) 3) La segmentación ocurre como una fase independiente al final de ciclo eritrocítico asexual, llevando a cabo rondas de mitosis y división nuclear para producir un esquizonte sincicial con 16 a 22 núcleos. Los merozoítos son formados después de que se ha terminado la fase S por rondas sucesivas de una mitosis poco entendida (Koyama *et al.*, 2009, Hammarton *et al.*, 2003, Arnot and Gull, 1998). En los esquizontes, las divisiones nucleares se producen de manera asincrónica, lo que resulta en una expansión no geométrica (el número resultante de núcleos no es un múltiplo de dos). Sin embargo, la última ronda de mitosis es sincrónica y coincide con el ensamblaje simultáneo de las células hijas (Francia and Striepen, 2014, Arnot and Gull, 1998, Gerald *et al.*, 2011).

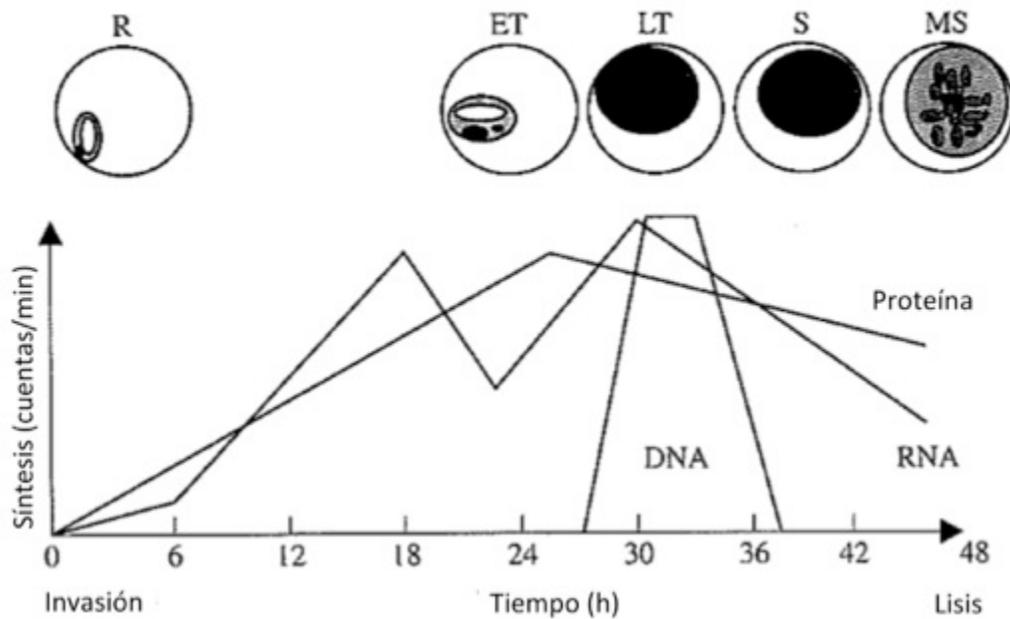


Figura 17. Esquema general del ciclo de división asexual intraeritrocítico de *P. falciparum*. Tiempo aproximado del inicio y cese de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (medido por la incorporación de precursores radioetiquetados) durante el desarrollo de *P. falciparum* en cultivos sincronizados. R, Anillo; ET, Trofozoíto temprano; LT, Trofozoíto tardío; S, esquizonte; MS, esquizonte maduro (Tomado de Arnot y Gull, 1998).

6.7.1 Modificaciones postraduccionales en proteínas de *Plasmodium sp.*

6.7.1.1 Fosforilación

Como se mencionó, el ciclo de vida de *Plasmodium spp.* es complejo, y la tarea de adaptarse y responder a varios ambientes a los que se enfrenta es un reto. Aunque la regulación transcripcional juega una parte importante en controlar el desarrollo del parásito, aspectos clave de regulación celular ocurren a través de modificaciones postraduccionales (Doerig *et al.*, 2015).

La fosforilación reversible, mediada por proteína cinasas (PKs), es una de las maneras de regulación celular más importantes y con diferentes efectos, y es el mediador más importante de funciones celulares fundamentales como proliferación, diferenciación, migración y homeostasis (Doerig *et al.*, 2015). De acuerdo a lo anterior, existen numerosas proteína cinasas (PKs) que regulan diversas actividades celulares (Koyama *et al.*, 2009). En humanos las PKs se han agrupado por su homología en siete grupos principales:

- CK1 (caseína cinasa 1)

- CMCG (quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la familia de cinasas sintasas de glicógeno 3 (GSK-3), las cinasas similares a CDK (CLK)).
- TKL (proteínas similares a tirosina cinasas)
- AGC (PKA (proteína cinasa dependiente de adenosina monofosfato cíclico), PKC (proteína cinasa dependiente de guanosina monofosfato cíclico), PKC (proteína cinasa C) y proteínas relacionadas)
- CamK (quinasas dependientes de calcio/calmodulina)
- STE (PKs que actúan como reguladores de MAPKs)
- TyrK (quinasas de tirosina)

En *Plasmodium* spp., a la fecha se han identificado de 86 a 99 genes que codifican a enzimas relacionadas con PKs, representando del 1.1 al 1.6% del número de genes codificantes (Doerig *et al.*, 2015, Doerig *et al.*, 2008, Solyakov *et al.*, 2011) y de éstas, 65 enzimas están relacionadas a las PK de otros eucariontes. Sin embargo, se han identificado algunas divergencias importantes con los grupos de cinasas de humanos:

- Ausencia de los miembros de la familia de Cinasas de tirosina (TyrK). A pesar de esta deficiencia, se han observado proteínas de *Plasmodium* fosforiladas en este residuo lo que ha llevado a postular la posible capacidad de cinasas de serina/treonina en fosforilar residuos de tirosina y de la presencia de cinasas análogas a cinasas reguladas de tirosina de especificidad dual (DYRK), donde su activación requiere la autofosforilación en una tirosina. Esta familia de DYRK se encuentra representada en animales, plantas, hongos y protozoarios (Aranda *et al.*, 2011).
- Presencia de PKs “huérfanos” sin ortólogos en células de mamíferos. Por ejemplo, la familia FIKK (denominado por un motivo conservado de Phe-Ile-Lys-Lys) con un sólo miembro en la mayoría de las especies pero con 20 miembros en *P. falciparum*. En *P. falciparum* la mayoría de los parálogos de FIKK están localizados en las regiones subteloméricas (Nunes *et al.*, 2007).
- Presencia de la familia de cinasas dependientes de calcio (CDPKs) que llevan un dominio de cinasa fusionado al dominio similar a calmodulina, una configuración que se encuentra en plantas y alveolados (Doerig *et al.*, 2015).

Varios inhibidores de cinasas han demostrado inhibir el desarrollo del parásito en diferentes fases del ciclo de vida, validando la importancia de la fosforilación en mantener el ciclo del parásito. En eucariontes, las cinasas (por ejemplo, las CDKs) juegan un papel fundamental en la progresión del ciclo celular. En el caso de *P. falciparum*, al menos dos, la PfPK5 y la Pfmrk, han demostrado ser reguladas de manera positiva por ciclinas de mamíferos y de manera negativa por inhibidores de CDKs. Esto demuestra que estas proteínas podrían tener el mismo papel que en otros eucariontes y se especula que podrían tener un papel en la regulación de la esquizogina del parásito y en los ciclos de división nuclear (Chung *et al.*, 2009).

6.7.1.2 Ubiquitina

De manera inicial, *P. falciparum* parece tener tres fuentes conservadas de ubiquitina de fusión. Las dos proteínas de fusión PfUB_{S27a} y PfUB_{L40} que contienen una molécula de ubiquitina en el extremo N-terminal fusionada a una de dos proteínas ribosomales (S27a y L40) y el gen de poliubiquitina (PfpUB) (Ponts *et al.*, 2011). Las dos primeras fuentes de ubiquitina parecen estar expresadas a lo largo del ciclo de vida del parásito. De manera interesante, a pesar de que Pf Ub_{L40} muestra una alta homología en la secuencia proteica con otras especies de eucariontes, PfUb_{S27a} posee divergencias significativas dentro del dominio de ubiquitina (Chung *et al.*, 2009).

En *P. falciparum*, el gen de la poliubiquitina está presente como una sola copia en el cromosoma 12 (PF3D7_1211800) con cinco repetidos en tandem en el marco de lectura abierta (ORF) de la ubiquitina. Este gen presenta dos exones con el exón en el extremo 5' muy corto (28 pb) y un segundo exon más grande (Figura 18a). El análisis de la expresión de la poliubiquitina en *P. falciparum*, usando Northern y Western-blot, muestra que no sólo se regula a lo largo de su desarrollo sino que también es un gen inducible por choque térmico (Horrocks and Newbold, 2000, Ponts *et al.*, 2008). El gen PfpUb se expresa en todos los estadios del ciclo de vida con una expresión predominante en los parásitos intraeritrocíticos (Aminake *et al.*, 2012, Chung *et al.*, 2009).

La traducción del gen comprende cinco monómeros de ubiquitina que tienen un alto grado de conservación entre otras secuencias de eucariontes, con similitudes de hasta el 98% entre humanos, levaduras y otros apicomplexa. El análisis de las secuencias de aminoácidos de otros

eucariontes con distancias evolutivas grandes muestra un alto grado de conservación (Figura 18b) (Horrocks and Newbold, 2000).

La ubiquitina, como ya se ha mencionado, contiene siete residuos de lisina en diferentes posiciones que pueden interactuar para formar cadenas de poliubiquitina. En trabajos *in silico* se ha predicho que cerca del 70% del proteoma de *P. falciparum* contiene sitios de ubiquitinación, más que otras especies de eucariontes como *A. thaliana* o *S. cerevisiae*. Una explicación posible sobre esta observación es la diferencia en la composición de aminoácidos entre las diferentes especies; la lisina es el segundo aminoácido más abundante en *P. falciparum* y contiene cerca del doble de lisinas en comparación con las otras dos especies de eucariontes (Hamilton *et al.*, 2014, Ponts *et al.*, 2011).

En trabajos *in silico* y experimentales se ha demostrado que de las siete lisinas presentes en la ubiquitina, cuatro: Lys-6 (1.3%), Lys-11 (13.3%), Lys-48 (80.4%) y Lys-63 (4.9 %), son las lisinas más utilizadas para la formación de cadenas de poliubiquitina en *P. falciparum*, definido por su abundancia. En conjunto, estos estudios y el hecho de que la lisina es el segundo aminoácido más representado en *Plasmodium* sp. sugiere que una gran proporción del proteoma del parásito se encuentra ubiquitinado y que esas proteínas ubiquitinadas están involucradas en diferentes procesos celulares y son críticos en la progresión del ciclo de vida del parásito (Hamilton *et al.*, 2014, Ponts *et al.*, 2011).

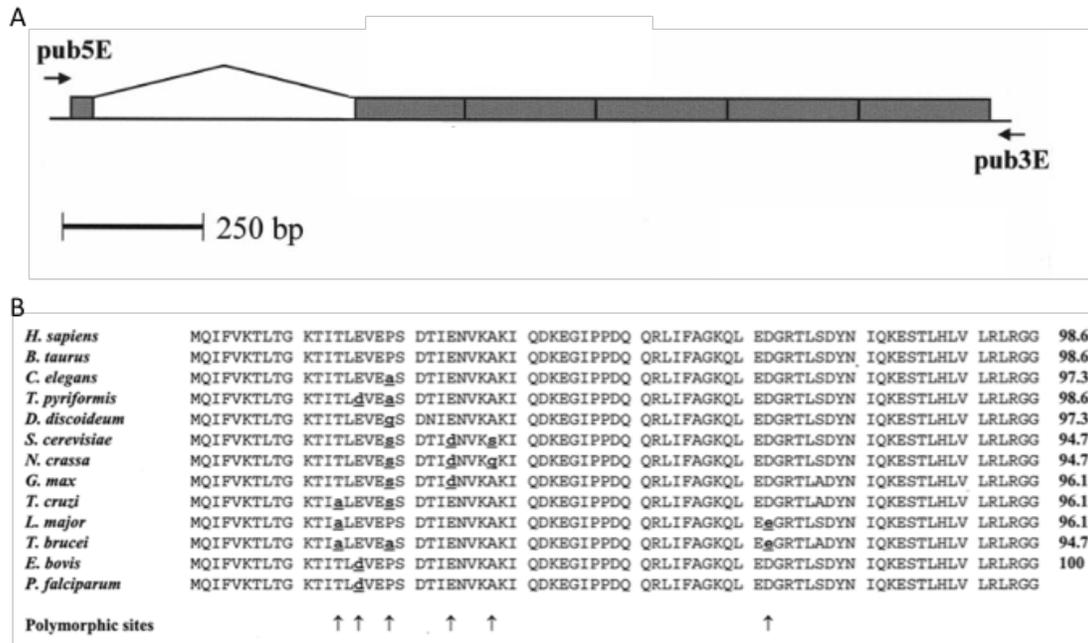


Figura 18. Ubiquitina en *P. falciparum*. **A)** Representación esquemática del gen de la ubiquitina en *P. falciparum*. El repetido en tándem más hacia el extremo 5' está interrumpido por un intrón de 526 bp después de 28bp del exon I. Cada repetido en tándem tiene una longitud de 228 bp. **B)** Comparación de la secuencia de aminoácidos de proteínas de ubiquitina en un rango de divergencia evolutiva. Cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a eucariontes superiores (*H. sapiens* y *B. taurus*) están subrayados e indicados con flechas debajo de los sitios polimórficos. La identidad de la secuencia de aminoácidos con la de *P. falciparum* está indicada como porcentaje después de cada secuencia (Horrocks and Newbold, 2000).

El genoma de *P. falciparum* también codifica para un ortólogo de Nedd8 de 8.5 kDa, una proteína similar a ubiquitina, que se conjuga de manera covalente a un número limitado de proteínas celulares de manera análoga a la ubiquitinación. Además, el genoma de parásito también codifica para otras proteínas similares a ubiquitina como son SUMO, Hub1, Urm1 y Atg8. Los datos de expresión génica sugieren que estas proteínas se expresan en todas las fases del ciclo de vida del parásito (Aminake *et al.*, 2012, Ponts *et al.*, 2008).

6.7.1.2.1 Complejos de Ubiquitinación en *Plasmodium* sp.

A pesar de que las enzimas E1 y E2 muestran un alto grado de conservación con las enzimas E1 y E2 de otros eucariontes, se ha encontrado que las ligasas E3 del parásito son las más abundantes, como sucede en otros eucariontes incluyendo al humano y son altamente divergentes. La anotación funcional de las E3 ligasas revela que estas enzimas en el parásito tienen un amplio rango de funciones potenciales que incluyen la regulación del ciclo celular, tráfico, reparación de

DNA, estructura de la cromatina y transporte de mRNA como sucede en eucariontes superiores. Sin embargo, algunas de estas proteínas parecen ser específicas del *phylum* Apicomplexa (Chung *et al.*, 2009).

En un estudio *in silico* se identificaron cuatro proteínas E3 ligasas con dominio HECT en *P. falciparum* y otros apicomplexa. Tres de ellas tienen homólogos en *S. cerevisiae*: TOM1, UFD4 y HUL5 (HUL5 tiene función desconocida). La cuarta proteína con dominio HECT, es similar a UPL5 en *A. thaliana*, que tiene una función desconocida pero se ha anotado como que puede estar involucrada en proliferación celular. Se describió que TOM1 actúa durante la interrupción del ciclo celular después de daño al DNA, mediando la ubiquitinación de CDC6, una proteína esencial en el inicio de la replicación del DNA. Por otra parte, la enzima UFD4 participa en la vía de Degradación de Ubiquitina de Fusión (UFD) que resulta en la poliubiquitinación de moléculas de ubiquitina “no removibles”. El “no removibles” se refiere a que la ubiquitina muestra resistencia al proceso de desubiquitinación debido a dos razones: un cambio en el último residuo de la ubiquitina o, la existencia, en la proteína sustrato, de una prolina inmediatamente después de la lisina a la que se une la molécula de ubiquitina (Ponts *et al.*, 2008, Sriram *et al.*, 2011, Hwang *et al.*, 2010).

Las E3 ligasas de tipo RING son el grupo más grande de E3 ligasas. Como ya se mencionó anteriormente, estas E3 ligasas se asocian con proteínas Cullinas y proteínas de unión a sustrato para formar las Cullina-Ring-Ligasas (CRL). Los dos CRLs que están involucrados con la progresión del ciclo celular son el complejo SCF y APC/C. *In silico*, se ha identificado al menos un homólogo de Cul-1 ó CDC53 (en levaduras) en todos los apicomplexa. Además, se han identificado homólogos para RBX1, Skp1 y proteínas de caja F; así como la proteína similar a Ubiquitina Nedd8, que se sabe modifica a las cullinas para cambiar su estructura tridimensional. Por lo anterior, los componentes mínimos que son requeridos para formar el complejo regulador del ciclo celular SCF están presentes en los genomas de apicomplexa. La situación es diferente para el complejo APC/C, donde no todas las proteínas que conforman el complejo, entre ellas la cullina clásica involucrada en este complejo (APC2) no se ha identificado *in silico* (Ponts *et al.*, 2008).

Además, también se han identificado al menos tres U-box ligasas *in silico* en *Plasmodium* sp. y otros apicomplexa. Dos se encuentran presentes en todos los apicomplexa: los homólogos a UFD2 y PRP19 en *S. cerevisiae*. UFD2 en levaduras, interactúa con CDC48 para la degradación asociada a

retículo endoplásmico dependiente de ubiquitina. Por otra parte, PRP19, juega un papel en el “*splicing*” del mRNA, activación del spliceosoma y reciclaje y respuesta al daño del DNA. Una tercera U-box se ha identificado con homología a la proteína CHIP (proteína de interacción con C-terminal de Hsp70) del humano. CHIP está involucrada en el control de calidad de proteínas al promover a ubiquitinación de proteínas desnaturalizadas de manera dependiente de Hsp70/Hsp90. CHIP también está involucrada en respuesta de choque térmico y prevención de la apoptosis (Ponts *et al.*, 2008).

6.7.1.2.2 Proteasoma en Plasmodium

Plasmodium spp. parece tener un proteasoma 26S típico. Se han identificado las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 5$ en el citoplasma y núcleo (pero no en el nucleolo) de las fases eritrocíticas, particularmente en trofozoítos y esquizontes, esto es, en fases que poseen una actividad metabólicamente alta y tienen que prepararse para la replicación de DNA y la división celular (Figura 19). Esto está en concordancia con los hallazgos de que el pico de las proteínas ubiquitinadas se encuentra en estas fases (Ponts *et al.*, 2011). Además, el proteasoma se expresa en gametocitos de ambos sexos durante su diferenciación del estadio I al V, lo que muestra un alto número de actividades de proteínas que deben ser apagadas en estas fases (Aminake *et al.*, 2011, Aminake *et al.*, 2012). Estudios *in silico* tratando de identificar homólogos de las subunidades del proteasoma de humano en *P. falciparum* identificaron que el parásito cuenta con toda las subunidades del proteasoma 26S (Aminake, Arndt *et al.* 2012).

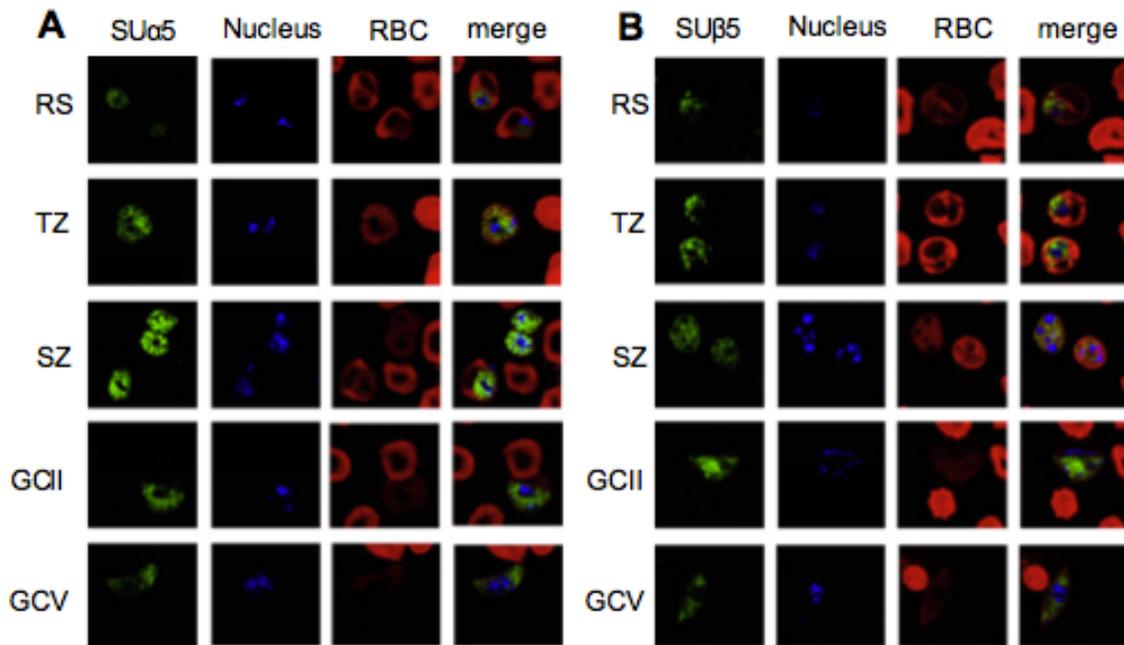


Figura 19. Localización subcelular de la subunidad $\alpha 5$ y $\beta 5$ en fases sanguíneas y gametocitos de *P. falciparum*. A-B) Inmunofluorescencia usando anticuerpo policlonal contra la subunidad $\alpha 5$ y $\beta 5$ (B) donde se observa la localización de las dos proteínas en las fases asexuales (RS, Anillo; TZ, Trofozoito; SZ, Esquizonte); así como la fase de gametocito (GC, Gametocito) II y V. Los núcleos fueron teñidos con Hoeschst (azul) y los eritrocitos (RBC) fueron contrastados con Azul de Evans (rojo) (Aminake *et al.*, 2012).

En el estudio del transcriptoma del ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* se determinó que desde el esquizonte temprano hay una inducción máxima de 29 marcos de lectura abiertos que se predice que codifican varias subunidades del proteasoma. Siete subunidades α y seis β de la partícula 20S y 16 marcos de lectura abiertos de la partícula reguladora 19S. El perfil de expresión común para las subunidades de ambas partículas del complejo 26S sugiere la participación de la degradación de proteínas dependientes de Ub en la progresión del desarrollo del parásito (Bozdech *et al.*, 2003).

El pico de expresión del proteasoma coincide con una transición en el transcriptoma intraeritrocítico, esto es, del desarrollo del trofozoito donde predominan funciones metabólicas “generales” a funciones del parásito relacionadas con la división durante la fase de esquizonte. Esto sugiere que trabajan en concierto por una parte la regulación transcripcional y por otra la degradación de las proteínas que ya cumplieron su labor y esta sincronía debe ocurrir en todas las

transiciones durante la progresión del ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (Bozdech *et al.*, 2003).

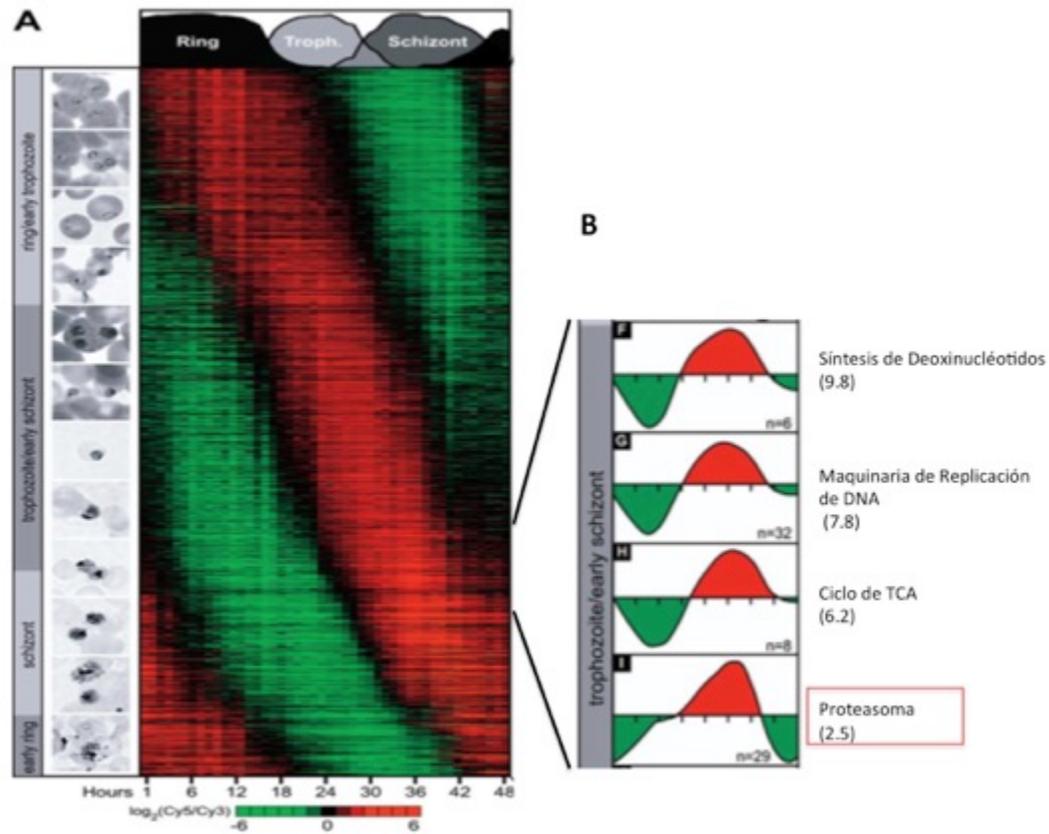


Figura 20. Transcriptoma del ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. A) Faseograma del transcriptoma intraeritrocítico creado al ordenar perfiles transcripcionales de 2,712 genes por fase de expresión en el eje y. A la izquierda se muestran micrografías de las fases representativas por cada estadio, alineado con la fase correspondiente del pico de expresión. B) Orden temporal de procesos bioquímicos y funciones metabólicas durante la fase de trofozoito a esquizonte temprano. Cada gráfico corresponde al perfil de expresión promedio para un grupo de genes y en paréntesis se muestra la media de amplitud máxima-mínima (Bozdech *et al.*, 2003).

6.7.1.2.2.1 Inhibidores de proteasoma en *Plasmodium sp.*

El proteasoma de *Plasmodium sp.* permanece poco estudiado por métodos bioquímicos y es poco claro si el proteasoma del parásito tiene la misma sensibilidad a la inhibición selectiva de subunidades como en células de mamífero. Por esta razón, diferentes grupos han investigado el efecto de diferentes inhibidores sobre diferentes fases de desarrollo en parásitos sincronizados.

Durante el análisis de los fármacos antimaláricos (curcumina/piperina/artemisina además del uso de doxorubicina) y la resistencia del parásito, se observó que éstos indujeron de manera transitoria cambios en la expresión de genes que podrían estar implicados en la síntesis y degradación de proteínas para que el parásito pueda sobrellevar el estrés intracelular. En particular, la regulación hacia arriba del sistema de ubiquina-proteasoma podría ser un mecanismo de defensa o resistencia del parásito, por lo que el proteasoma ha sido un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos anti-maláricos (Neto *et al.*, 2013).

La mayoría de los inhibidores de proteasoma disponibles, incluyendo al MG132, epoxomicina y lactacistina, bloquean la actividad de quimiotripsina del proteasoma. Estos inhibidores han sido utilizados en *P. falciparum* y se ha demostrado que inhiben el crecimiento del parásito *in vitro* a concentraciones nanomolares. Además, se ha observado que los parásitos tratados con estos inhibidores son arrestados antes de la replicación del DNA (Aminake *et al.*, 2012, Aminake *et al.*, 2011, Gantt *et al.*, 1998).

La lactacistina bloquea el desarrollo de fases pre-eritrocíticas y eritrocíticas de *Plasmodium* spp. La lactacistina modifica de manera covalente el N-terminal de las treoninas de los sitios activos del proteasoma. Además, entre los inhibidores de proteasomas, éste es uno de los más específicos ya que tiene poco efecto sobre otras proteasas (Gantt *et al.*, 1998).

Trofozoítos tratados con lactacistina no se transforman en esquizontes. La adición de lactacistina hasta las 30 h después de la infección del eritrocito inhibió de manera importante la incorporación de hipoxantina (^3H) pero el fármaco no tuvo efecto después del inicio de la esquizogonia. Por tanto, sólo el inicio de la síntesis de DNA fue prevenido por la lactacistina y no la síntesis de DNA *per se* (Gantt *et al.*, 1998). Además, se ha reportado que tanto la lactacistina como el inhibidor MLN273 (un compuesto relacionado a bortezomib) tienen un efecto sobre las fases hepáticas *in vitro* cuando se aplican en concentraciones micromolares (Lindenthal *et al.*, 2005). Otro aspecto importante observado es que la lactacistina tuvo un efecto en el crecimiento *in vitro* de cepas de *P. falciparum* sensibles a fármacos (3D7) y resistentes a cloroquina o actinomicina D (Fac8-15 o 3D7^R/actD2). Incluso, la lactacistina tuvo mayor efecto en parásitos resistentes que en los sensibles (Certad *et al.*, 1999).

Uno de los inhibidores de proteasoma más utilizados es el MG132, el cual también se ha observado que inhibe el ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Sin embargo, se ha identificado que es un importante inmhidor de proteasas como la falcipaína y el efecto de la inhibición del crecimiento del parásito dentro del eritrocito se debe al efecto combinado de la inhibición del proteasoma junto con el de inhibición de proteasas (Prasad *et al.*, 2013).

VII. Justificación

En eucariontes, la progresión del ciclo celular depende de modificaciones postraduccionales (PTM). Dos de las más importantes son la ubiquitinación y la fosforilación. *Plasmodium sp.* durante el ciclo intraeritrocítico lleva a cabo procesos de diferenciación y división, lo que requiere cambios en la presencia y actividad de proteínas de manera estadio-específica, las que deben estar reguladas por modificaciones postraduccionales las cuáles están poco estudiadas en el parásito.

El análisis de estas modificaciones durante el ciclo intraeritrocítico podría ayudar a comprender cómo el parásito se divide de manera ordenada y que a largo plazo en caso de ser específico podrían ser empleados para obtener nuevos blancos para tratamiento.

VIII. Hipótesis

La ubiquitinación de proteínas en *P. chabaudi* regula la concentración y por tanto su tiempo de acción durante el ciclo intraeritrocítico del parásito.

IX. Objetivos

9.1 Objetivo General

Identificar las proteínas ubiquitinadas a lo largo del ciclo intraeritrocítico y los componentes del complejo de ubiquitinación en *P. chabaudi*

9.2 Objetivos Particulares

- Comparar los perfiles de proteínas ubiquitinadas totales y en el residuo Lys-48 a lo largo del ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*
- Identificar proteínas que presenten la ubiquitinación en Lys-48
- Analizar la expresión del complejo SCF en el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*
- Identificar la modificación postraducciona Nedd8 en el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*

X. Materiales y Métodos

10.1 Parásitos y animales

Este estudio fue aprobado por el Comité bioético Institucional del Cinvestav para el Cuidado y Manejo de los Animales de Laboratorio (UPEAL- Protocolo 0030) y sigue las normas mexicanas para el alojamiento y mantenimiento humanitario de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron parásitos de *P. chabaudi* cepa AS (proporcionada por el Dr. Robert Sinden del Imperial College de Londres). Las infecciones se iniciaron mediante inoculación intraperitoneal con 10^6 parásitos en ratones BALB/c machos de 6-8 semanas. Los ratones fueron mantenidos en condiciones controladas de luz/oscuridad con iluminación entre las 6:00 y las 18:00 horas y oscuridad de 18:00 a 6:00 horas para maximizar la sincronía de los parásitos (Newbold *et al.*, 1982).

El monitoreo de la parasitemia en los ratones se realizó por métodos estándar de examen microscópico de frotis sanguíneos fijados con metanol y teñidos con Giemsa (Merck, Alemania) al 20%. El porcentaje de células infectadas se estimó contando el número de parásitos en 200 glóbulos rojos. Para determinar las proporciones de las diferentes fases de desarrollo se consideró un ciclo de 24 h que corresponde al ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi* (Newbold *et al.*, 1982). Las muestras se obtuvieron cada 3 h y se realizaron conteos de 20 células parasitadas en 10 campos diferentes sobre laminillas teñidas con Giemsa al 20%. Los experimentos se realizaron por triplicado, con frotis obtenidos de diferentes lotes de ratones infectados y de diferentes individuos. Se obtuvo la desviación estándar por cada tiempo (Newbold *et al.*, 1982).

10.2 Purificación por Gradientes de Percoll-Sacarosa

Para obtener un enriquecimiento de cada fase (anillos, trofozoítos y esquizontes) los parásitos fueron obtenidos por medio de gradientes de percoll-sacarosa a partir de sangre de ratón con 20-50% de parasitemia (Chimanuka *et al.*, 1997).

La sangre fue lavada con PBS (NaCl 137 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 4.5 mM) pH 7.4 y se concentró a 1500 x g durante 7 min. El sobrenadante se desechó y el botón con células fue diluido en PBS para pasarlo por una columna de celulosa (CF-11; Sigma-Aldrich) y retener a los glóbulos blancos y liberar a los glóbulos rojos. Los eritrocitos recuperados se lavaron en dos ocasiones con PBS pH 7.4 y se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min. El botón de eritrocitos se resuspendió en PBS pH 7.4 y se colocó en un gradiente de Percoll (GE Healthcare) iso-osmótico

con solución de sacarosa (Sigma Aldrich) 0.25 M. Para recuperar anillos, el gradiente utilizado fue al 70% y para trofozoitos y esquizontes al 50%. Estos gradientes se centrifugaron a 1500 x g durante 30 min y se recuperaron las fases de interés en cada caso. Estas fases se depositaron en tubos Falcon de 15 ml y se realizaron tres lavados con PBS pH 7.4 a 1500 x g durante 7 min. En todos los casos se realizó la verificación visual de las fases obtenidas realizando frotis y tinción con Giemsa al 20%. Para la lisis, los eritrocitos se trataron con Saponina (Sigma Aldrich) al 0.5% en PBS pH 7.4.

10.3 Análisis *in silico*

Las secuencias anotadas de los genes de *Plasmodium sp.* utilizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de la base de datos PlasmoDB (www.plasmodb.org) Versión 13 (14 de enero de 2015).

Para realizar el análisis de las relaciones filogenéticas entre secuencias de diferentes organismos se utilizó el sitio phylogeny.fr en el formato “One-Click” que utiliza MUSCLE para el alineamiento múltiple, Gblocks para “curar” el alineamiento automático, PhyML para realizar el árbol y TreeDyn para dibujarlo (Dereeper *et al.*, 2008). Para obtener la estructura de las proteínas se utilizó el programa I-Tasser (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), el cual recurre a las estructuras reportadas en el protein data bank (PDB) para hacer la predicción de la estructura tridimensional de la molécula. La predicción más exacta de la molécula se basa en el C-Score, en donde el valor más cercano a 2.0 tiene una mayor precisión (Yang *et al.*, 2015). La superposición de las moléculas se realizó por medio del programa MacPyMOL Versión 1.7.4.4.

Los alineamientos se realizaron con Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para determinar los dominios y sitios funcionales de las proteínas analizadas se utilizaron Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>). Para calcular el punto isoeléctrico (pI) y peso molecular de las proteínas predichas a partir de las secuencias genómicas, se utilizó el programa Compute pI/MW tool accesible en el sitio expasy.org (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Wilkins *et al.*, 1999).

10.4 Interacción molecular del complejo SCF

Los modelos obtenidos con I-Tasser de las proteínas candidatas a formar el complejo SCF en *Plasmodium* fueron utilizados para analizar su posible acoplamiento con el servidor ClusPro 2.0. Las soluciones potenciales generadas por el servidor incluyen todas aquellas cuyas conformaciones estén en un rango de 10Å con respecto al RMSD (*Root-Mean-Square-Deviation*)

de la estructura original (desviaciones entre los residuos del ligando que están dentro de 10Å de cualquier átomo del receptor fijo). El programa genera millones de complejos hipotéticos, reteniendo conjuntos de estructuras con superficies complementarias favorables en las condiciones de energía electrostática y de desolvatación seleccionadas (Comeau *et al.*, 2004a, Comeau *et al.*, 2004b). Los complejos finales fueron visualizados usando MacPyMOL v1.7.4.4.

10.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA de los parásitos se realizó utilizando TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron tratadas con DNasa I libre de RNasa (Invitrogen). La ausencia de DNA en las muestras de RNA se verificó con una PCR, usando el RNA como molde y el gen constitutivo como referencia. La transcripción reversa se realizó como sigue: se preparó una mezcla de Oligo dT 500 µg/ml (Invitrogen), RNA 10 ng/µl, Mezcla de dNTP (10 µM cada uno) y agua tratada con dietilpirocarbonato. La mezcla se incubó durante 5 min a 65°C. Posteriormente, se agregaron el amortiguador de primera hebra 5X y DTT 0.1 M. La mezcla se incubó a 42 °C durante 2 min y se agregaron 200 unidades de SuperScript II RT (Invitrogen), esta nueva mezcla se incubó durante 50 min a 42 °C. La reacción se inactivó por calor a 70 °C durante 15 min.

10.6 Obtención de extractos proteicos de *P. chabaudi*

Para la obtención de extractos proteicos totales, los parásitos separados por fase (anillos, trofozoítos y esquizontes) por medio de gradiente de percoll-sacarosa (como se describe en la sección 6.2) fueron liberados del eritrocito por medio de saponina al 0.75% y se realizaron tres lavados con PBS pH 7.4.

Los parásitos liberados se resuspendieron en amortiguador de muestra (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 40 mM) en presencia de Inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Sigma Aldrich y Complete EDTA-Free, ROCHE), inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Roche) y 10 µM del Inhibidor de proteasoma Lactacistina (Sigma Aldrich). A continuación, los parásitos se sometieron a ocho ciclos de congelación/descongelación con pasos intermedios de maceración.

Una vez obtenidas las muestras, éstas se centrifugaron a 14 000 x g durante cinco minutos y el sobrenadante se precipitó con acetona fría toda la noche. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 13 000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró todo el sobrenadante y las muestras se disolvieron en amortiguador de muestra con amortiguador IPG (3-10; GE HealthCare) al 2% en presencia de inhibidores de proteasas, fosfatasa y lactacistina. La cuantificación de proteínas

tanto para electroforesis de una y dos dimensiones se realizaron por medio del kit 2-D Quant kit (GE Healthcare).

10.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por peso molecular se realizó por electroforesis en una dimensión en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil-sulfato de sodio (SDS) (Laemmli *et al.*, 1970). Para realizar la electroforesis en un gel de 8 x 10 x 1.5 mm, se prepararon los geles separadores al 10% en un volumen de 7.45 ml, mezclando acrilamida/ bis-acrilamida (30%/0.8%) (Bio-Rad), Tris-HCl 1.5 M (Bio-Rad) pH 8.8, SDS al 10% (Bio-Rad) y los catalizadores, persulfato de amonio al 10% y TEMED (Bio-Rad). Los geles se dejaron “madurando” durante 1 h a temperatura ambiente. La corrida electroforética se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 2 h en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad). Para la preparación de la muestra se utilizó amortiguador de muestra de Laemmli 2x pH 6.8, sometándose a ebullición en baño maría durante 5 min. Como referencia para el cálculo del peso molecular, se utilizó una mezcla comercial con los siguientes marcadores: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa (Precision Plus Protein, Bio-Rad). El amortiguador de corrimiento se preparó con Trizma base 0.025 M (Bio-Rad), Glicina 0.192 M (Bio-Rad) y SDS al 0.1%, pH 8.3. Los geles se fijaron en una solución de metanol, H₂O, ácido acético, en proporción 5:4:1. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G250 (Bio-Rad) y se destiñeron con H₂O MiliQ (MQ).

10.8 Electroforesis Bidimensional

a) Primera Dimensión

Para el isoelectroenfoque (IEF) se utilizaron tiras de poliacrilamida IPG (GE, Healthcare) de 7 cm con un rango de punto isoeléctrico de 3 a 10 no lineal (NL). Las tiras se pusieron a rehidratar toda la noche (12 h) con las muestras resuspendidas en amortiguador de hidratación (Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, IPG Buffer 0.5%, DTT 20mM, azul de bromofenol 0.002%). El IEF se corrió utilizando una unidad IPGPhor III (GE, Healthcare) bajo las siguientes condiciones: 500 V durante 1 h, 1000 V durante 1 h y 8 000 V durante 4 h. Posteriormente las tiras fueron incubadas durante 15 min con una solución de Urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%, DTT 125 mM. Después, las tiras se transfirieron a un tubo nuevo para ser incubadas durante 15 min con una solución de Urea 6M, glicerol 30%, SDS al 2% y Iodoacetamida 125 mM.

b) Segunda Dimensión en SDS-PAGE

El gel separador para la segunda dimensión, se preparó al 10% y el gel concentrador al 4%, sobre el que se puso horizontalmente la tira comercial donde se corrió el IEF previamente. El lado ácido (+) se colocó del lado izquierdo del gel y el lado básico del lado derecho (-). Las tiras se inmovilizaron con agarosa de bajo punto de fusión (Gibco, BRL) al 1%. Del lado izquierdo del gel, se colocaron marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad) con proteínas preteñidas con un rango de 10 a 250 kDa. Los geles se corrieron a 80 V durante 2 h (Alonso-Morales *et al.*, 2015b). Los geles se fijaron en una solución de metanol, H₂O, ácido acético, en proporción 5:4:1. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G250 (Bio-Rad) y desteñidos con H₂O MQ.

10.9 Western Blot

Para la detección de proteínas, se realizó la transferencia de proteínas separadas por electroforesis en una o dos dimensiones a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Biosciences) de 0.45 mm (Towbin *et al.*, 1979). Se aplicó el siguiente protocolo: Después de la corrida electroforética, los geles se transfirieron en cámara húmeda en amortiguador de transferencia (BT) (Tris-Base 48mM, Glicina 39mM, Metanol 20%, SDS 0.0375%) a 125mA durante 2 h.

Después de la electrotransferencia, las membranas utilizadas para la detección de ubiquitina se incubaron en una solución desnaturalizante (cloruro de guanidina 6 M, Tris 20 mM pH 7.5, PMSF 1 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM) durante 30 min a 4°C, seguido por lavados exhaustivos con amortiguador de Tris 25 mM, NaCl 0.05%, pH 7.5 con Tween al 0.1% (TBST) (Nino *et al.*, 2013). Todas las membranas fueron bloqueadas posteriormente con albúmina sérica de bovino (BSA) al 5% en TBST.

Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: anti-ubiquitina (ab7780, Abcam) dilución 1:500, Anti-poliubiquitina Lys-48 específica (No. de catálogo 8081, Cell signalling) dilución 1:500, anti-fosfotirosina conjugada a HRP (-pY; 13-6620, Invitrogen) dilución 1:5000, anti-fosfoserina (-pSer; 61-8100, Invitrogen) dilución 1:1500, anti-fosfotreonina (p-Thr; 13-9200, Invitrogen) dilución 1:1500. El anticuerpo de conejo anti-Hsp70 de *Trichomonas vaginalis* (donado por la Dra. Rosana Arroyo depto de IPM-CINVESTAV-IPN) a una dilución 1:1000.

Cada anticuerpo se disolvió en BSA al 5% preparada en TBST. Cada anticuerpo fue colocado con la membrana correspondiente e incubado con agitación constante durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron cinco veces con TBST durante 10 min cada uno a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se incubó el anticuerpo secundario correspondiente: anti-IgG de conejo (No. de Catálogo 65-6120, Invitrogen Life Technologies)

dilución 1:50 000; anti-IgG Ratón (No. de Catálogo AP308P, Millipore) dilución 1:100000 durante 2 h a TA. Al término de estos lavados se realizaron otros 10 lavados con TBST en agitación ligera, durante 10 min cada uno a TA. Para el revelado, las membranas se incubaron en solución de detección (Supersignal West Pico Chemiluminescent Kit; Thermo Scientific, Rockford, USA) durante 1 min. La detección y registro de los resultados se realizó por medio del fotodocumentador ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

10.10 Microscopía Confocal

Para determinar la localización de la ubiquitina en parásitos enriquecidos por gradiente de centrifugación con Percoll-Sacarosa (anillos, trofozoítos y esquizontes; apartado 6.2) cada fase se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 min. Posteriormente, las células fueron lavadas por centrifugación a 1500 g durante 5 min y se mantuvieron a 4 °C; las muestras fueron permeabilizadas con Solución permeabilizadora BD FACS (Becton Dickinson) durante 30 min; posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X por centrifugación a 1500 g durante 5 min. Las muestras se bloquearon con suero fetal de bovino (SFB) 50% 1h a TA. Las muestras fueron lavadas dos veces y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 min. Las muestras fueron incubadas con una dilución 1:50 de anti-poliubiquitina Lys-48 (No. de catálogo 8081, Cell Signaling Technology) o anti-ubiquitina (No. de catálogo ab7780, Abcam) durante 3 h a TA. Las muestras se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 min. Las muestras fueron incubadas con una dilución 1:100 de anti-IgG de Conejo Alexa Fluor 488 (No. de catálogo ab150077, Abcam) durante 2 h a TA y lavadas tres veces con PBS pH 7.2. Las muestras se colocaron (por extensión) en un portaobjetos y se montaron con VECTASHIELD con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). La microscopía confocal se realizó usando un microscopio Zeiss LSM 700 con un objetivo 63X/1.4 DIC. Las imágenes se analizaron usando el software Zen-Lite.

10.11 Citometría de Flujo

Parásitos enriquecidos de cada fase (anillos, trofozoítos y esquizontes, apartado 6.2) se fijaron con PFA al 4% durante 30 min, se lavaron por centrifugación a 1500 g durante 5 min y se mantuvieron a 4 °C; las muestras se permeabilizaron con solución permeabilizadora BD FACS (Becton Dickson) durante 30 min; posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X por centrifugación a 1500 g durante 5 min. Las muestras se bloquearon con SFB 50% 1h a TA y se realizaron dos lavados con PBS pH 7.4. Los parásitos fueron incubados con una dilución 1:50 de anti-poliubiquitina Lys-48

específica de conejo o anti-ubiquitina clona FK2 diluida 1:50. El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución de 1:150 en el caso de la anti-IgG de Conejo acoplado a FITC (No. de Catálogo F2765, Thermo Fisher Scientific) ó anti- IgG de ratón acoplado a TRITC (No. de Catálogo 62-6514, Invitrogen) durante 40 min a TA en agitación constante. Finalmente, se agregó una solución de DAPI-PBS durante 8 min. Se realizaron tres lavados por centrifugación a 1500 x g durante 5 min en 1 ml de PBS pH 7.4. Los eritrocitos infectados se definieron por una región positiva para DAPI. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa y se analizaron por medio del programa Summit, versión 4.3

10.12 Espectrometría de Masas

a) Preparación de la muestra

Para la identificación de las proteínas, éstas se analizaron en los Servicios Centrales para Apoyo de Investigación Experimental en la Universidad de Valencia, España. Las muestras fueron digeridas con tripsina grado secuenciación (Promega) según protocolos establecidos (Shevchenko *et al.*, 1996). La digestión se detuvo con ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final del 1% y la mezcla de la digestión se analizó por ESI-LC-MS/MS. Como control se analizó una muestra de BSA para verificar el proceso de digestión.

b) Espectrometría de masas

Para la identificación general, se realizó cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS): 5 µl de cada muestra se cargó en la columna (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 350 µm x 0.5mm ; Eksigen) y se desaló con TFA al 0.1% a 3 µl/min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en una columna analítica (Columna LC, 3 µ C18-CL, 75 µmx12cm, Nikkyo) equilibrada en acetonitrilo (ACN) al 5% -ácido fórmico (FA) al 0.1%. La elución se realizó con un gradiente lineal de 5-35% B en A durante 15 min (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) a una velocidad de flujo de 300nl/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). El tripleTOF se manejó en modo de adquisición dependiente de información, en el que se realizó el rastreo a 0.25-s TOF MS de 350-1250 m/z, seguido por escaneos de iones de producto de 0.05-s de 100- 1500 m/z en los 50 iones cargados 2-5 más intensos.

c) Espectrometría de masas para identificación de la modificación postraduccional

Tres muestras se enviaron a las instalaciones de la Universidad de California, Davis; dos para identificar el residuo de ubiquitinación y una para identificar el sitio de neddylación. Las muestras se analizaron por LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Thermo Scientific Q Exactive Orbitrap en conjunto con un HPLC Proxeon Easy-nLC (Thermo Scientific) y una fuente de nanospray Proxeo. Los péptidos digeridos se cargaron en una trampa de fase reversa de 100 micras x 25 mm Magic C18 100Å 5U donde se desalaron antes de separarse usando una columna de fase reversa de 75 micras x 150 mm Magic C18 200Å 3U. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente de 180 min con una velocidad de flujo de 300 nl/min. Se obtuvo un muestreo de MS para el rango de m/z de 300-1600, los espectros MS/MS se adquirieron usando un método 15 top, donde los iones 15 top en los espectros MS fueron sujetos a Disociación Colisional de Alta Energía (HCD). Una ventana de masa aislada de 2.0 m/z se utilizó para la selección del ion precursor y se utilizó una energía de colisión normalizada del 27% para fragmentación. Para la exclusión dinámica se utilizó una duración de cinco segundos.

Las muestras de MS/MS se analizaron utilizando el software X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version TORNADO (2013.02.01.1)). El software X! Tandem se configuró para hacer búsqueda en la base de datos de Uniprot *P. chabaudi* (Agosto 2014, 15124 entradas), la base de datos cRAP de contaminantes de laboratorios comunes (www.thegpm.org/crap; 114 entradas) más un número igual de secuencias de proteínas reversa asumiendo digestión de tripsina. La búsqueda en X! Tandem se realizó con una tolerancia de masa de iones de 20 PPM y una tolerancia de ion parental de 20 PPM y la derivatización con iodoacetamida como modificación fija. Además, se especificó deamidación de asparagina y glutamina, oxidación de metionina y triptófano, sulfona de metionina, oxidación de triptófano a formilquinurenina de triptófano, acetilación del N-terminal y diglicina en residuos de lisina en el X! Tandem como modificaciones variables.

Criterios para Identificación de Proteínas

Para validar el péptido obtenido por MS/MS y las identificaciones de proteínas, se utilizó el programa Scaffold (versión Scaffold_4.4.1, Proteome Software Inc., Portland, OR). Las identificaciones de los péptidos se aceptaron si podían establecerse con una probabilidad superior al 91.0% para lograr una tasa de falsos descubrimientos (FDR) menor a 1.0% por el algoritmo FDR Local de Scaffold. Las identificaciones de proteínas se aceptaron si podían establecerse con una

probabilidad mayor al 52% para lograr una FDR menor al 5% y contenían al menos 2 péptidos identificados. Las probabilidades de las proteínas fueron asignadas por el algoritmo Prophet Protein (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Las proteínas que contenían péptidos similares y que no se podían diferenciar con base en el análisis de MS/MS únicamente, se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia. Las proteínas que compartieron evidencia significativa de péptidos similares se colocaron por grupos.

10.13 Análisis de RT-PCR Cuantitativa por Tiempo Real

Para la PCR en tiempo real (qPCR), los iniciadores se diseñaron utilizando el software Primer3 accesible en el sitio <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>. Para el gen de *cullina-1* (PCHAS_112810) los iniciadores fueron 5'-TTGCTCTATTTGGGTTATGC-3' y R 5'-TGCCATCGTGCATATTCTTT-3' para amplificar un producto de 77 bp. Para el gen de *cullina-2* (PCHAS_142830) las secuencias de los iniciadores fueron F 5'-CGAGGCAGCTATTGTTCG-3'; R 5'-GGATGGGGAAAAAGTGGA-3' para amplificar un producto de 100 bp. Para el gen de *skp1* (PCHAS_114240) los iniciadores fueron F 5'-TGGACATAAAGCCACTCTTGG-3' y R 5'-GCTCGAATTTCTTCCGTTGT-3' para amplificar un producto de 82 bp. Finalmente, para el gen *rbx1* (PCHAS_080650) la secuencia de iniciadores fue F 5'-TGGGGTGTGTGTAATCATGC-3' y R 5'-AGGGCAAACCTGTCTTGCTT-3'. Los valores de expresión de las *cullinas*, *rbx* y *skp* se normalizaron con los niveles de abundancia del mRNA del gen ribosomal 18S. Los iniciadores para 18S fueron F 5'-ACATGGCTTTGACGGGTAAC-3' y R 5'-GCTGCCTTCCTTAGATGTGG-3' que amplificaron un producto de 86 bp. La expresión de la cullina fue cuantificada con SsoFast™ EvaGreen SuperMix (Bio-Rad) usando los iniciadores específicos del gen en un volumen de reacción final de 20 µl que contenía 10 µl de SsoFast™ EvaGreen SuperMix (Bio-Rad), iniciadores sentido y antisentido a una concentración de 250 nM y 5.0 µl de la muestra de cDNA. El protocolo de amplificación para la expresión de la cullina consistió de un paso de 30 s a 95 °C, seguido por 40 ciclos de amplificación (95°C durante 5 s, 61°C durante 5 s, lectura de placa en fluorescencia para SYBR Green I), después del cual se realizó la reacción de la "melting-curve" de 65 °C a 95 °C con lecturas de placa cada 0.5°C. Las mediciones de la abundancia de mRNA se tomaron por triplicado de tres experimentos independientes y la media se utilizó para análisis posteriores.

XI. Resultados

11.1 Abundancia de fases en el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*

Para determinar los tiempos de mayor abundancia de cada una de las fases que constituyen al ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi* se realizó una infección en tres lotes diferentes de ratones BALB/c machos a las 6:00 A.M. y se tomaron muestras de sangre cada tres horas para analizar la proporción de las diferentes fases intraeritrocíticas del parásito. Se obtuvo la desviación estándar de los conteos por fase de los parásitos por cada tiempo y los datos fueron tabulados y graficados. La mayor proporción de anillos se encontró a entre las 12:00 A.M. y 3:00 A.M., la de trofozoitos a las 6:00 A.M. y la de esquizontes a las 6:00 P.M. (Tabla 1 y Figura 21).

Estos resultados se aplicaron para obtener parásitos enriquecidos en cada fase y obtener un mayor grado de purificación de las muestras. En los tiempos en donde se determinó previamente que existían una mayor proporción de anillos, trofozoitos y esquizontes se obtuvo la sangre por punción cardíaca y se sometió a gradientes de Percoll-sacarosa. Después, se verificó cada una de las fases purificadas por medio de revisión microscópica, donde se observó una gran proporción de las fases esperadas (Figura 22).

Tabla 1. Porcentaje de fase parasitaria durante el ciclo intraeritrocítico de 24 h de *P. chabaudi*

	6:00 h	9:00 h	12:00 h	15:00 h	18:00 h	21:00 h	24:00 h	3:00 h	6:00 h
Anillos	3	0	0	0	8.3	25.2	97.8	90.8	7.3
Trofozoitos	91.7	93.8	81.5	60.0	20.8	9.8	0.0	4.8	92.7
Esquizontes	5.3	4.2	18.5	40.0	70.8	66.5	2.2	4.3	0.0

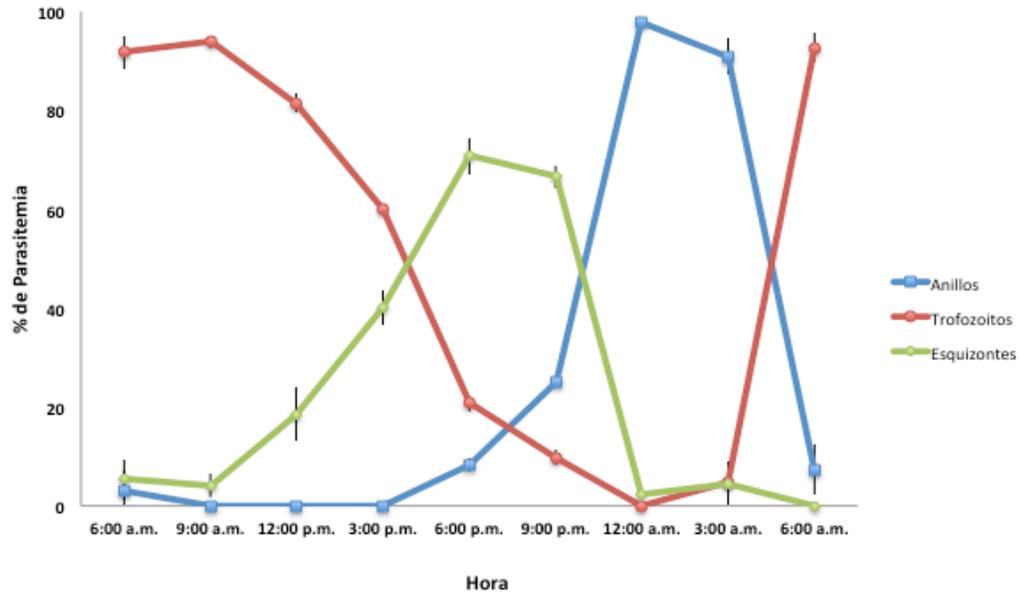


Figura 21. Parasitemia de *P. chabaudi* en Ratones BALB/c Machos. Ratones BALB/c machos de 6-8 semanas se infectaron con 1×10^6 parásitos. Cada 3 horas se contaron las formas del parásito presentes. Los conteos se realizaron por triplicado, se expresaron como porcentaje de eritrocitos infectados y se obtuvo la desviación estándar (SD).

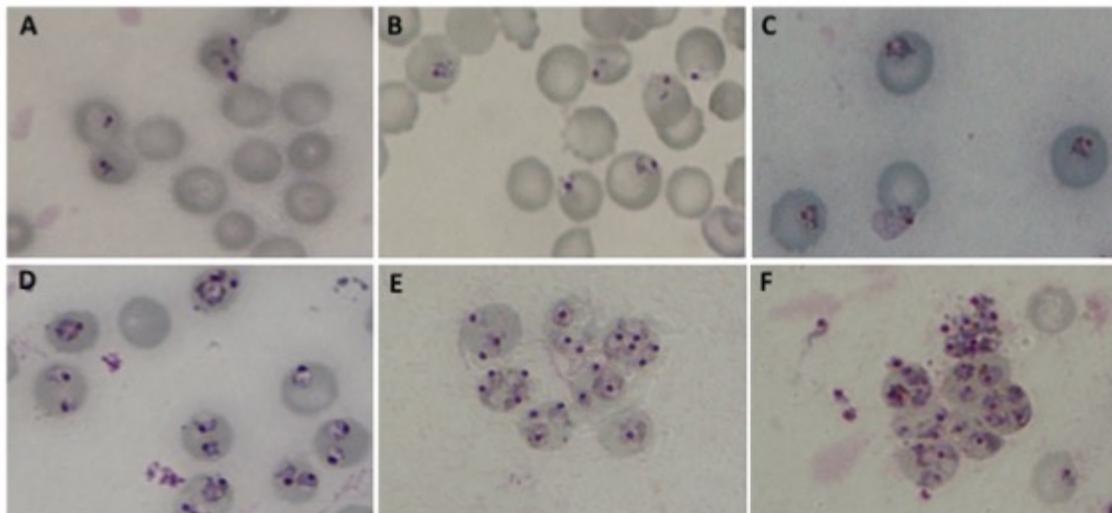


Figura 22. Formas del ciclo Intraeritrocítico de *P. chabaudi* purificadas. Preparaciones de los parásitos purificados con Percoll-Sacarosa y teñidos con Giemsa al 20% de las fases obtenidas. **A-** Fase de Anillo; **B-D** Fase de Trofozoíto; **E-F.** Fase de Esquizonte.

11.2 Ubiquitina en *P. chabaudi*

El gen de la ubiquitina se buscó *in silico* en el genoma de *P. chabaudi* y se encontraron 3 secuencias relacionadas. Dos correspondieron a una secuencia de ubiquitina fusionada a la proteína ribosomal S27 (UB_{S27a}) (PCHAS_104020) o L40 (UB_{L40}) (PCHAS_114120); y el gen de poliubiquitina (PCHAS_061200). Estos tres genes se encuentran en cromosomas diferentes (10, 11 y 6, respectivamente). *In silico*, el gen de poliubiquitina en *P. chabaudi* codifica para una proteína de 305 aminoácidos. El gen tiene una longitud de 1306 bp; posee un exón en el extremo 5' (28 bp), un intrón (388 bp) y otro exón con 4 repetidos en tándem de 228 bp cada uno sin secuencias espaciadoras entre cada uno de estos (Figura 23).

Al analizar el gen de poliubiquitina en diferentes especies de *Plasmodium* se encontró que la estructura se conserva, es decir, presentan un exón de 28 pb en el extremo 5' y un segundo exón con repetidos en tándem; sin embargo, varía tanto la longitud del intrón como el número de repetidos en tandem que van de 5 para *P. falciparum* y *P. vivax* y 4 y 3 para *P. chabaudi* y *P. berghei*, respectivamente (Figura 24A y 24B).

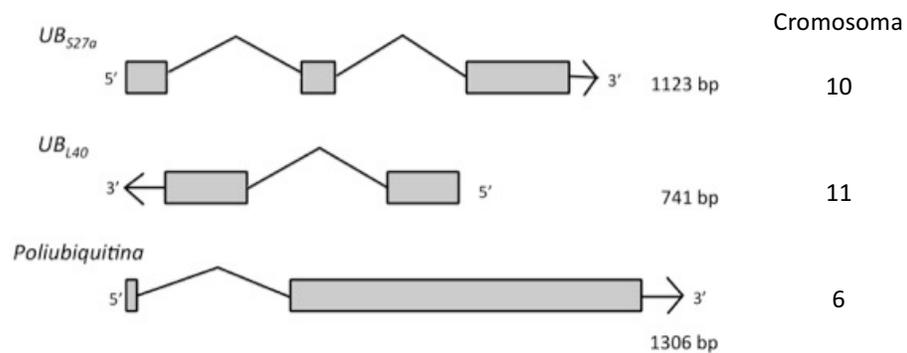


Figura 23. Representación de los tres genes de ubiquitina en *P. chabaudi*. Los genes UB_{S27a} (PCHAS_104020) y UB_{L40} (PCHAS_114120) codifican para una sola copia de ubiquitina que se fusiona con las proteínas ribosomales S27a y L40, respectivamente. El gen de la poliubiquitina (PCHAS_061200) codifica para cuatro repetidos en tándem “cabeza a cola” de ubiquitina.

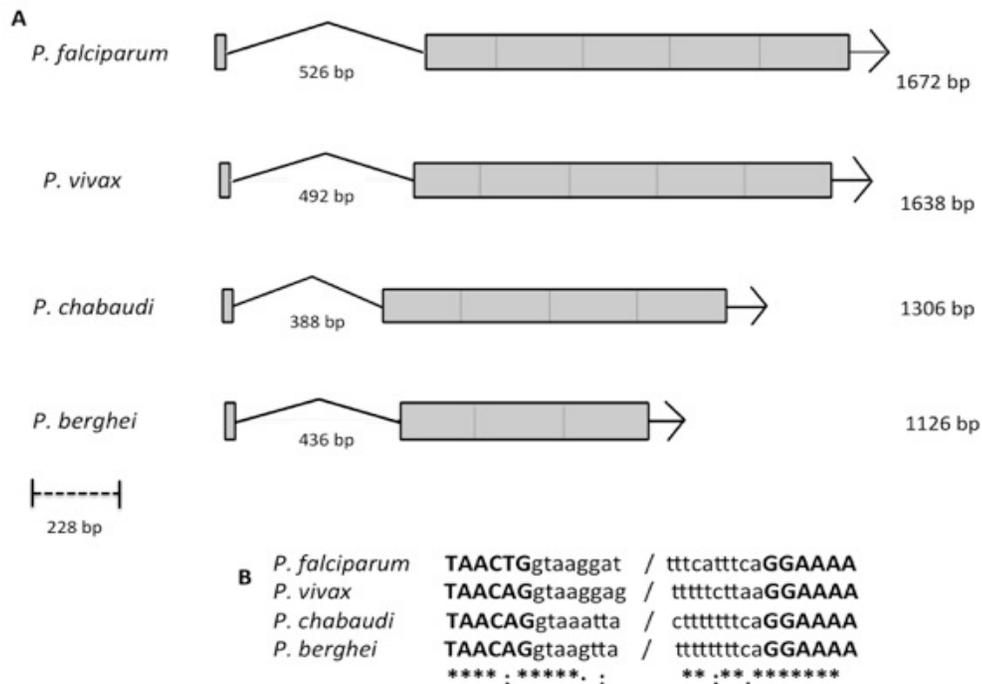


Figura 24. Estructura y organización del gen de poliubiquitina en diferentes especies de *Plasmodium*. A) Representación del gen de la ubiquitina en diferentes especies de *Plasmodium*. El inicio del primer repetido en el extremo 5' está interrumpido por un intrón de tamaño variable, dependiente de la especie después de 28 bp del exón. B) Comparación de porción donadora y aceptora del intrón del gen de la poliubiquitina en diferentes especies con base en lo reportado para *Plasmodium* sp. En minúsculas se muestra la región del intrón y en mayúsculas la secuencia del exón.

En *P. chabaudi*, la pro-proteína que se codifica a partir del gen de poliubiquitina es de 305 aminoácidos y posee cuatro repetidos en tándem del monómero de 76 aminoácidos cada uno. En otros organismos se ha reportado que esta proteína se procesa por hidrolasas de tipo desubiquitininas para generar las unidades de ubiquitina (Kerscher *et al.*, 2006), por lo que este procesamiento debe también ocurrir en *Plasmodium* sp. La secuencia proteica del monómero de Ub presenta una gran conservación entre las diferentes especies del género *Plasmodium* y a lo largo de la evolución, presentando una homología del 100% con *P. falciparum*, del 97% con *P. vivax* y del 98% con la secuencia del humano (Figura 25A). En su estructura terciaria, la proteína presenta un motivo de cinco láminas beta y una alfa hélice, denominada pliegue de ubiquitina, además de un C-terminal de seis residuos flexible disponible para la activación y conjugación. Además, posee los siete residuos de lisina en la posición conservada en otros organismos

11.3 Abundancia y localización de Ubiquitina total y poliubiquitinación en Lys48 durante el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*

Para determinar la abundancia de la ubiquitina total conjugada (mono- o poli-ubiquitinación) y formando cadenas en la lisina 48 durante el ciclo intraeritrocítico, se realizó citometría de flujo con anillos, trofozoítos y esquizontes. Ya que la secuencia peptídica de la ubiquitina del parásito posee una homología del 98% con un amplio rango de organismos, se predijo que los anticuerpos comerciales podían reconocer la ubiquitina del parásito. En todas las muestras analizadas encontramos la presencia de ubiquitina y de cadenas de ubiquitina en Lys-48 (Figura 26). Se encontró que la ubiquitina (mono- y poli-ubiquitina conjugada) aumenta conforme avanza el ciclo de vida, teniendo que la fase con menor abundancia fue la de anillo mientras que el esquizonte presentó la mayor ubiquitinación (Figura 26A). La poliubiquitina en Lys48 presentó menor abundancia en comparación con la ubiquitina total y presentó la misma tendencia de aumento conforme el ciclo progresa, con la menor abundancia en anillos y la mayor en esquizontes (Figura 26B).

La localización de la ubiquitina (mono- y poli-ubiquitina) y la poliubiquitina en Lys-48 en el parásito se realizó por inmunolocalización en microscopía confocal. Al igual que en la citometría de flujo, ambos anticuerpos fueron usados por separado. Todas las fases del parásito presentaron ubiquitina y en acuerdo a lo observado por citometría la ubiquitina aumenta conforme progresa el ciclo intraeritrocítico con la mayor señal en la fase de esquizonte (Figura 27A). Los mismos resultados se obtuvieron con poliubiquitina en Lys-48. En todos los casos, lo que se observa, sugiere que la localización fue principalmente citoplasmática (Figura 27B).

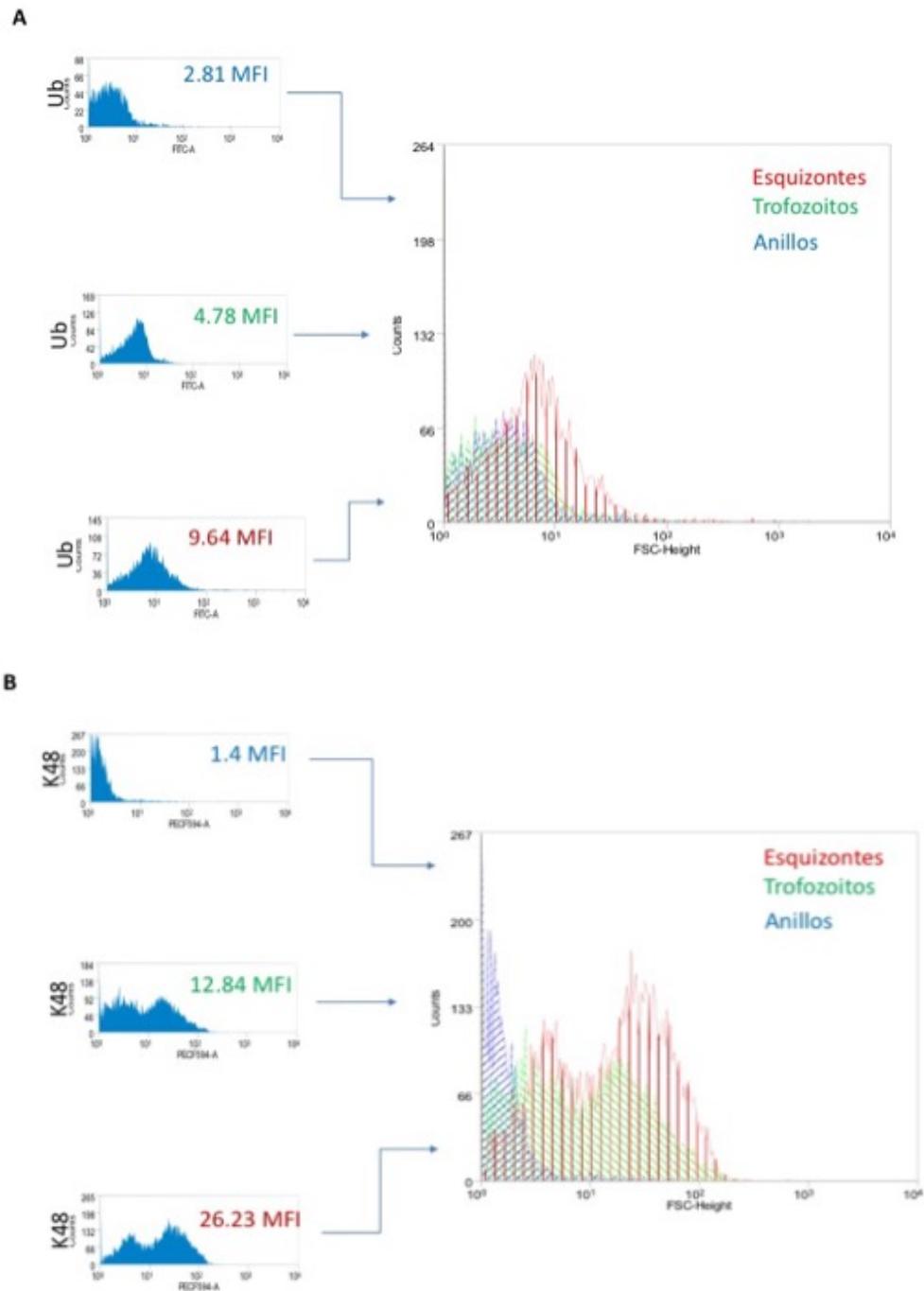


Figura 26. Abundancia de ubiquitina a lo largo del ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*. A) Presencia de Ub (mono- y poli-Ub) en anillos, trofozoítos y esquizontes medida como intensidad media de fluorescencia (MFI). **B)** Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de poliubiquitina Lys-48 en anillos (azul), trofozoítos (verde) y esquizontes (rojo).

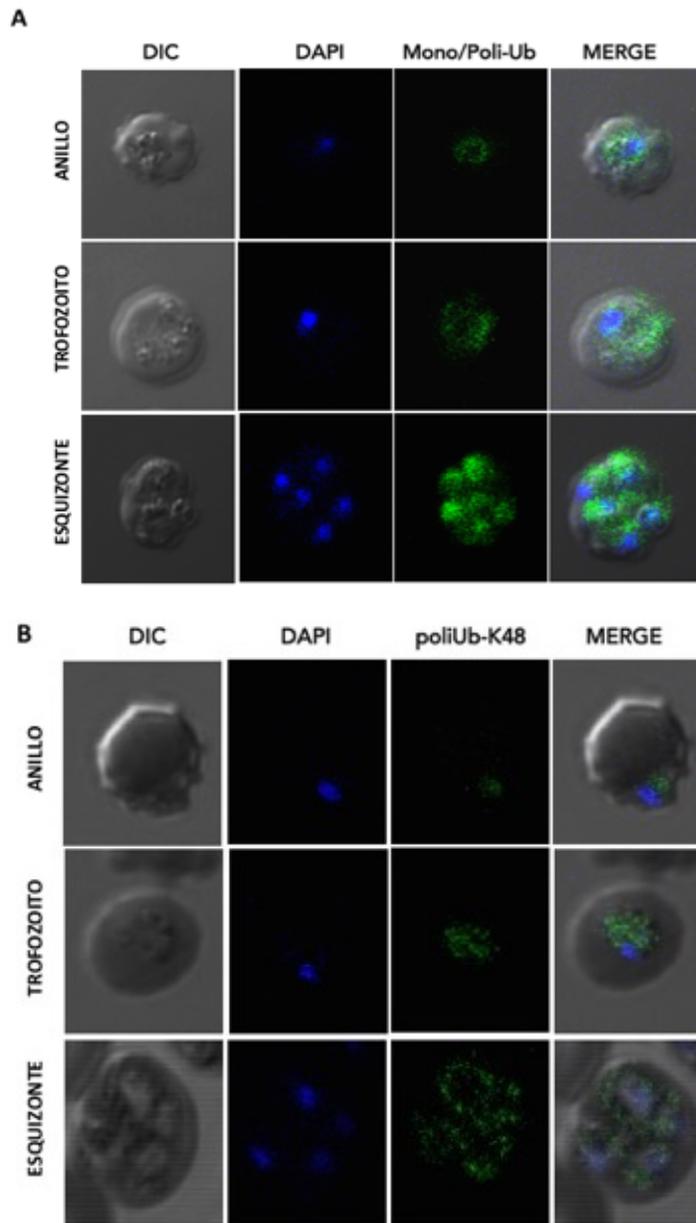


Figura 27. Localización de Ub en el ciclo Intraeritrocítico de *P. chabaudi*. **A)** Inmunolocalización de mono- y poliubiquitina en las fases de anillo, trofozoito y esquizonte. **B)** Inmunolocalización de poliubiquitina en Lys-48 en anillos, trofozoítos y esquizontes. La ubiquitina aumenta conforme el ciclo progresa y se localiza principalmente en el citoplasma. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y el anticuerpo secundario estuvo marcado con Alexa-488.

11.4 Identificación de proteínas ubiquitinadas

11.4.1 Inmunodetección de proteínas ubiquitinadas en el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*

Las proteínas totales de las diferentes fases del ciclo de vida de *P. chabaudi* analizadas por PAGE-SDS, abarcaron moléculas de 250 a 15 kDa y no se observaron diferencias significativas.

Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa para realizar la inmunodetección de aquéllas que presentaran ubiquitina (mono- y poliubiquitina). Se identificaron alrededor de 7 bandas (con pesos moleculares aproximados de 30, 40, 50, 60, 65, 120 y 170 kDa) en todas las fases del ciclo intraeritrocítico. Aunque el patrón fue relativamente constante a lo largo del ciclo (Figura 28A) se observaron diferencias en intensidad en las bandas de 120, 50 y 30 kDa (Figura 28B).

Para comparar las proteínas de las fases de anillo (Figura 29A), trofozoíto (Figura 29B) y Esquizonte (Figura 29C), se hizo E2D en un rango de punto isoeléctrico de 3-10. Se observaron perfiles electroforéticos muy similares con proteínas de alto peso molecular (250kDa) y con la mayor población de proteínas en un rango entre 100 y 25 kDa, sin embargo se apreciaron algunas diferencias entre fase (indicadas con flechas y recuadro negro en la Figura 29). Ejemplo de ello son una proteína de 30 kDa con un pI de 4.0 y una proteína de 75 kDa con un pI de 5.0, las cuales se observan más representadas en la fase de esquizonte. Además se observa un grupo de 4 proteínas en las fases de anillo y trofozoíto de un peso molecular de 30 kDa (recuadro) que en la fase de esquizonte no se encuentran presentes.

Para la identificación de las proteínas ubiquitinadas, réplicas técnicas de los geles E2D se transfirieron a nitrocelulosa para la inmunodetección usando anticuerpos dirigidos contra proteínas mono o poliubiquitinadas (Lys²⁹-, Lys⁴⁸- y Lys⁶³) o cadenas de poliubiquitina unidas en Lys-48 (K⁴⁸). Se observó que durante el ciclo la mayor parte de proteínas ubiquitinadas está entre los 100 kDa y 25 kDa y el patrón y número de proteínas detectadas aumenta conforme progresa el ciclo (Figuras 30, 31 y 32). En el caso de anillos, se observaron 19 proteínas con mono- y poliubiquitinación (Figura 30A) y de éstas, siete fueron reconocidas con el anticuerpo anti- Lys48 (flechas rojas, Figura 30B). Los siete puntos fueron analizados por MS con resultados para tres, enumeradas con las letras A1-A3 (Figura 30C). En el caso de trofozoítos, se observaron 22 proteínas mono- o poliubiquitinadas (Figura 31A) y de éstas nueve fueron reconocidas con el anticuerpo anti- poliubiquitina en Lys48 (Figura 31B). Estas nueve proteínas se analizaron con

resultados para cinco, enumeradas con las letras T1-T5 (Figura 31C). Finalmente, para los esquizontes se observaron 35 proteínas mono- o poliubiquitinadas (Figura 32A) y 30 con poliubiquitinación en Lys48 (Figura 32B). En este caso se identificaron 20 proteínas por MS, enumeradas con las letras E1-E20. Al igual que en los experimentos anteriores, la fase que presentó la mayor cantidad de proteínas ubiquitinadas fue la de esquizonte y en cuanto a las proteínas poliubiquitinadas en Lys-48, también fue el esquizonte la fase que presentó la mayor cantidad con respecto a las otras fases.

De manera interesante, la fase de trofozoíto es la que presenta un mayor reconocimiento por el anticuerpo anti mono- y poliubiquitina en contraste a las unidas a Lys-48, esto es, el trofozoíto presenta una mayor diversidad de ubiquitinación (cadenas de poliubiquitina o monoubiquitinación) en relación a las otras dos fases.

Las proteínas identificadas por MS correspondieron principalmente a moléculas relacionadas al metabolismo de ácidos nucleicos (uridina fosforilasa, hipoxantina-guanina-xantina fosforibosil transferasa, inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa), seguido por proteínas relacionadas a la glucólisis (piruvato cinasa, fosfoglicerato cinasa, hexocinasa), plegamiento de proteínas (Hsp70, complejo T) y biosíntesis de proteínas (factor de alargamiento 1A y el factor de iniciación eucariote 4^a) (Tabla 2 y Figura 33). De éstas proteínas, la E1 y E9 se seleccionaron para identificar el sitio de ubiquitinación. Para el punto E1 se identificaron dos proteínas de choque térmico de la familia de las Hsp70 (con pesos moleculares teóricos de 72 y 73 kDa) con un residuo ubiquitinado en la posición 437 (HSP70 de 74 kDa) y en la posición 222 (HSP70 de 73 kDa). Para el punto E9 se identificó a la proteína uridina fosforilasa que presentaba ubiquitina en las posiciones 101 y 211 (Tabla 3).

Dado que la poliubiquitinación en Lys-48 marca a las proteínas para su degradación por medio del complejo del proteasoma, se comprobó si alguna de las proteínas identificadas disminuía en concentración debido a la ubiquitinación y posterior degradación. Se tomó como modelo a la proteína Hsp70. Para ello se realizó un gel al 8% que se tomó como base para determinar que las proteínas en cada carril tenían la misma concentración proteica (Figura 37A) y se realizó la inmunodetección con un anticuerpo anti-Hsp70 de *T. vaginalis*. Se observó que durante el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*, la Hsp70 es más abundante durante la fase de trofozoito y ésta

disminuye en la fase de esquizonte (Figura 37B) lo que sugiere que la proteína durante la fase de esquizonte podría disminuir debido a su ubiquitinación y posterior degradación por medio del complejo del proteasoma.

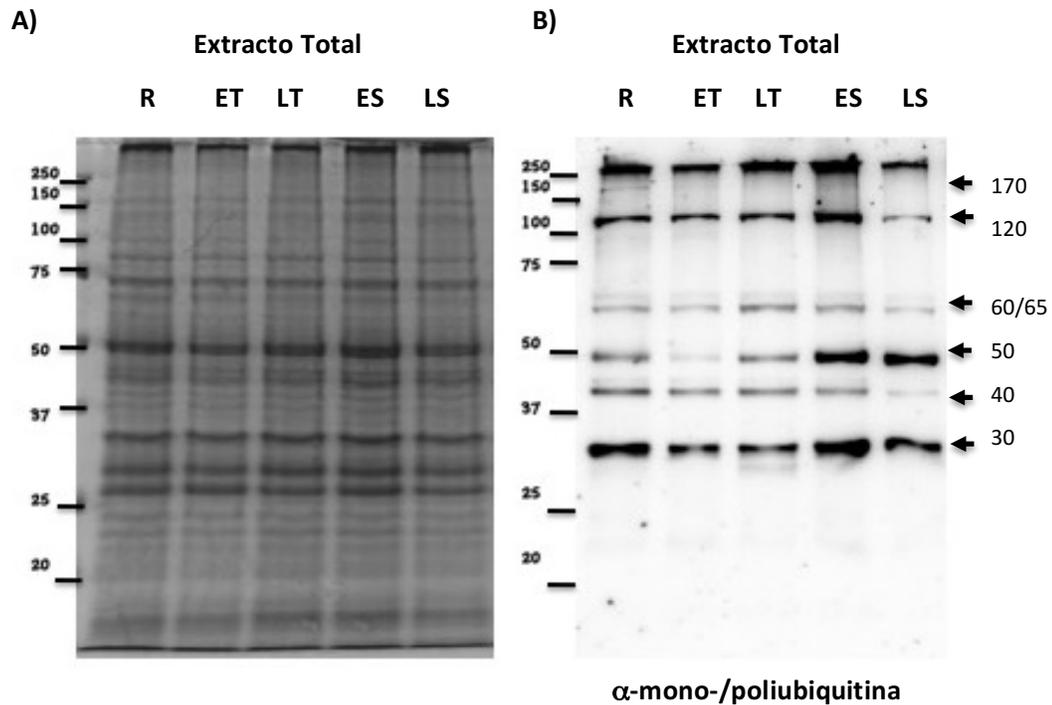


Figura 28. Proteínas ubiquitinadas en el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*. Proteínas totales de parasitos enriquecidos en las distintas fases del ciclo se resolvieron por PAGE-SDS al 10%, se transfirieron a membranas de NC y la Ub se detectó con un anticuerpo anti mono- y poliubiquitina. **A)** Proteínas totales de diferentes fases del ciclo intraeritrocítico teñidas con azul de Coomassie G-250 **B)** Proteínas ubiquitinadas a lo largo del ciclo intraeritrocítico. A- Anillos (6am); ET- Trofozoitos tempranos (12:00 pm); LT- Trofozoitos tardíos (3:00 pm); ES. Esquizontes tempranos (3:00pm); LS. Esquizontes tardíos (12:00 pm).

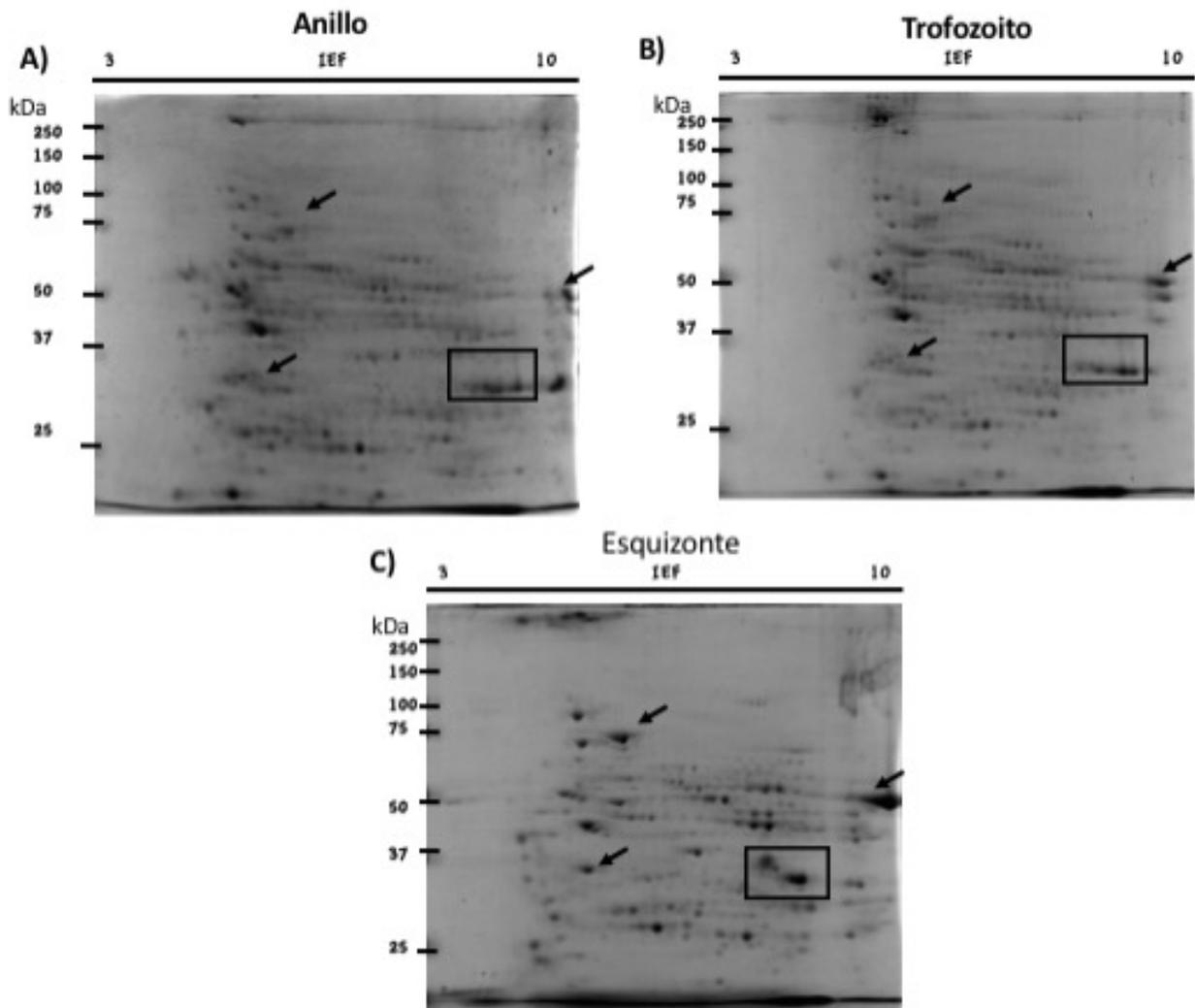


Figura 29. Comparación de las proteínas de las fases del ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*. Se muestra un gel representativo de tres réplicas biológicas (150 μ g de proteína). La primera dimensión se corrió en un rango de pI de 3-10 NL y la segunda dimensión en PAGE-SDS al 10%. Los gels fueron teñidos con azul de Coomassie G-250. A) Anillos; B) Trofozoítos; C) Esquizontes. Las proteínas con diferencias entre cada estadio se indican con flechas y recuadro negro.

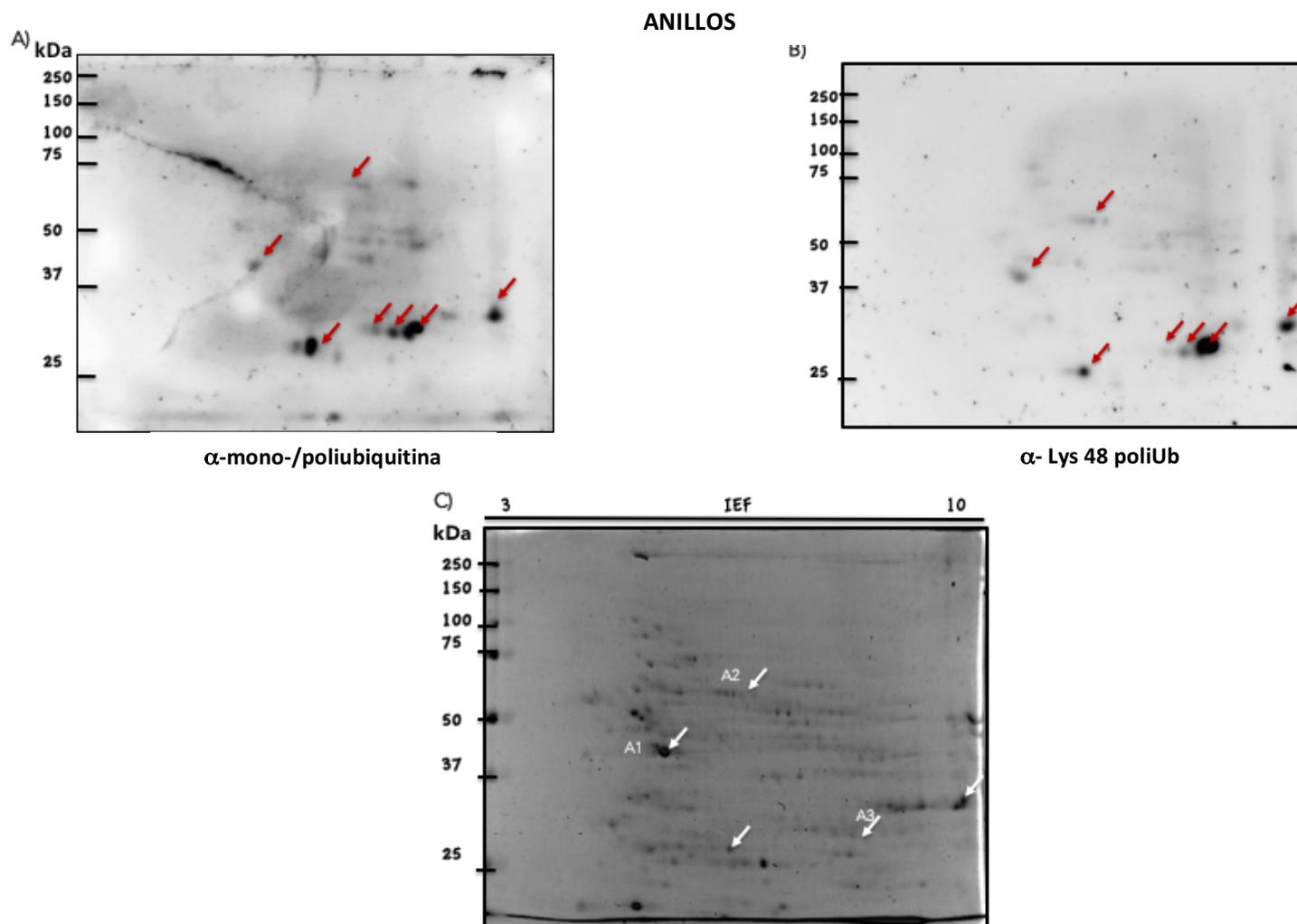


Figura 30. Detección de proteínas ubiquitinadas en la fase de anillo de *P. chabaudi*. A) Detección de las proteínas mono y poliubiquitinadas en la fase de anillos; B) Detección de las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas en la fase de anillo C) Localización de las proteínas en 2DE al 10%, teñido con azul de Coomassie G-250. Las flechas en rojo señalan la localización de las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas y en blanco se señalan estas mismas en el gel 2D. Con letras (A1-A3) se muestran las proteínas identificadas por MS.

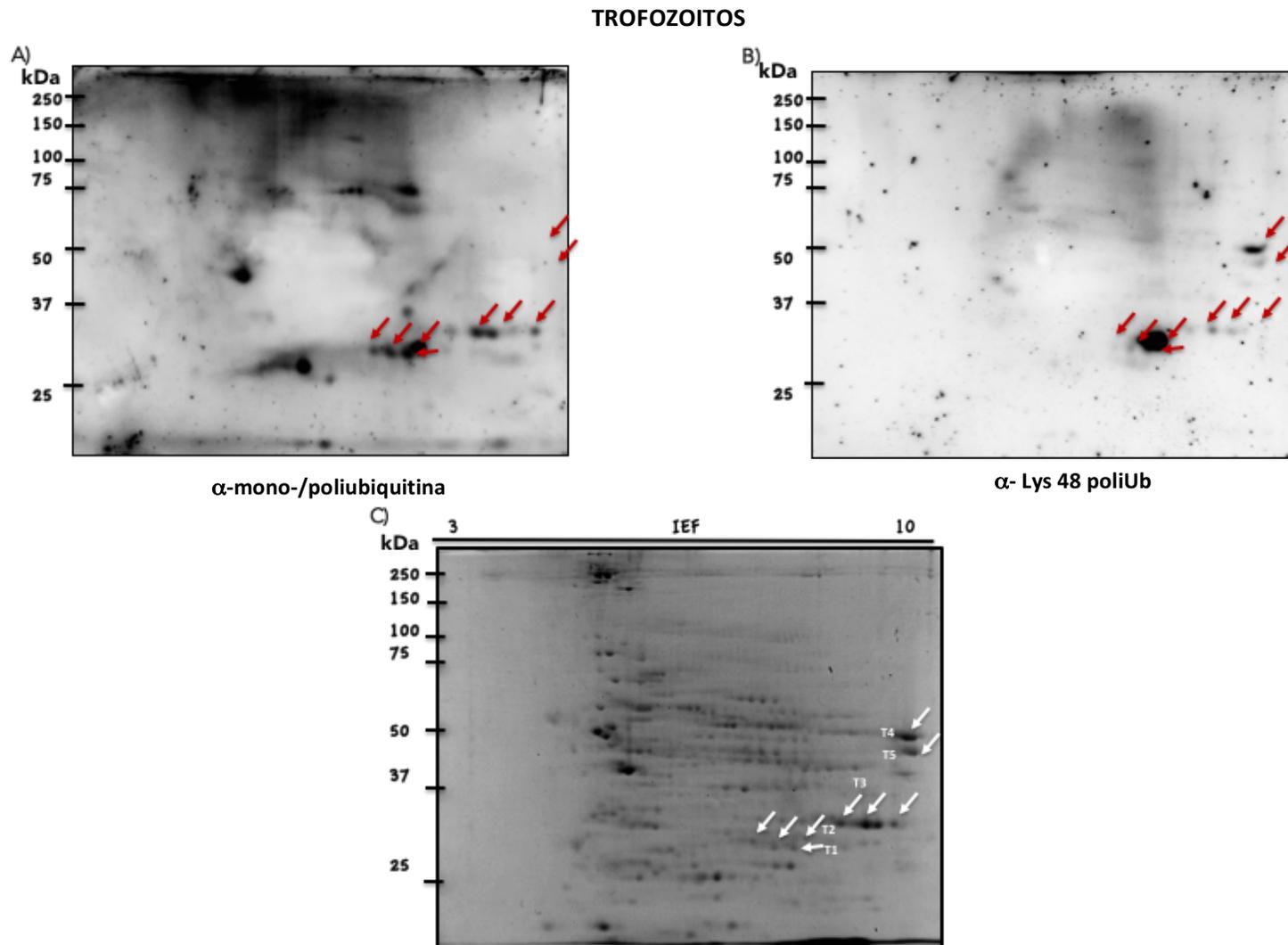


Figura 31. Detección de proteínas ubiquitinadas en la fase de trofozoito de *P. chabaudi*. A) Detección de las proteínas mono y poliubiquitinadas en la fase de trofozoito; B) Detección de las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas en la fase de trofozoito C) Localización de las proteínas en 2DE al 10%, teñido con azul de Coomassie G-250. Las flechas en rojo señalan la localización de las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas y en blanco se señalan estas mismas en el gel 2D. Con letras (T1-T5) se muestran las proteínas identificadas por MS.

ESQUIZONTES

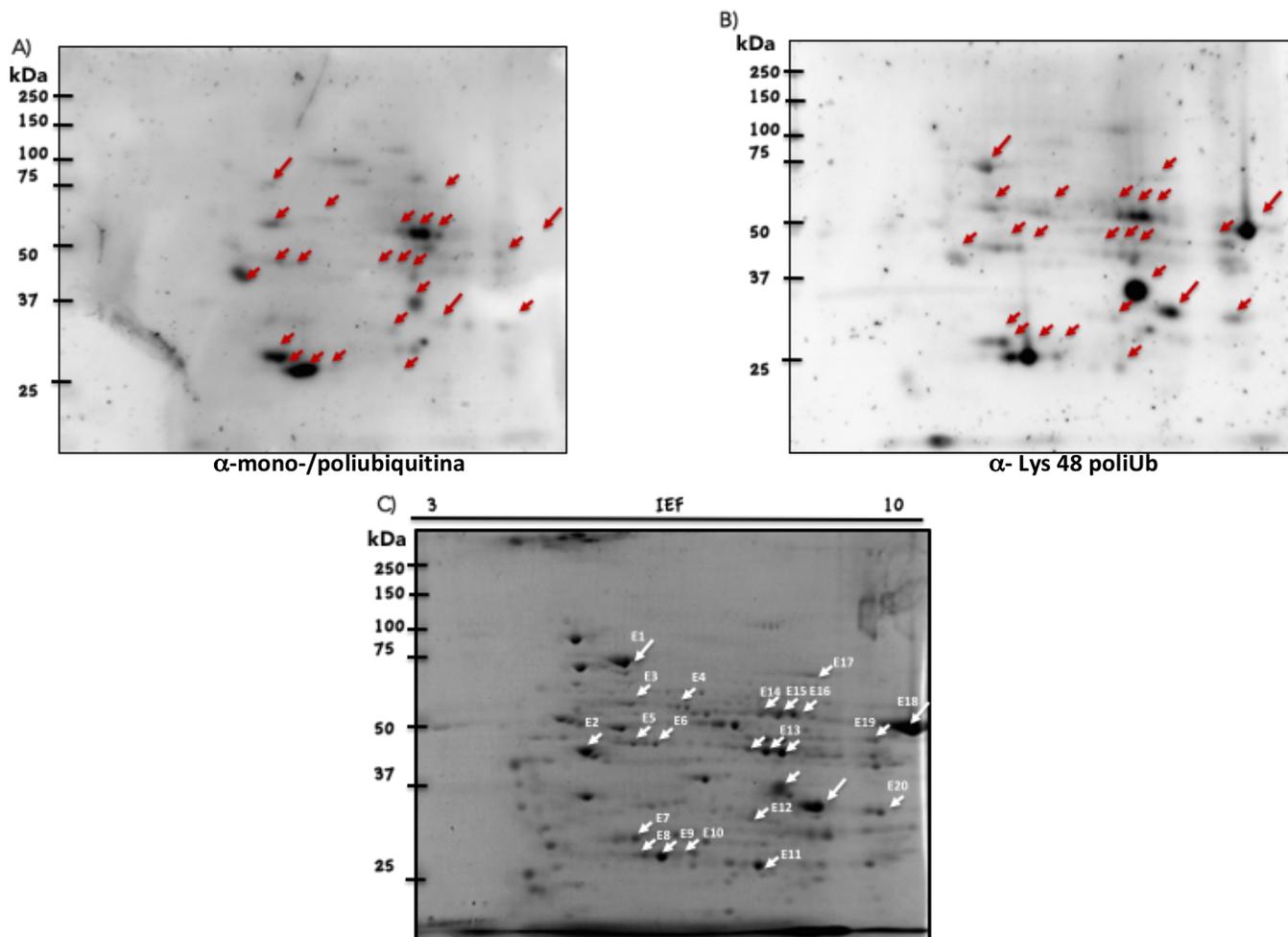


Figura 32. Detección de proteínas ubiquitinadas en la fase de esquizonte de *P. chabaudi*. **A)** Detección de las proteínas mono y poliubiquitinadas en la fase de esquizonte; **B)** Detección de las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas en la fase de trofozoíto **C)** Localización de las proteínas en 2DE al 10%, teñido con azul de Coomassie G-250. Las flechas en rojo señalan la localización de las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas y en blanco se señalan estas mismas en el gel 2D. Con letras (E1-E20) se muestran las proteínas identificadas por MS.

Tabla 2. Identificación de proteínas ubiquitinadas en la fase de anillo (A), trofozoito (T) y esquizonte (E) por espectrometría de masas

Código	Id de la Secuencia	Número de Acceso(NCBI)	Descripción de la Proteína	Función	PM Teórico/ Exp ^a	pI Teórico ^b	Unused ^c / Score ^d / Conteo de Espectro ^e	% Cov. ^e
A1	Q4Z1L3	gi 635576196	Cadena A, cristal de la Estructura de la Actina I de <i>Plasmodium berghei</i> con loop-D de actina de músculo	Componente principal del citoesqueleto	41.9/40	5/5	3 ^c	50.9
A2	K6UUT1	gi 457872484	Factor de alargamiento 1 alfa [<i>P. cynomolgi</i> cepa B]	Unión dependiente de GTP de tRNA-aminoacil al sitio A de ribosomas durante la biosíntesis de proteínas	48.9/60	9.6/6	2 ^c	10.1
A3	W7FNQ0	gi 579329115	Proteína hipotética PFAG_04685 [<i>P. falciparum</i> Santa Lucia]	Desconocida	168.8/28	6.6/7.8	1.7 ^c	8.8
T1	W7FQB6	gi 887563	Proteína cinasa de serina/treonina [<i>P. falciparum</i>]	Proteína cinasa	90.8/28	10.2/7.8	2 ^c	8.9
T2	Q4YRX2	gi 68067511	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [<i>P. berghei</i> ANKA]	Glucólisis	36.6/29	7.9/8	4 ^c	6.5
T3	A0A077T NY1	gi 675222525	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hipotético [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Glucólisis	36.6/33	7.7/8.5	6.9 ^c	21.7
T3	Q4Z3W6	gi 68067918	proteína hipotética [<i>P. berghei</i> ANKA]	Desconocida	79.7/33	8.5/8.5	1.95 ^c	2.5
T4	A0A077X DU3	gi 675227456	Factor de alargamiento 1 alfa [<i>P. berghei</i> ANKA]	Unión dependiente de GTP de tRNA-aminoacil al sitio A de ribosomas durante la biosíntesis de proteínas	48.9/45	9.6/9.6	12.8 ^c	24.6
T4	K6UX10	gi 457875124	proteína hipotética PCYB_131280, parcial [<i>P. cynomolgi</i> cepa B]	Desconocida	80.3/45	9.8/9.6	2 ^c	1.7
T5	KUUT1	gi 457872484	Factor de Elongación 1 alfa [<i>P. cynomolgi</i> cepa B]	Unión dependiente de GTP de tRNA-aminoacil al sitio A de ribosomas durante la biosíntesis de proteínas	48/49	9.6/9.6	35.7 ^c	61.1
E1	Q25681	gi 675219991	Proteína de Choque Térmico, Hipotética [<i>P. chabaudi</i>]	Plegamiento de proteínas, respuesta al estrés	74/ 75	5.3	538 ^e	54
E1	Q5UAH0	gi 70936729	Proteína disulfuro-isomerasa	Cell redox homeostasis	55/75	5.5	93 ^e	58

E1	Q4XNH6	gi 675220798	[<i>P. chabaudi chabaudi</i>] Proteína de Choque Térmico 70, Hipotética [<i>P. chabaudi</i>]	Plegamiento de proteínas, respuesta al estrés	73/75	6.55	41 ^e	49
E1	Q4XL82	gi 70945333	Proteína Hipotética, parcial [<i>P. chabaudi</i>]	Desconocida	141/75	10.48	6 ^e	1.8
E2	W7FRF9	gi 124806845	Actina-1 [<i>P. falciparum</i>]	Componente principal del citoesqueleto	42/45	5.21	547 ^d	58
E3	A0A077TR D4	gi 70943364	Complejo T proteína 1 subunidad epsilon, parcial [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Unión ATP. Plegamiento de proteínas. Chaperona.	59/56	5.5	10 ^c	18.5
E4	Q4YWP9	gi 68071207	Complejo T subunidad beta [<i>P. berghei ANKA</i>]	Unión ATP. Plegamiento de proteínas. Chaperona.	59/53	6.4	5.7 ^c	8.1
E5	A0A024VJ M9	gi 574965696	Factor de iniciación eucarionte 4A [<i>P. falciparum</i> FCH/4]	Helicasa	45.3/43	5.4	23.23 ^c	41.9
E6	A0A077TR 61	gi 675222593	Factor de iniciación eucarionte 4A, Hipotética [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Helicasa	45.3/43	5.8	23.63 ^c	45.3
E7	A0A077TP C7	gi 675220481	Proteína fam-a [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Proteína rica en triptofano, inductor de la respuesta inmune	32.3/30	6.2	28.15 ^c	74
E8	Q4Y6D0	gi 70951782	Uridina fosforilasa [<i>P. chabaudi</i>]	Actividad catalítica. Metabolismo de nucleósidos.	27/26	5.8	70.8 ^c	89
E8	W7AYM5	gi 577150680	Proteína hipotética YYG_00822 [<i>P. vinckei</i>]	Desconocida	29/26	5.6	15.5 ^c	28.5
E8	Q4XX86	gi 70945775	Gas41 [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Regulación de la transcripción	26/26	8.1	8.9 ^c	39
E8	A0A077T QA0	gi 70946556	Proteosoma subunidad alfa tipo 1 [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Actividad de endopeptidasa tipo treonina. Proceso catalítico dependiente de ubiquitina	28/26	5.9	6.86 ^c	26
E8	A0A077TP K1	gi 70951412	Proteasoma subunidad beta [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Actividad de endopeptidasa tipo treonina. Proteólisis involucrada en proceso catabólico	30/26	6.2	6.7 ^c	26
E9	Q4Y6D0	gi 70951782	Uridina fosforilasa [<i>P. chabaudi</i>]	Actividad catabólica. Metabolismo de nucleósidos	27/26	5.8	534 ^e	52
E9	Q4Y5V0	gi 70946825	Proteína relacionada a ciclina [<i>P. chabaudi</i>]	Subunidades regulatorias de cinasas dependientes de ciclina	25/26	4.8	110 ^e	56

E9	Q5UAH0	gi 70936729	Disulfuro isomerasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Homeostasis de estrés oxidativo	55/26	5.5	28 ^e	32
E9	Q4Y142	gi 70946556	Proteasoma subunidad alfa tipo 1 [<i>P. chabaudi</i>]	Proceso catabólico dependiente de ubiquitina.	29/26	5.9	22 ^e	35
E9	A0A077TP K1	gi 70951412	Proteasoma subunidad beta [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Actividad endopeptidasa tipo treonina. Proteólisis involucrado en el proceso catabólico de proteínas	30/26	6.2	11 ^e	21%
E10	Q4Y6D0	gi 70951782	Uridina fosforilasa [<i>P. chabaudi</i>]	Actividad catabólica. Metabolismo de nucleósidos	27/26	5.8	76.01 ^c	95
E10	Q4Y5V0	gi 70946825	Proteína relacionada a ciclina [<i>P. chabaudi</i>]	Subunidades regulatorias de cinasas dependientes de ciclina.	25/26	4.8	50.9 ^c	72
E10	A0A077T QA0	gi 70946556	Proteasoma subunidad alfa tipo 1 [<i>P. chabaudi</i>]	Proceso catabólico dependiente de ubiquitina.	29/26	5.9	29.2 ^c	70
E10	A0A077TR Q3	gi 675221881	Hipoxantina-guanina-xantina-fosforibosiltransferasa [<i>P. chabaudi</i>]	Actividad de guanina fosforibosiltransferasa. Vía de salvamento de ribonucleósidos de purina.	27/26	6.2	24.9 ^c	63
E10	W7ARB9	gi 577150919	Subunidad regulatoria 9 del proteasome 26S no-ATPasa [<i>P. vinckei</i>]	Complejo del proteasome	26/26	5.6	9.5 ^c	48
E10	W7AXR5	gi 657009514	Subunidad alfa 4 del proteasome 20S [<i>P. vinckei vinckei</i>]	Actividad de endopeptidasa de tipo treonina. Proceso catabólico dependiente de ubiquitina	27/26	6.4	8.8 ^c	48
E11	P07833	gi 123500	Hipoxantina-guanina-xantina-fosforibosiltransferasa [<i>P. falciparum</i>]	Actividad de guanina fosforibosiltransferasa. Vía de salvamento de ribonucleósidos de purina.	27/25	7.6	86 ^d	18
E12	A0A077XC D5	gi 675220823	Receptor para la cinasa c activada (RACK) [<i>P. chabaudi</i>]	Actividad de cinasa	36/30	6.3	54.2 ^c	75
E12	A0A077YG 98	gi 70938933	Nucleasa p1/s1, hipotético [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Actividad de endonuclease. Proceso catabólico de DNA.	38/30	6.2	40.5 ^c	72
E12	W7AR89	gi 577147954	Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad I [<i>P. vinckei petteri</i>]	Actividad de factor de iniciación de la traducción. Formación del complejo de preiniciación de la traducción.	37/30	6.3	24.3 ^c	49
E12	A0A077TR Q3	gi 675221881	Hipoxantina-guanina-xantina-fosforibosiltransferasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Actividad de guanina fosforibosiltransferasa. Vía de salvamento de ribonucleósidos de purina.	27/30	6.2	16.7 ^c	54
E12	A0A077TK	gi 70944474	Enzima biosintética de	Actividad catalítica. Procesos de	33/30	7	8.5 ^c	27

	S4		piridoxina pdx1 [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	biosíntesis de biosíntesis de piridoxal fosfato.				
E12	A0A077TT H5	gi 70951959	L-lactato deshidrogenasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Proceso metabólico de carbohidratos.	34/30	7.7	6.7 ^c	29
E13	W7FJH4	gi 124506998	Fosfoglicerato cinasa OS [<i>P. falciparum</i>]	Cinasa.Unión a ATP. Proceso glucolítico.	46/43	7.6	170 ^d	18
E14	Q02155	gi 400025	Hexocinasa OS [<i>P. falciparum</i>]	Cinasa.Unión a ATP. Proceso glucolítico.	56/50	7	127 ^d	31
E15	A0A077T N68	gi 70951516	Piruvato cinasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Degradación de carbohidratos. Glucólisis.	56/50	6.8	61.9 ^c	73
E15	A0A077T M33	gi 70946810	Factor del porcesamiento del Pre-mRNA-processing 19, hipotético [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Actividad de transferasa de ubiquitina. Ligasa	57/50	6.8	23 ^c	41
E15	Q4Z4S4	gi 68072367	Factor de elongación 2 [<i>P. berghei ANKA</i>]	Unión a GTP binding. Biosíntesis de proteínas.	93/50	6.7	9.9 ^c	11
E15	W7ALJ8	gi 577149624	Proteína similar a RuvB- 1 (pontina 52) [<i>P. vinckei petteri</i>]	Desenrollamiento del DNA duplex. Unión a nucleótidos. Actividad de helicase de DNA.	53/50	6.7	7.4 ^c	18
E15	W7AHM0	gi 577149871	Proteína ribosomal ácida 60S P0 [<i>P. vinckei petteri</i>]	Ribonucleoproteína. Constituyente estructural del ribosoma	35/50	7.7	4.9 ^c	22
E16	A0A077TJ U2	gi 70953202	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Oxidoreductasa. Proceso de bisoíntesis de nucleótidos purina.	56/50	7.5	48.4 ^c	67
E16	V7PVE5	gi 83317699	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [<i>P. yoelii yoelii</i> 17XNL]	Unión a NAD. Oxidoreductase activity. Glucólisis.	37/50	7.7	8.1 ^c	30
E16	V7PMA6	gi 82539835	Factor del inicio de la traducción E1F2 [<i>P. yoelii yoelii</i> 17XNL]	Actividad de GTPase activity. Biosíntesis de proteínas.	51/50	8.0	5.4 ^c	15.3
E16	A0A077TR U4	gi 70924553	Enolasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Liasa. Proceso glucolítico.	49/50	6.5	4 ^c	21
E16	A0A077T N68	gi 70951516	Piruvato cinasa [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Degradación de carbohidratos. Glucólisis.	56/50	6.8	4.5 ^c	15.5
E17	A0A077YF P9	gi 70952713	Proteína de organización Hsp70/Hsp90, hipotético [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Liase. Glucólisis.	66/70	7.5	93 ^c	79
E17	Q4YRX2	gi 68067511	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [<i>P. berghei</i>]	Unión a NAD. Oxidoreductase activity. Glucólisis.	37/50	7.9	14.3 ^c	52

E17	A0A077TH N3	gi 70947139	(cepa Anka] Complejo -T proteína 1 [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Unión a ATP. Plegamiento de proteínas. Chaperona.	60/50	7.4	11.3 ^c	15
E17	V7PNI4	gi 81177589	Factor de Elongación 1 alfa [<i>P. yoelii yoelii</i> 17XNL]	Actividad de GTPasa. Biosíntesis de proteínas.	49/50	9.6	3.2 ^c	5
E18	Q00080	gi 119153	Elongation factor 1-alpha OS [<i>P. falciparum</i>]	Actividad de GTPasa. Biosíntesis de proteínas.	49/49	9.3	287 ^d	47
E19	A0A077YH S5	gi 675221037	Proteína asociada a la proliferación 2g4, hipotético [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Hidrolasa.	42.5/43	8.2	5.73 ^c	18.8
E20	A5KC68	gi 148801687	proteína hipotética, conserved [<i>P. vivax</i>]	Desconocida	233.7/32	7.6	1.7 ^c	7.6
E20	A0A077TL N8	gi 675221551	acetil-CoA sintetasa, hipotético [<i>P. chabaudi chabaudi</i>]	Proceso metabólico, actividad catalítica	102.3/32	8.1	1.7 ^c	7.4

Los puntos escindidos del gel fueron identificados por LC-MS/MS en nano ESI qTOF (ABSCIEX) o en Q ExactiveTM Orbitrap (ThermoScientific)

^a Masa Teórica/Experimental

^b pI Teórico reportado en ExPasy (www.expasy.org)

^c score de LC-MS/MS de proteínas identificadas por Protein Pilot. Las proteínas que muestran un unused score >1.3 se identificaron con una confianza $\geq 95\%$

^d score de LC-MS/MS de proteínas identificadas por Mascot. Scores superiores a 70 son significativos ($p < 0.05$).

^e score LC-MS/MS de proteínas identificadas por Scaffold. La identificación peptídica fue aceptada si se podía establecer una probabilidad superior al 91% para lograr una Tasa de Descubrimiento de Falsos positivos (FDR) menor al 1% por el algoritmo FDR Local de Scaffold. La identificación de proteínas se aceptó si se podía establecer una probabilidad superior al 52% para lograr una FDR menor al 5.0% y que contenga al menos 2 péptidos identificados.

^f Cobertura de la secuencia: porcentaje de aminoácidos de péptidos identificados en relación con la secuencia completa para cada proteína identificada.

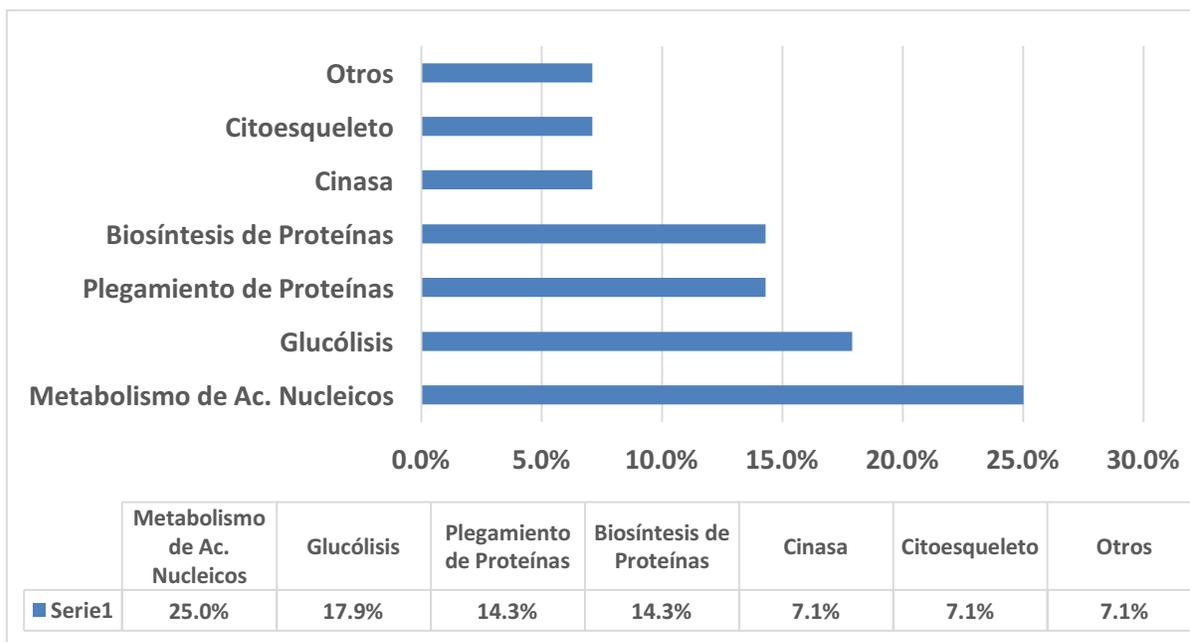


Figura 33. Funciones de las proteínas identificadas por MS en las tres fases del ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi* La función biológica de las proteínas se determinó con base en lo anotado en la base de datos Uniprot. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a total de 28 proteínas identificadas.

Tabla 3. Secuencias de péptidos donde se identificó el sitio de ubiquitinación

ID	Nombre de la proteína	Secuencia ^a	XI-Tandem ^b	Sitio de Ubq ^c
E1	Proteína de choque térmico, hipotética [<i>P. chabaudi</i>]	(K)KSQIFTTYADNQPGLIQVYEGER(A)	4.09	437
E1	Proteína de choque térmico 70, hipotética [<i>P. chabaudi</i>]	(R)IINEPTAAALAFGLEKSDGK(V)	3.32	222
E9	Uridina fosforilasa [<i>P. chabaudi</i>]	(R)AGSCGSLQPGYIKR(G)	2.35	101
		(K)TGGIFIVDGCPLKWKEGDFDEV(E)	9.32	211

^aSecuencia peptídica obtenida a partir de los espectros masa carga. En rojo se muestra la lisina modificada por diglicina.

^bLa identificación peptídica fue aceptada si se podía establecer una probabilidad superior al 91% para lograr una Tasa de Descubrimiento de Falsos Positivos (FDR) menor al 1% por el algoritmo FDR Local de Scaffold. Las identificaciones con XITandem requirieron al menos scores $-\text{Log}(\text{Score Esperado})$ superiores a 1.5.

^cSitio que ocupa la lisina (K) modificada por diglicina dentro de la proteína.

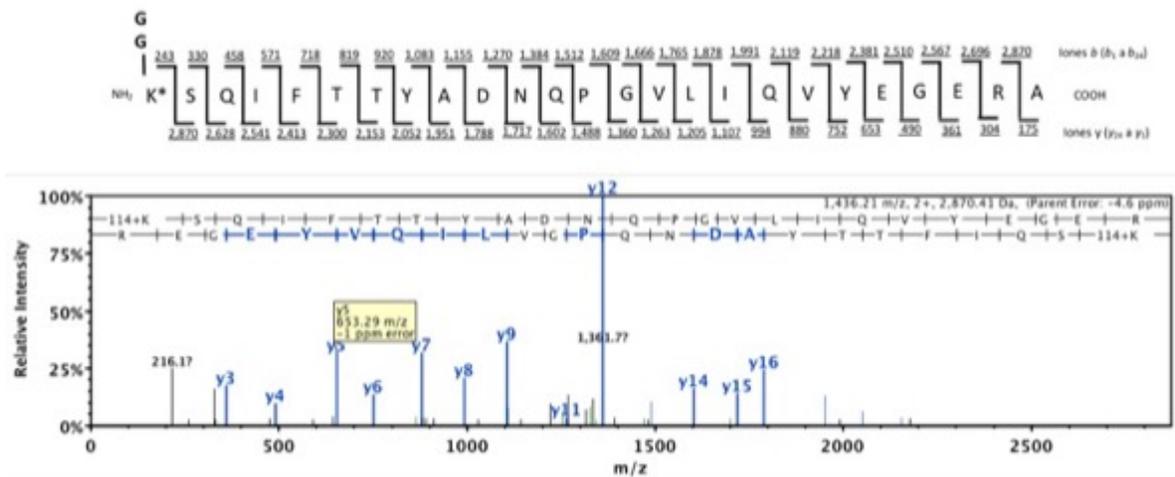


Figura 34. Identificación por MS/MS del sitio de ubiquitinación de HSP70-1 (E1). Después de la digestión con tripsina, el péptido que contiene la modificación postraduccional tiene un remanente de diglicina (GG) unido de manera covalente al residuo de lisina en el extremo N-terminal del péptido que es resistente a la proteólisis con tripsina (señalado con asterisco). Se muestra la secuencia del péptido producido por la proteólisis con tripsina con las masas de los iones (iones tipo b y tipo y) con la modificación de diglicina. Además, se muestra el patrón de fragmentación (espectro MS/MS) adquirido para la construcción de la secuencia peptídica.

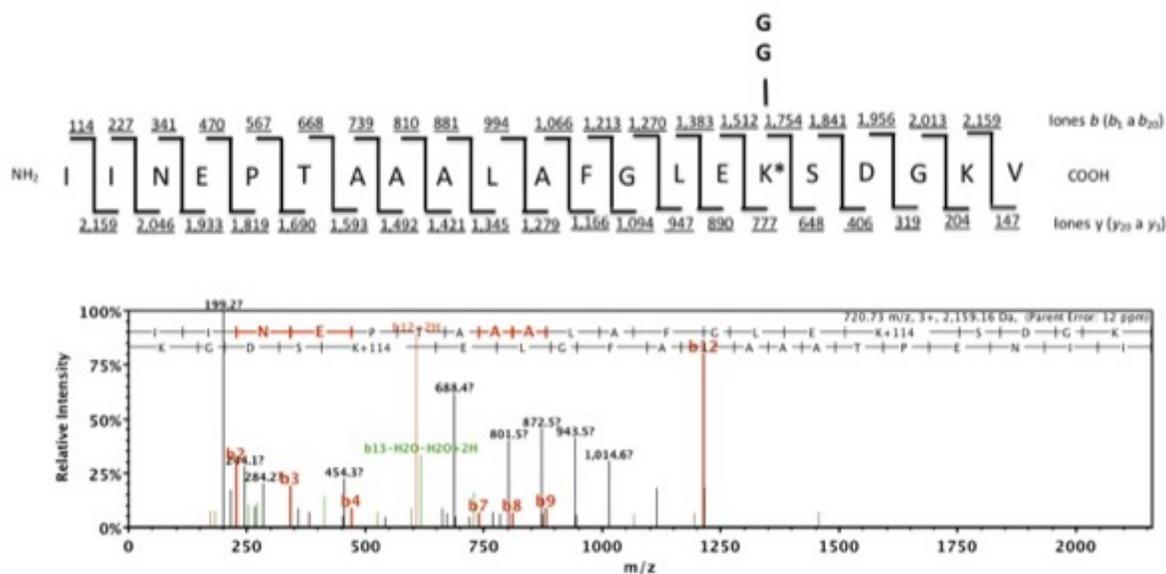
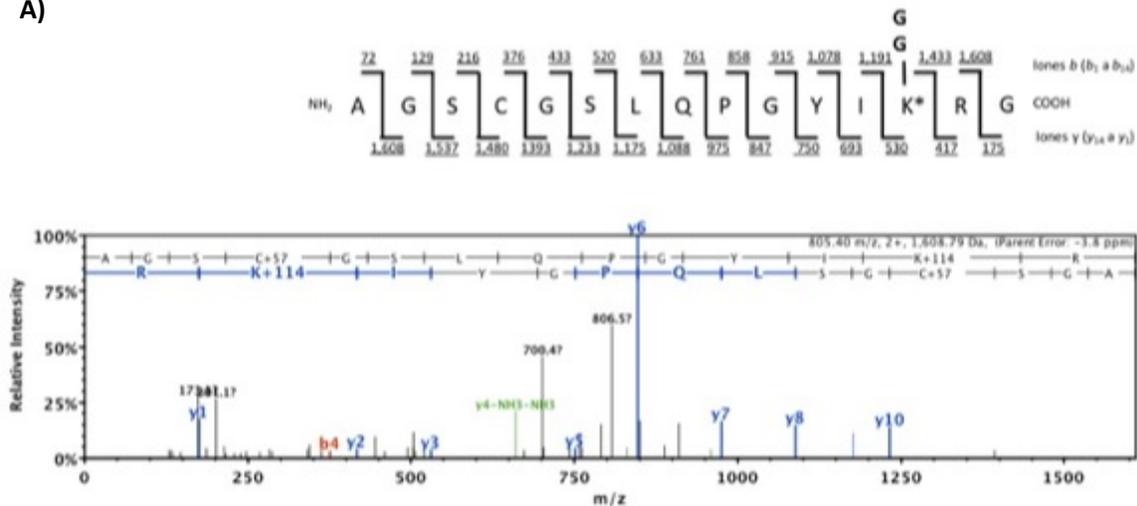


Figura 35. Identificación por MS/MS del sitio de ubiquitinación de HSP70-III (E1). Después de la digestión con tripsina, el péptido que contiene la modificación postraduccional tiene un remanente de diglicina (GG) unido de manera covalente al residuo de lisina que es resistente a la proteólisis con tripsina (señalado con asterisco). Se muestra la secuencia del péptido producido por la proteólisis con tripsina con las masas de los iones (iones tipo b y tipo y) con la modificación de diglicina. Además, se muestra el patrón de fragmentación (espectro MS/MS) adquirido para la construcción de la secuencia peptídica.

A)



B)

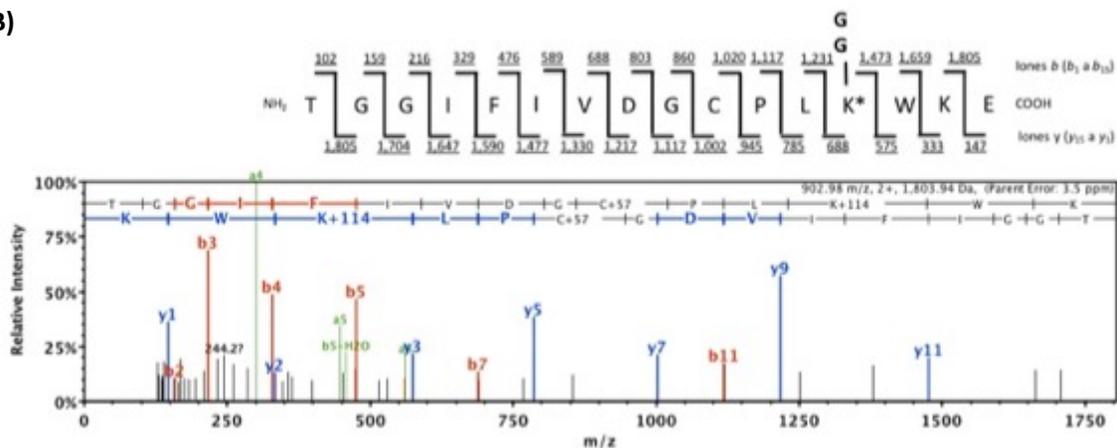


Figura 36. Identificación por MS/MS del sitio de ubiquitinación de Uridina Fosforilasa (E9). A-B) Después de la digestión con tripsina, el péptido que contiene la modificación postraduccional tiene un remanente de diglicina (GG) unido de manera covalente al residuo de lisina que es resistente a la proteólisis con tripsina (señalados con asterisco). Se muestra la secuencia del péptido producido por la proteólisis con tripsina con las masas de los iones (iones tipo b y tipo y) con la modificación de diglicina. Además, se muestra el patrón de fragmentación (espectro MS/MS) adquirido para la construcción de la secuencia peptídica.

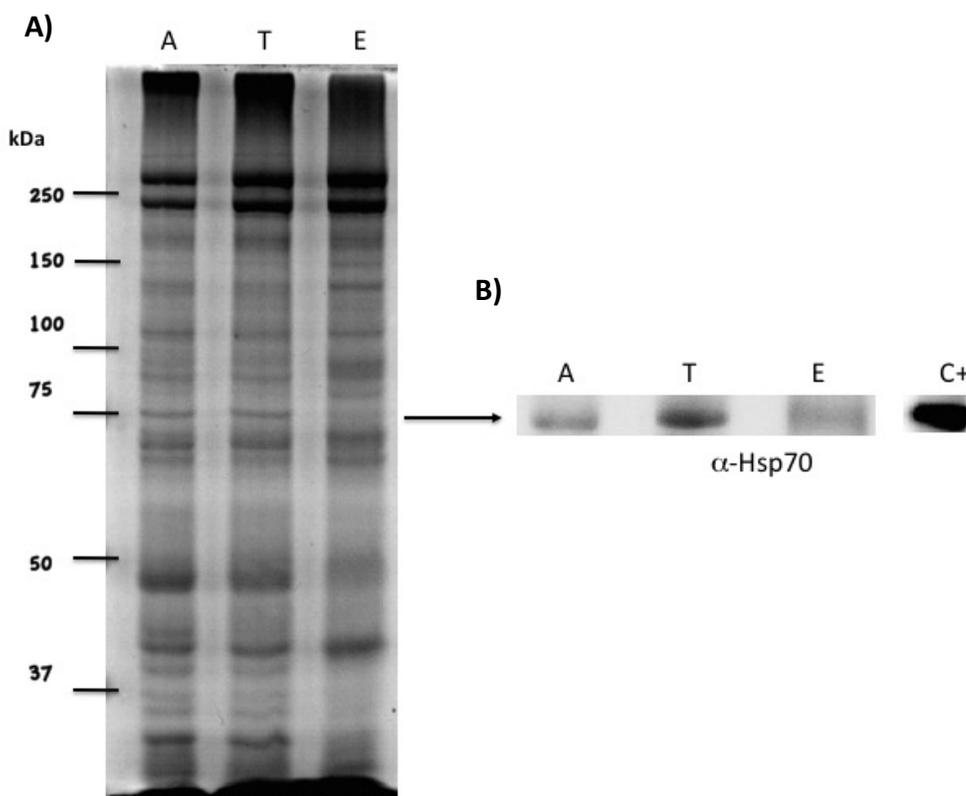


Figura 37. Abundancia de Hsp70 en el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*. Las proteínas totales de anillos, trofozoítos y esquizontes de *P. chabaudi* se separaron por SDS-PAGE al 8%. A) Para visualizar las proteínas totales el gel se tiñó con azul de Coomassie G-250. B) Para detectar la proteína Hsp70 durante el ciclo intraeritrocítico las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de NC y se hizo WB con un anticuerpo anti Hsp70 de *T. vaginalis*. El máximo de expresión se observó en los trofozoítos. A. Anillos; T. Trofozoítos; E. Esquizontes; C+. Proteínas de *T. vaginalis* como control.

11.5 Análisis del complejo de ubiquitinación similar a SCF en *P. chabaudi*

Los posibles componentes del complejo de ubiquitinación SCF en *P. chabaudi* se identificaron y estudiaron.

11.5.1 E3 Ligasa de tipo RING en *P. chabaudi*

Por análisis *in silico* se predijo que *P. chabaudi* posee 36 genes relacionados a E3 ligasas de tipo RING en comparación a *P. falciparum* que posee 42 (Ponts N, *et al.*, 2008). En este trabajo se realizó psi-Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov) para identificar en *P. chabaudi* una E3 ligasa homóloga a la Rbx1 de humano (P62877). La secuencia con mayor identidad (E-score más bajo) tuvo el número de acceso gi|70948880. Esta secuencia se identificó en plasmodb con el número de acceso PCHAS_080650. Este gen similar a Rbx tiene una longitud de 324 bp, no presenta intrones (Figura 38) y se predice que codifica para una proteína de 12.5 kDa.

El gen se clonó en el vector pGEM®-T easy y se secuenció. El resultado obtenido fue 100% idéntico al reportado en las bases de datos. Con base en esto se diseñaron iniciadores específicos para su análisis de expresión mediante qRT-PCR que amplificaron un producto de 114 bp (Tabla 4). Los valores de expresión se normalizaron con respecto a la expresión del gen ribosomal 18S.



Figura 38. Esquema del gen *PcRbx1*. El gen tiene una longitud de 324 bp. En azul se muestra la región clonada y secuenciada. En rojo se muestra la región amplificada para la qRT-PCR.

Tabla 4. Iniciadores para la qRT-PCR del gen *PcRbx-1* de *P. chabaudi*

Gen	Sentido	Antisentido	Posición en el mRNA	Tamaño del Amplificado
<i>PcRbx1</i>	ATGATTAATAATACACGATCTGA	TTAGGTTGTTGCCTTTTGAAT	1-324	324 bases
	TGGGGTGTGTGAATCATGC	AGGGCAAACCTTGCTTGCTT	211-324	114 bases

En cuanto a la proteína, la secuencia posee una identidad de 61% con la secuencia de la proteína del humano y de 96% con la secuencia de la proteína de *P. berghei*. En la Figura 40A se muestran los aminoácidos que se han identificado en la proteína del humano como necesarios para llevar a cabo la interacción con la proteína Cullina que se sabe sirve de andamio (Scaffold) para la formación del complejo de ubiquitinación activo (Zheng *et al.*, 2002). En general, la mayor parte de estos aminoácidos necesarios se encuentran conservados entre las diferentes especies analizadas.

Para identificar los dominios estructurales de la proteína, lo que permitió apoyar que se trata de una proteína E3 ligasa se realizó el análisis *in silico* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) lo que resultó en la identificación de la secuencia canónica de la familia de E3 ligasas de tipo RING (Cys-X2-Cys-X(9-39)-Cys-X(1-3)-HisX(2-3)-Cys-X2-Cys-X(4-48)-Cys-X2-Cys) (Figura 40A y B). En el caso del humano, este dominio va del aminoácido 53 al 98 y en el caso de *P. chabaudi*, del aminoácido 47-97 (Figura 40B). Finalmente, para determinar si la proteína presentaba las mismas características en la estructura tridimensional que las del humano, se realizó el modelamiento en el programa I-Tasser (C-Score -0.34) y se realizó una superposición con la proteína del humano. Para este análisis se utilizaron como plantilla dos estructuras, una con la E3 ligasa sola (pdb 2LGV; Figura 41A) y la otra considerando la asociación de E3 ligasa y la Cullina 1 (pdb 1LDJ; Figura 41B). En la primera asociación (Figura 41A) se observó que el dominio RING está conservado estructuralmente y es posible visualizar una superposición entre el humano (azul) y el parásito (rosa); sin embargo, en el extremo N-terminal, las dos estructuras tendieron a disociarse (Figura 41A). Cuando se utilizó el modelo en complejo con Cullina-1 (verde), se observó que ambas E3 ligasas presentan superposición en el dominio RING, pero en el extremo N-terminal no existe superposición de las estructuras (Figura 41B).

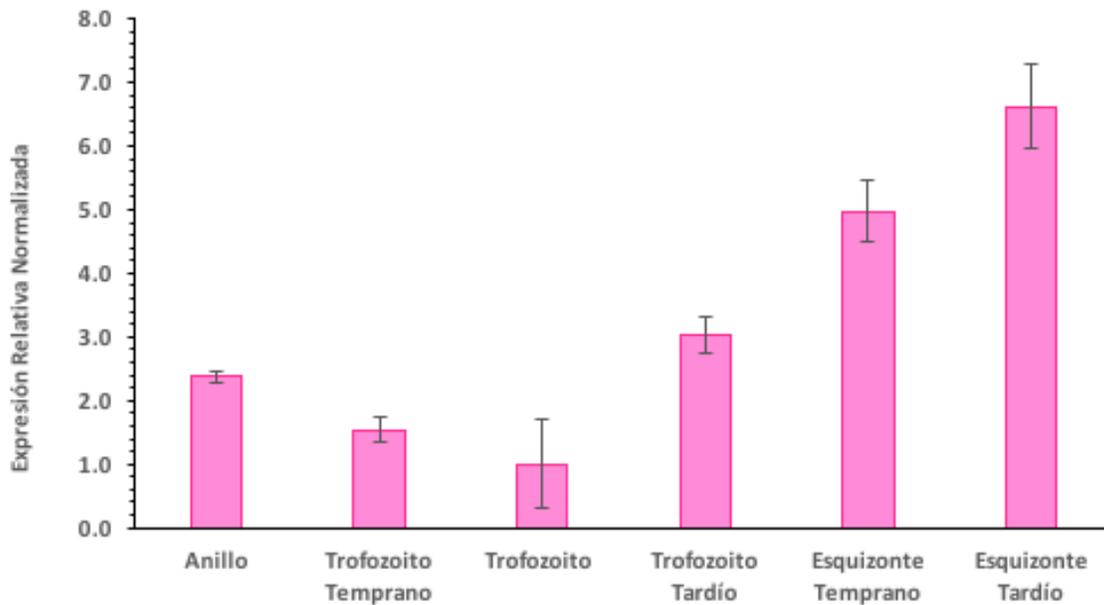
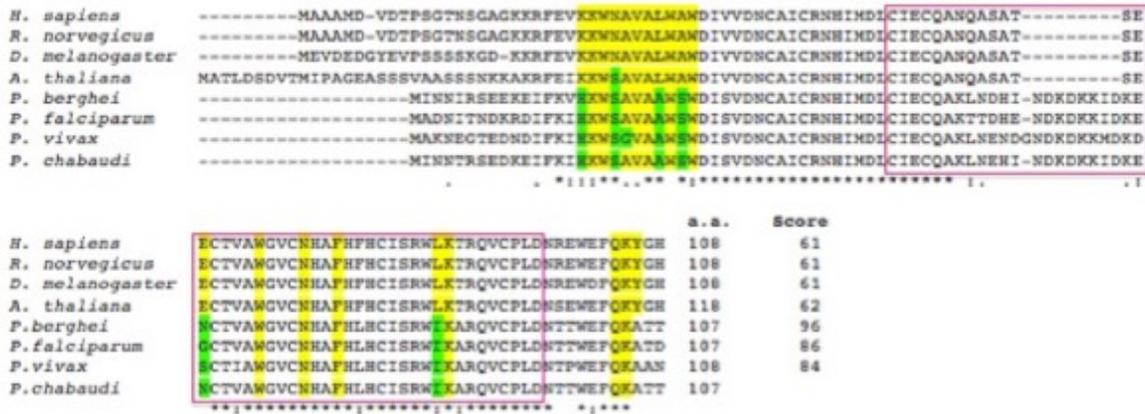


Figura 39. Expresión Relativa del gen similar a *rbx-1* en *P. chabaudi*. La expresión del mensajero del gen *PcRbx-1* (PCHAS_080650) se midió mediante qPCR en seis muestras de parásitos colectadas a diferentes tiempos del ciclo intraeritrocítico. Los experimentos se realizaron por triplicado con muestras biológicas independientes. La expresión disminuye de la fase de anillo a la fase de trofozoíto temprano, al final de esta fase la expresión aumenta y alcanza un máximo en la fase de esquizonte.

A



B

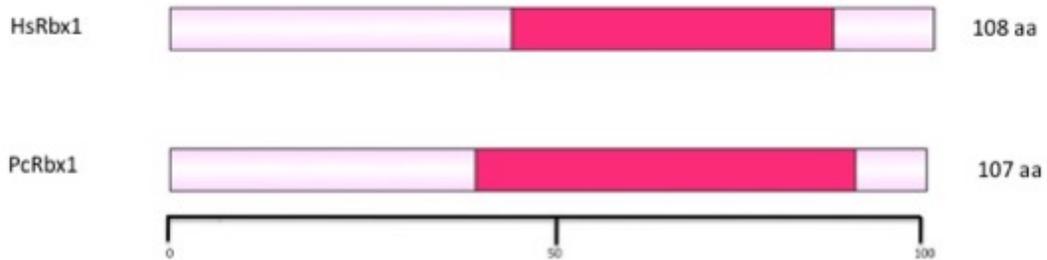


Figura 40. Alineamiento de la secuencia de la E3 ligasa tipo RING Rbx1 de *P. chabaudi* con la de diferentes especies A) Alineamiento (Clustal Omega) de la E3 ligasa Rbx1 de diferentes organismos evolutivamente divergentes y entre varias especies de *Plasmodium*: *H. sapiens* (P26877), *R. norvegicus* (Q498D8), *D. melanogaster* (Q9W5E1), *A. thaliana* (Q940X7), *P. falciparum* (O77367), *P. vivax* (A5K7N6), *P. berghei* (Q4YZA0), *P. chabaudi* (Q4Y429). Al final de cada secuencia se muestra el número de aminoácidos de la proteína por especie y se presenta el porcentaje de identidad entre cada especie y *P. chabaudi*. En amarillo se muestran los aminoácidos necesarios para la interacción con la proteína Cullina-1 y en verde aquellos que en esta misma región, no fueron conservados. **B)** Estructura primaria de la E3 ligasa de tipo RING de humano (*HsRbx1*) y de *P. chabaudi* (*PcRbx1*). En el recuadro rosa se esquematiza el dominio RING de la E3 ligasa que sirve de unión al zinc, estabilizando a la molécula.

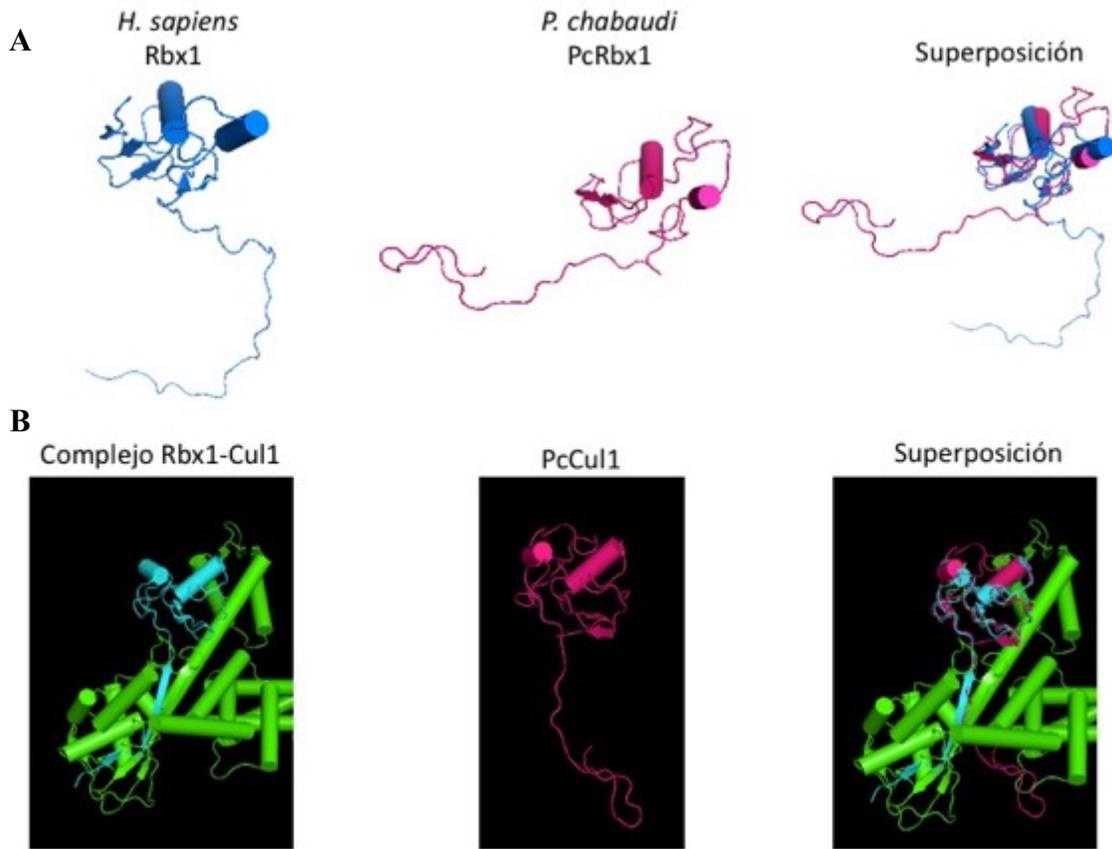


Figura 41. Estructura terciaria y superposición de la enzima E3 ligasa de *P. chabaudi*. **A)** Estructura terciaria de la enzima E3 ligasa Rbx1 de *H. sapiens* (en azul, código PDB 2LGV) y *P. chabaudi* (en rosa, modelo creado en I-TASSER, C-score=-0.34). Ambas estructuras adoptan la estructura canónica del dominio RING, el cual se estabiliza por dos moléculas de zinc (Zn). Ambas secuencias estructuralmente son semejantes en este dominio logrando superponerse, sin embargo, en la región N-terminal no se observa esta superposición (PyMOL v.1.74). **B)** Estructura terciaria de la enzima E3 ligasa Rbx1 de *H. sapiens* en asociación con la proteína Cullina-1 (en azul Rbx 1 y en verde Cul-1, código PDB 1LDJ) y *P. chabaudi* (en rosa, modelo creado en I-TASSER, C-score=-0.34). Como en el caso anterior, ambas estructuras adoptan la estructura canónica del dominio RING, logrando superponerse, sin embargo, en la región N-terminal no se observa esta superposición.

11.5.2 Proteínas similares a Cullina de *P. chabaudi*

En el genoma de *P. chabaudi* se reportan por anotación automática dos genes que codifican para proteínas similares a cullina, el gen PCHAS_112810 y PCHAS_142830, en adelante denominados *cul1* y *cul2*, respectivamente. Estos genes se localizan en los cromosomas 11 y 14, respectivamente. El gen *cul1*, presenta un intrón cercano al extremo 5' de 351 bp y el gen completo tiene una longitud de 3282 bp; el mensajero maduro tiene una longitud de 2931 bases. En el caso de *cul2*, se presenta un intrón en el extremo 3' de 306 bp y el gen tiene una longitud de 2841 bp; el mensajero maduro en este caso tiene una longitud de 2535 bases. Entre secuencias presentan una identidad de la secuencia codificante del 44.4%.

Inicialmente, para conocer experimentalmente la secuencia del gen y compararlo con la secuencia accesible en la base de datos, se diseñaron iniciadores para amplificar 809 bp del gen *cul1* (posición 1655-2439) y 560 bp del gen *Cul-2* (posición 1873-2434). Ambos amplificados fueron clonados en el vector pCR 2.1. y secuenciados. La secuencia obtenida fue 100% idéntica a la anotada en la base de datos plasmdb. Con base en estos resultados, se diseñaron juegos de iniciadores adecuados para obtener un amplificado de 77 bp para el gen *PcCul1* y de 104 bp para el gen *PcCul2* (Tabla 5), los cuales fueron adecuados para realizar la qRT-PCR de las diferentes fases del ciclo intraeritrocítico (Anillos, Trofozoítos y Esquizontes) de *P. chabaudi*. Los valores de expresión de las Cullinas se normalizaron a los niveles de abundancia del RNA del gen ribosomal 18S (Figura 43 y 44).



Figura 42. Esquema de dos genes similares a Cullina en *P. chabaudi*. Los genes *PcCul1* y *PcCul2* presentan una longitud de 3282 bp y 2841 bp, respectivamente. Ambos genes presentan un intrón aunque localizado en diferentes regiones del gen. En azul se muestra la región clonada y secuenciada. En rojo se muestra la región amplificada para la qRT-PCR.

Tabla 5. Iniciadores para la qRT-PCR del los dos genes similares a cullina de *P. chabaudi*

Gen	Sentido	Antisentido	Posición en el mRNA	Tamaño del Amplificado
<i>PcCul1</i>	AGGGGGATCAAGAATCTGGGGCT	GCAAAGCGCTTGCATAATGGTTACA	1655-2439	809 bases
	TTGCCTCTATTGGGTTATGC	TGCCATCGTGCATATTCTTT	2247-2323	77 bases
<i>PcCul2</i>	TGGCCTGCTTTGGAAAAGACTTCG	TCAATAGCCTGGTTGGATGGGGA	1873-2432	560 bases
	CGAGGCAGCTATTGTTTCG	GGATGGGGAAAAAGTGGA	2344-2446	104 bases

En el análisis por qPCR, se observó que ambos genes tienen un comportamiento similar. Los anillos presentaron una expresión inicial que disminuyó durante la fase de trofozoíto y posteriormente la expresión aumentó al final del ciclo durante la fase de esquizonte (Figura 43 y 44). Lo anterior, muestra un comportamiento similar a los otros componentes del complejo de ubiquitinación.

Para determinar los dominios presentes en la proteína, se realizó un análisis *in silico* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) lo que resultó en la identificación del dominio de repetidos similares a Cullina (cuatro repetidos de alfa hélices) que en el caso de *PcCul1* va de la posición 280 a 472 y para *PcCul2* de la posición 9 a la 405; el dominio de homología a cullina (conjunto de cuatro alfa hélices con 5 láminas β) se identificó en *PcCul* en las posiciones 611 a 762 y en *PcCul2* de la posición 511 a la 674. En el caso de *PcCul2*, se presenta el sitio de neddylación, en la posición 773-839 en relación a *PcCul1* donde no fue identificado (Figura 46).

Al analizar los genes de cullina en diferentes especies de *Plasmodium* se observó que todas ellas presentan dos genes relacionados a cullina. En *P. chabaudi*, las dos proteínas presentan una identidad del 17.2% entre ellas. Ambas secuencias de aminoácidos fueron alineadas con las secuencias de cullina de otras especies y se obtuvo un árbol filogenético para determinar cuál de ellas puede ser la proteína ortóloga a la cullina-1 de otros organismos y proponer su papel como componente del complejo SCF.

Se observó que todas las proteínas de *Plasmodium* ortólogas a *PcCul2* forman un *cluster* separado de las ortólogas a *PcCul-1*, el cual se separa por completo de las cullinas de otros organismos (Figura 45). Entre los miembros del género *Plasmodium*, *PcCul1* presenta un porcentaje de

identidad de hasta el 90% con la de *P. berghei* y del 51% con *P. falciparum*. En relación con PcCul2, esta proteína presenta una identidad del 99% con la de *P. berghei* y de hasta el 65% con *P. falciparum*. En comparación con otros organismos, la mayor identidad de PcCul1 fue con las Cullinas-4 de *H. sapiens* (19%) y *A. thaliana* (20%), mientras que para PcCul2 fue con la Cullina-1 de *H. sapiens* (21%) y *A. thaliana* (25.2%) (Figura 45). Razón por la cual, se realizó el modelamiento de la proteína Cul2.

Con lo anterior, se determinó si estructuralmente la proteína PcCul2 presentaba las mismas características que la cullina-1 de otros organismos. Se realizó el modelamiento en I-Tasser (C-Score=0.01) y se realizó una superposición con la proteína del humano. Es importante mencionar que el cristal disponible para hacer el comparativo es la cullina-1 del humano (pdb 1LDJ). En este caso se observó que hay una superposición completa de toda la molécula, con algunas diferencias en el tercer repetido de alfa hélices, en donde se observan dos alfa hélices más y un N-terminal en coiled-coil un poco mayor, en relación a la estructura cristalizada (Figura 47).

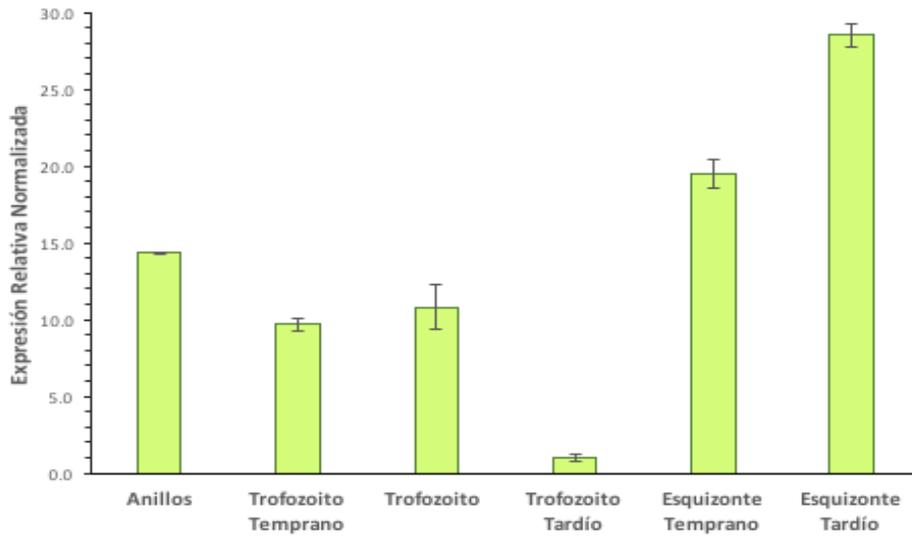


Figura 43. Expresión Relativa del gen similar a *cul1* en *P. chabaudi*. La expresión del mensajero del gen *Pccul1* (PCHAS_112810) se midió mediante qPCR en parásitos colectados a diferentes tiempos a lo largo del ciclo intraeritrocítico. Los experimentos se realizaron por triplicado con muestras biológicas independientes. Le expresión disminuye a partir de la fase de anillo y aumenta conforme inicia y progresa la esquizogonia.

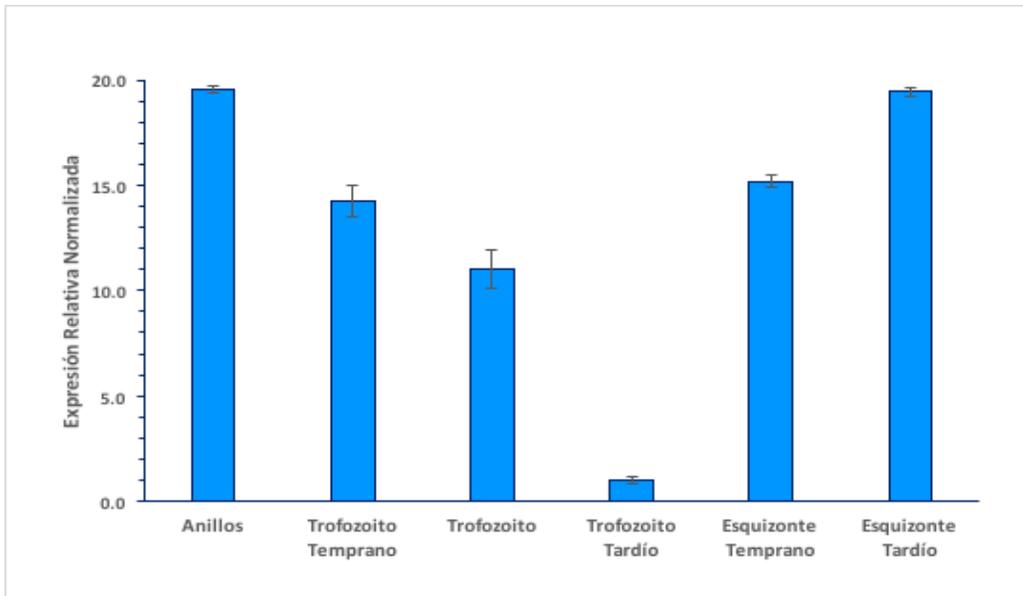


Figura 44. Expresión Relativa del gen similar a *cul2* en *P. chabaudi*. La expresión del mensajero del gen *Pccul2* (PCHAS_142830) se midió mediante qPCR en parásitos colectados a diferentes tiempos a lo largo del ciclo intraeritrocítico. Los experimentos se realizaron por triplicado con muestras biológicas independientes. La expresión disminuye a partir de la fase de anillo y aumenta conforme inicia y progresa la esquizogonia.

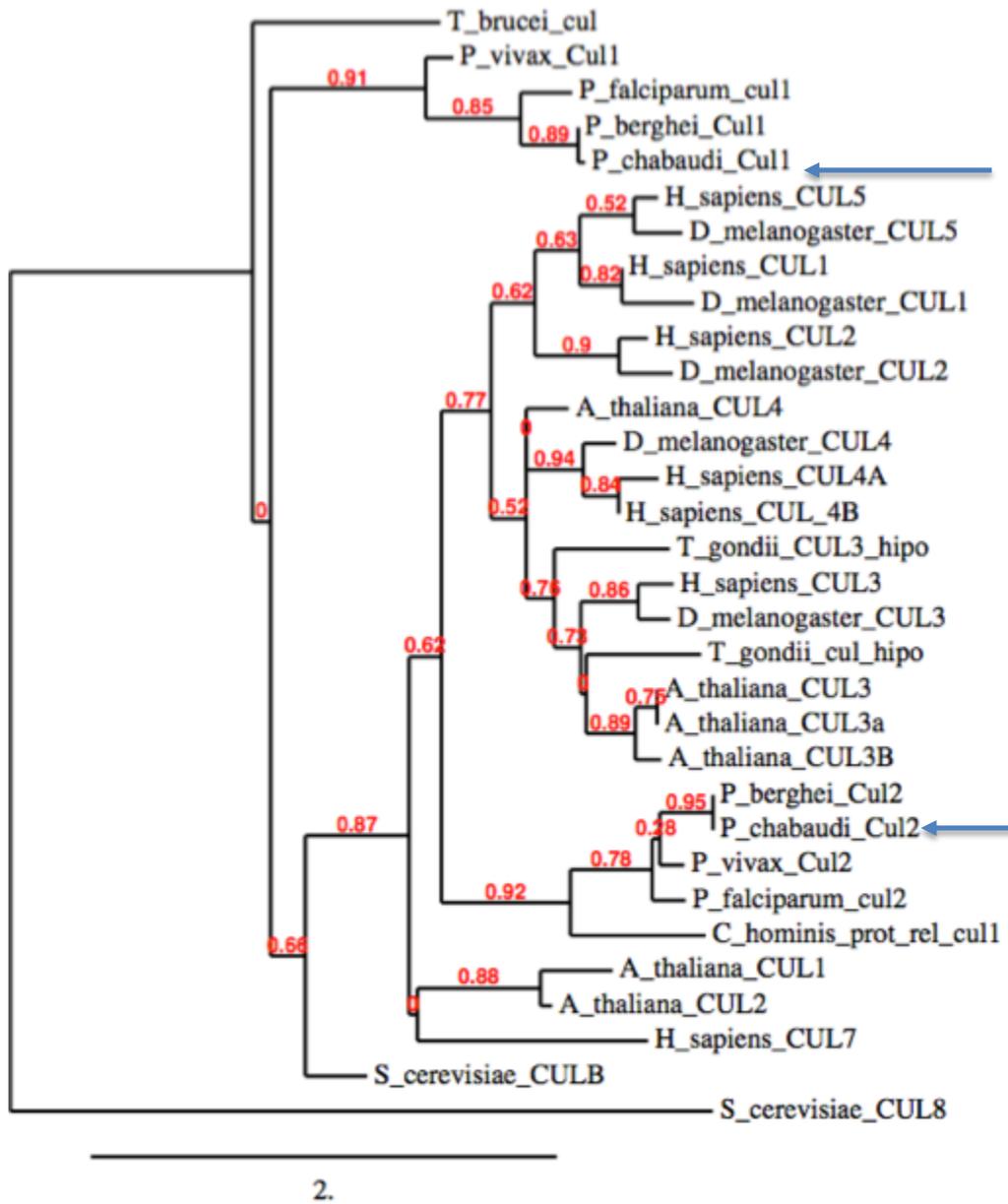


Figura 45. Árbol filogenético de las dos proteínas similares a Cullina en *P. chabaudi*. Se construyó un árbol filogenético utilizando el software “one click” accesible en la página phylogeny.fr. El software se basa en un estándar de máxima probabilidad (ML). En rojo se muestra la tasa de probabilidad (Likelihood Rate Test) para cada rama. Se observa que la proteína PcCul1 y PcCul2 están separadas en dos grupos. La proteína PcCul2, es la que se encuentra más relacionada con la Cullina 1 de *A. thaliana* y en general, con las cullinas de otros organismos. *H. sapiens* (Cul1- gi|32307161; Cul2- gi|1923243; Cul3- gi|4503165; Cul4A- gi|57165424; Cul4B- gi|759172900; Cul5- gi|40254446; Cul7- gi|41872646); *A. thaliana* (Cul1- gi|18411983; Cul2- gi|22329305; Cul3A- gi|15223361; Cul3B - gi|186494184; Cul4- gb|AAM14063.1) *S. cerevisiae* (CullinaB - gi|151943290; Cullina8 - gi|151945039); *D. melanogaster* (Cul1- gi|17647593; Cul2- gi|19921636; Cul3- gi|17737421; Cul4 - gi|24586500; Cul5- gi|24650935); *T. gondii* (Cul- gi|237831065; Cul3- gi|237836351); *C. hominis* (Cul- gi|67624711) *P. falciparum* (Cul1- gi|86171792; Cul2- gi|296004993) *P. vivax* (Cul1- gi|156101225; Cul2- gi|156103029); *P. berghei* (Cul1- gi|675227408; Cul2- gi|68073739); *P. chabaudi* (Cul1- gi|675221572; Cul2- gi|675223224) *T. brucei* (Cul- gi|72393101)

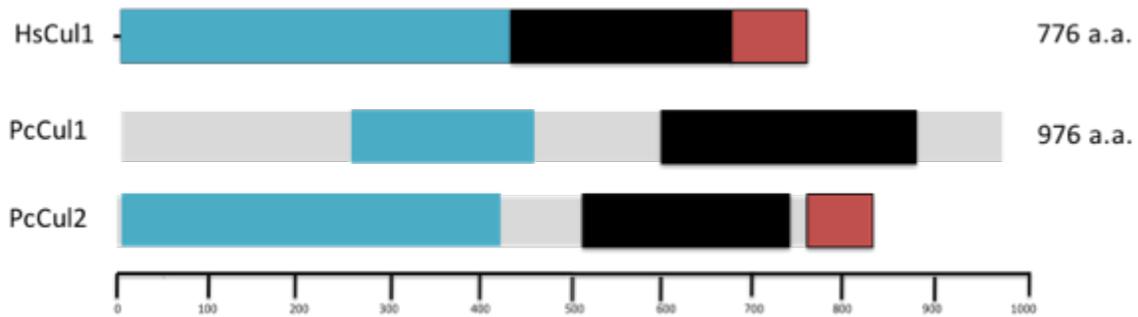


Figura 46. Dominios funcionales en las dos proteínas similares a Cullina en *P. chabaudi*. Comparativo de los dominios funcionales entre la Cullina-1 de humano y las dos anotadas en el parásito. En azul se muestra el dominio de repetidos de cullina, que son 3 repetidos de 4 alfa hélices; en negro se muestra el dominio de homología a cullina, que se compone de una región globular compuesta de α hélices y láminas β y es la región de interacción con la E3 ligasa; en rojo se muestra el dominio de neddylación de las cullinas.

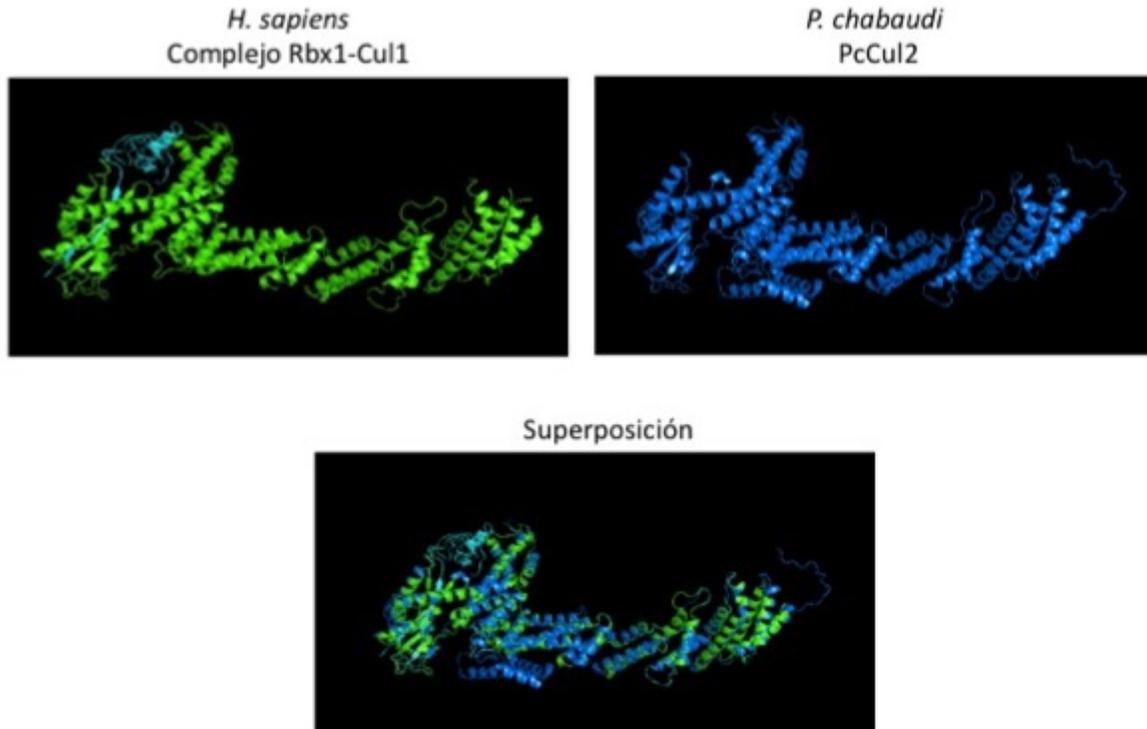


Figura 47. Estructura terciaria y superposición de la proteína similar a Cullina PcCul2 de *P. chabaudi*. Estructura terciaria de la proteína Cullina 1 (Cul-1) en *H. sapiens* (verde, código PDB 1LDJ) en asociación con la enzima E3 ligasa Rbx1 (azul claro) y la proteína modelada PcCul2 de *P. chabaudi* (en azul, modelo creado en I-TASSER, C-score=0.01). Se observa que ambas moléculas se superponen, con una diferencia en el tercer repetido de α hélices, el cual posee dos hélices extras en el caso de la proteína de *P. chabaudi*

11.5.3 Gen de *P. chabaudi* que codifica una molécula similar a la proteína de asociación a cinasa de fase S-1 (SKP-1)

Al igual que con las dos moléculas anteriores (Rbx-1 y Cul1 y Cul2), se buscó un gen que presentara una alta identidad con la molécula SKP-1 de *H. sapiens*. Se realizó psi-Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov) de la secuencia de *H. sapiens* con la base de datos de *Plasmodium* para identificar la secuencia con mayor identidad (E-score más bajo o cercano a cero) y se identificó el gen anotado con el gi|70953797. Con esta secuencia se realizó la búsqueda en plasmdb y se encontró la secuencia nombrada PCHAS_114240 (en adelante *PcSkp-1*). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 11, presenta 4 intrones y tiene una longitud de 991 bp. En su forma madura, el mRNA presenta una longitud de 489 bases (Figura 48). El cDNA fue clonado (489 pb) en el vector pGEM®-T easy y secuenciado. Al igual que en los casos anteriores, la secuencia fue idéntica a la anotada en plasmdb.org. A continuación se diseñó un juego de iniciadores para realizar la qRT-PCR del gen *PcSkp-1*, que amplificó un fragmento de 82 bp (Tabla 6). Los valores de expresión de este gen se normalizaron a los niveles del gen ribosomal 18S. Los resultados presentaron la misma tendencia observada con el gen *PcRbx1* donde se observa una mayor expresión en la fase de anillo en relación con la fase de trofozoíto temprano y un aumento progresivo desde el trofozoíto tardío a la fase de esquizonte (Figura 49).



Figura 48. Esquema del mRNA de *PcSkp1*. El mRNA de *PcSkp1* tiene una longitud de 489 bp. En azul se muestra la región clonada y secuenciada. En rojo se muestra la región amplificada para la qRT-PCR.

Tabla 6. Iniciadores para la qRT-PCR del gene similar a SKP-1 de *P. chabaudi*

Gen	Sentido	Antisentido	Posición en el mRNA	Tamaño del Amplificado
<i>PcSkp1</i>	ATGATTAATAATACACGATCTGA	TTAGGTTGTTGCCTTTTGAAT	1-489	489 bases
	TGGACATAAAGCCACTCTTGG	GCTCGAATTTCTTCCGTTGT	325-407	82 bases

Con base en los datos genómicos de la molécula *PcSkp1* se predijo una proteína de 162 aminoácidos, con un peso molecular de 19 kDa y un pI de 4.3. La secuencia presentó homología de

45% con la proteína de humano y del 99% con la de *P. berghei*. En el humano se conoce que para la formación del complejo Rbx-Cul1-Skp1, en Skp1 hay tres aminoácidos esenciales para la interacción con la cullina, los cuales identificamos en la secuencia de la proteína del parásito: la asparagina (N) 49 que en parásito ocupa la posición 47, asparagina (N) 108 que en el parásito es la 106 y la tirosina (Y) 109 que en el parásito corresponde a la posición 107 (Figura 50A). Al igual que en el humano, la molécula presenta un dominio BTB/POZ (dominio para interacción con otras proteínas en el extremo N-terminal, y un dominio SKP-1 de dimerización en el dominio C-terminal (Figura 50B).

Para PcSkp1 se modeló la estructura terciaria usando I-Tasser (C-Score=0.60), y se comparó con la del humano (pdb 2AST). Es importante mencionar que este caso, la estructura de Skp1 de humano está en complejo con Skp2-Cks1 (cadenas azul y rosa, respectivamente). Las moléculas Skp1 del humano y del parásito tuvieron una superposición completa, lo que apoya la hipótesis de que en el parásito se forme un complejo SCF (Figura 51).

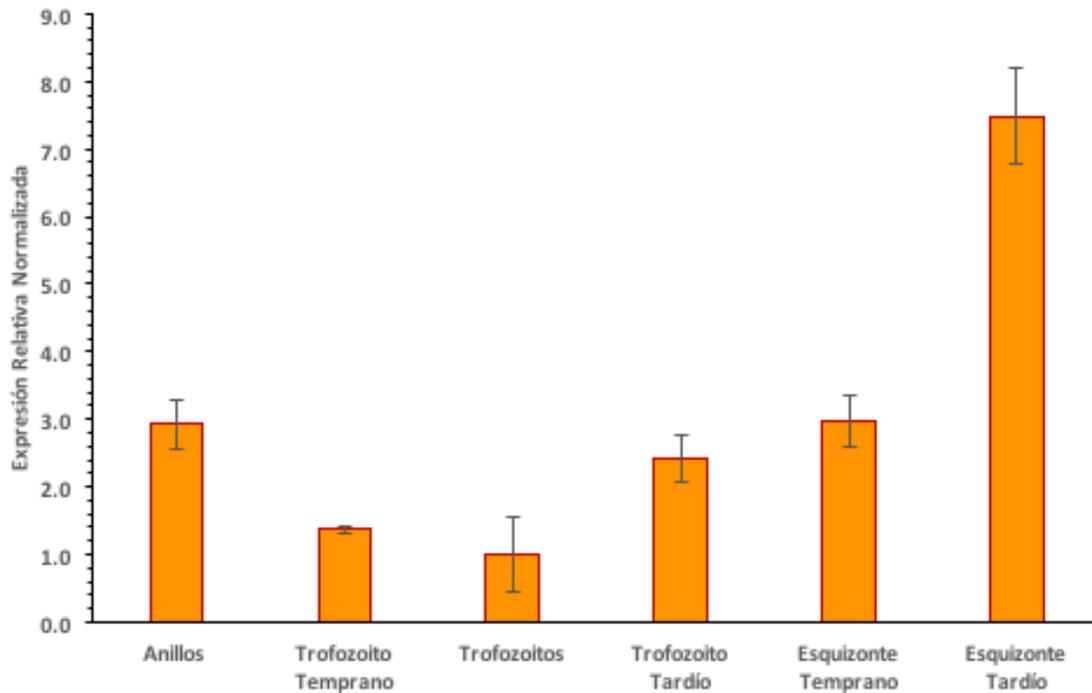


Figura 49. Expresión Relativa del gen similar a *Skp1* en *P. chabaudi*. La expresión del mensajero del gen *PcSkp1* (PCHAS_114240) se midió mediante qPCR en parásitos colectados a diferentes tiempos a lo largo del ciclo intraeritrocítico. Los experimentos se realizaron por triplicado con muestras biológicas independientes. La expresión disminuye a partir de la fase de anillo y aumenta conforme inicia y progresa la esquizogonia.

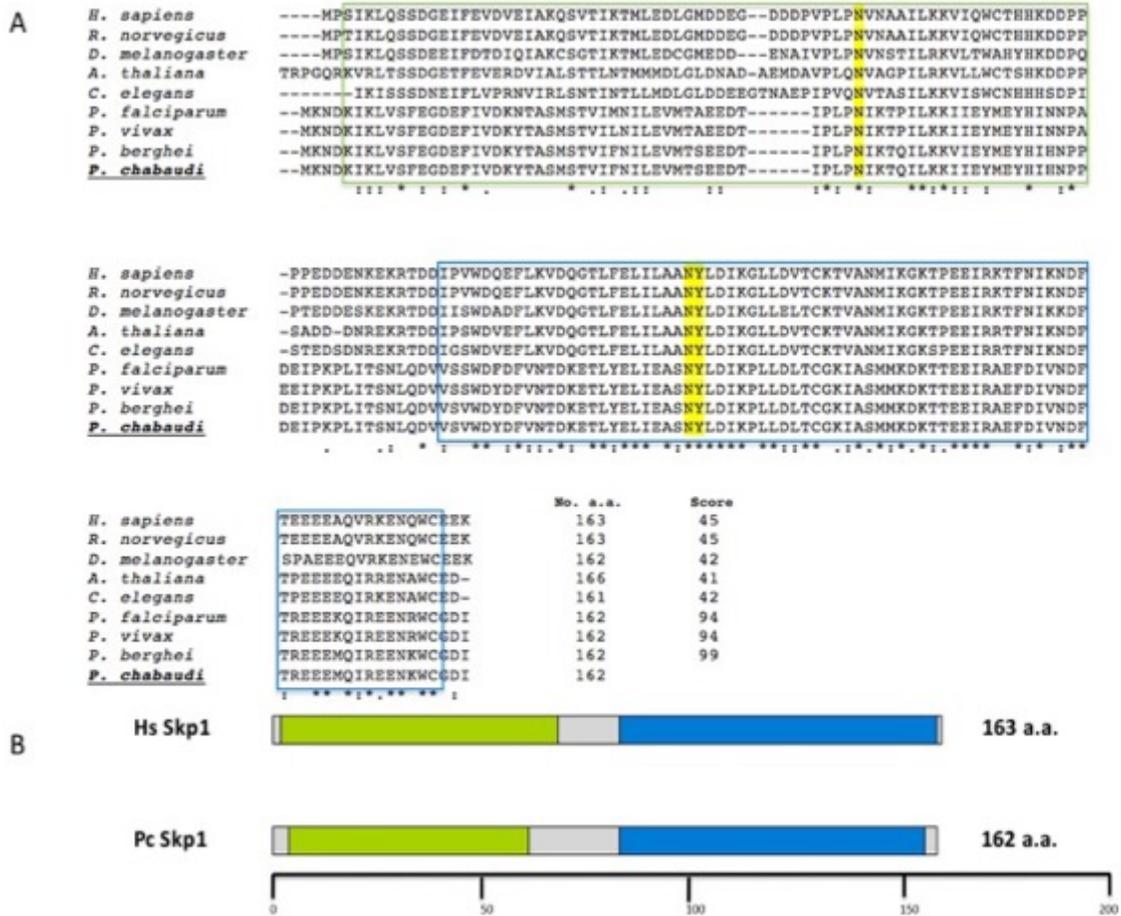


Figura 50. Análisis de la secuencia y dominios de Skp1 en *P. chabaudi*. **A)** Alineamiento en Clustal Omega de la proteína SKP1 en diferentes organismos evolutivamente divergentes: *H. sapiens* (P63208), *R. norvegicus* (Q6PEC4), *D. melanogaster* (O77430), *A. thaliana* (Q9C5T5), *C. elegans* (Q8WSZ9), *P. falciparum* (Q8ID38), *P. vivax* (A5K2S5), *P. berghei* (Q4YBE0), *P. chabaudi* (Q4XNP6). En amarillo, se muestran los aminoácidos conservados que interactúan con la proteína Cullina-1. **B)** Modelo de la estructura primaria de la proteína SKP1 en humanos (Hs Skp1) y en *P. chabaudi* (Pc Skp1). La longitud de la proteína de 163 y 162 aminoácidos para el humano y *P. chabaudi*, respectivamente. En verde se muestra el dominio BTB/POZ y en azul se muestra el dominio que corresponde al componente SKP1 (región de interacción con proteínas de caja F).

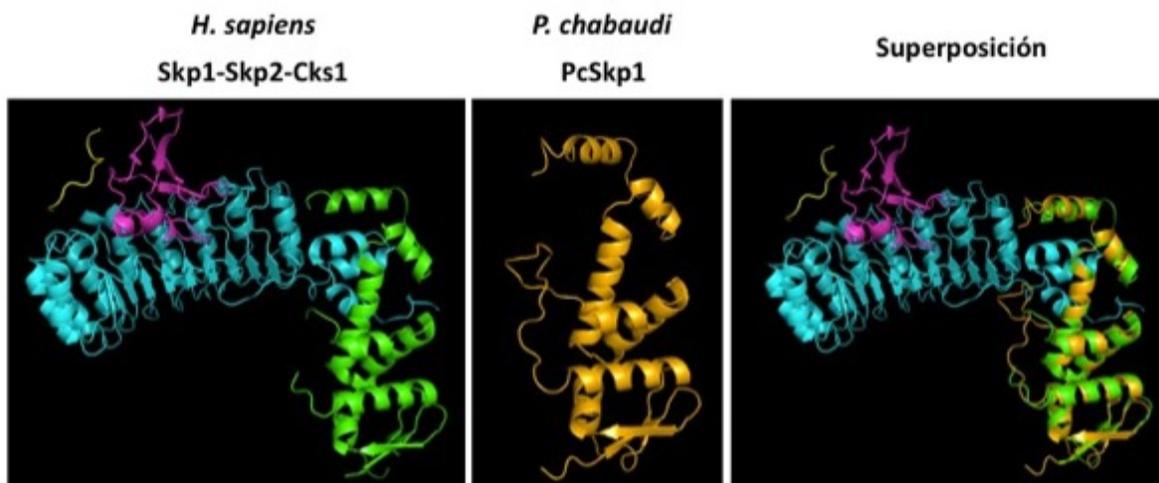


Figura 51. Estructura terciaria y superposición de la proteína similar a Skp1 en *P. chabaudi*. Estructura terciaria de la proteína Skp1 en *H. sapiens* (verde, código PDB 2AST) en asociación con las proteínas Skp2 (azul) y Cks1 (rosa) y la proteína modelada PcSkp1 de *P. chabaudi* (en naranja, I-TASSER, C-score=0.60). Se observa superposición de toda la molécula PcSKp1 (naranja) con la proteína del humano (verde).

11.5.4 Docking molecular entre las proteínas del complejo SCF en *P. chabaudi*

Debido a que no se tienen las moléculas cristalizadas, el docking molecular es una herramienta útil para tratar de establecer si las proteínas en un complejo podrían establecer interacciones. Para realizar este estudio, se utilizó el programa ClusPro en colaboración con el Dr. Fernando Favela, Departamento de Física, Cinvestav. El filtro de las estructuras involucra el uso de métodos de evaluación empírica de energía libre que seleccionan las conformaciones con la desolvatación y energías electrostáticas más bajas y por ende más estables. Los algoritmos de la interacción molecular evaluaron millones de complejos hipotéticos, reteniendo un número determinado con complementarios favorecidos por los resultados. El programa filtra a este conjunto de estructuras, seleccionando aquéllas con valores de energía electrostática y de desolvatación óptimos. Los complejos finales se visualizaron usando MacPyMOL v1.7.4.4.

De manera inicial, se modeló el acoplamiento de la cullina (PcCul2) como proteína receptora con rbx (PcRbx) como proteína ligando. En general los cuatro tipo de interacciones moleculares (Balanceada, favoreciendo fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas y van der Waals) se obtuvieron y se observó que el complejo Cul-Rbx no se forma como se ha mostrado en el humano (Zheng *et al.*, 2002) En el caso de *P. chabaudi*, la E3 ligasa Rbx1 ocupa la lámina β en el N-terminal para interactuar y establece enlaces de tipo van der Waals con tres cadenas α -hélice (S1-S3) en el C-terminal de la cullina 1 (Figura 52 A-C).

Los resultados anteriores fueron inesperados y crearon la interrogante de saber si la molécula candidato a ser la Rbx del parásito podía ser funcional y se decidió probar si ésta podía establecer una interacción con la cullina del humano y al contrario, si la cullina del parásito y la Rbx del humano podrían ensamblarse. De manera interesante, en este sistema *in silico* ambas combinaciones de moléculas establecieron interacción en los sitios esperados, esto es, el N-terminal de Rbx-1 de humano entra e interactúa con el dominio C-terminal de la cullina del parásito y la Rbx-1 del parásito con la cullina del humano (Figura 53 A-B).

En el caso del acoplamiento de la cullina -Skp-1 del parásito se observó que con tres tipos de energía (Balanceada y favoreciendo la energía electrostática e hidrofóbica) la proteína interactúa con el N-terminal de la cullina como sucede en el humano (Figura 54).

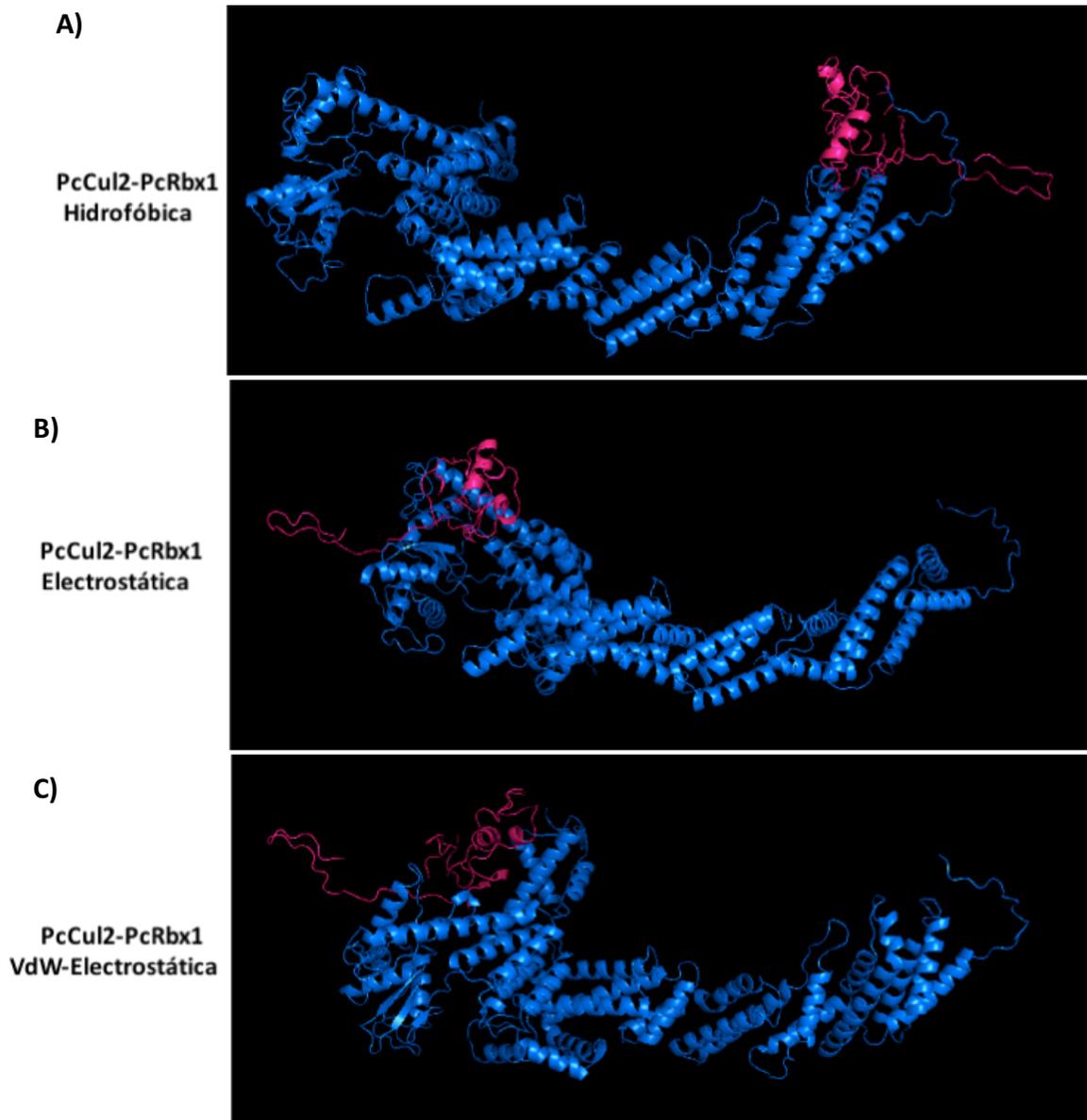


Figura 52. Acoplamiento de las proteínas Cullina (PcCul2) y Rbx1(PcRbx1) de *P. chabaudi*. Modelos de interacciones moleculares con la menor energía utilizando a la Cullina (en azul) como proteína receptora y PcRbx1 (en rosa) como proteína ligando. El modelo balanceado fue igual al encontrado con las fuerzas hidrofóbicas favorecidas (Modelo con menor energía=-1004.8) **A)** Se muestra el modelo de acoplamiento con fuerzas hidrofóbicas favorecidas (Menor energía = -1501.4) **B)** Se muestra el modelo de acoplamiento con fuerzas electrostáticas favorecidas (Modelo con menor energía= -1135.9) **C)** Se muestra el modelo de acoplamiento con fuerzas tipo van der Waals favorecidas (Modelo con menor energía=-217.1).

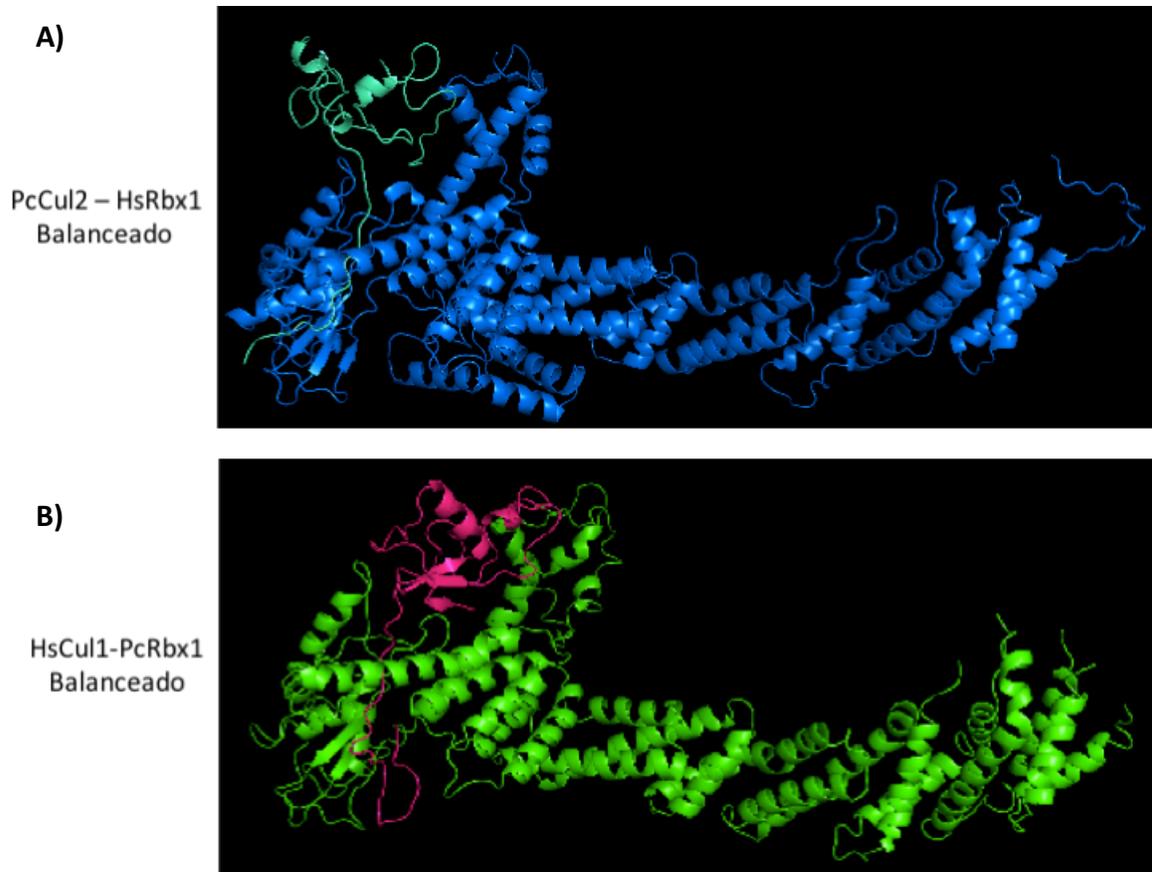


Figura 53. Acoplamiento de las proteínas Cullina y Rbx1 de *P. chabaudi* y *H. sapiens*. Modelos de interacciones moleculares con la menor energía utilizando a la Cullina como proteína receptora (en azul para PcCul2 y en verde para HsCul1) y Rbx1 (en cian para HsRbx1 y en rosa para PcRbx1) como proteína ligando. El modelo balanceado se utilizó como base **A)** Se muestra el modelo de acoplamiento balanceado entre PcCul2 y HsRbx1. **B)** Se muestra el modelo de acoplamiento balanceado entre HsCul1 y PcRbx1.

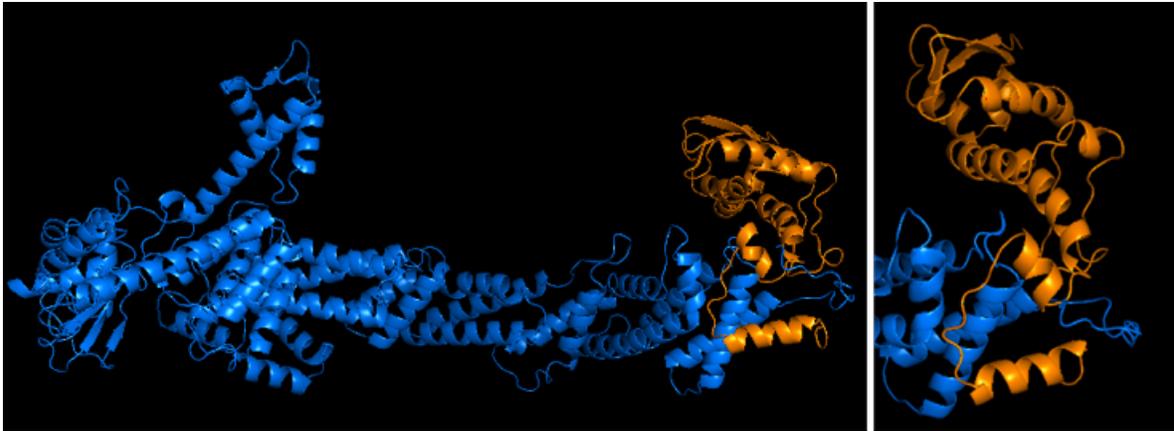


Figura 54. Acoplamiento de las proteínas Cul2 (PcCul2) y Skp1 (PcSkp1) de *P. chabaudi*. Modelos de interacciones moleculares con la menor energía utilizando a la Cullina como proteína receptora (en azul para PcCul2) y Skp1 (en naranja para PcSkp1) como proteína ligando. El modelo balanceado se utilizó como base (modelo con menor energía=-1044.1); sin embargo, con las energías electrostática (modelo con menor energía=-1069.1) e hidrofóbica (modelo con menor energía= -1452.0) se presenta el mismo modelo de acoplamiento.

11.6 Detección de la proteína similar a ubiquitina- Nedd8 durante el ciclo intraeritrocítico

Los anticuerpos disponibles comercialmente no fueron útiles para la identificación de las proteínas similares a cullina en el parásito, por lo que se utilizó la estrategia de identificar a la proteína similar a ubiquitina, Nedd8. Se tiene identificado que Nedd8 modifica principalmente a las cullinas por medio de un enlace covalente en un residuo de lisina conservado en el dominio de homología a cullina en el extremo C-terminal (Pan *et al.*, 2004). La Neddylación facilita el reclutamiento de las enzimas conjugadoras E2 cargadas con ubiquitina en el complejo proteico (Figura 7).

De manera inicial se identificó Nedd8 en el parásito con el número de acceso PCHAS_141330 (gi|70926539). La proteína sin procesar tiene una longitud de 78 aminoácidos y una vez procesada es de 76 aminoácidos, terminando al igual que la ubiquitina, con una secuencia Gly-Gly que es la que se une de manera covalente con sus proteínas blanco. Entre Nedd8 y la ubiquitina de *P. chabaudi* existe una identidad del 51%. Al realizar un comparativo de la secuencia de Nedd8 del parásito con la de otros organismos, ésta presentó identidad del 51% con la proteína del humano y del 95% y 100% con las secuencias de *P. falciparum* y *P. berghei*, respectivamente (Figura 55A y 55B).

Para estos experimentos, las proteínas fueron obtenidas en presencia de inhibidores de proteasas, fosfatasa y lactacistina, el cual es un inhibidor que se une de manera covalente a los grupos hidroxilo de las treonina endopeptidasas de la subunidad β del proteasoma. Los experimentos se realizaron por triplicado usando réplicas biológicas independientes. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo monoclonal que detecta a Nedd8 unido a las cullinas, así como Nedd8 libre. Se analizaron las proteínas de anillos, trofozoítos y esquizontes y como control positivo del anticuerpo se usaron proteínas de células de pulmón de ratón.

En experimentos de Western-blot en geles de una dimensión, en el control positivo (células de pulmón de ratón) se observó una proteína de aproximadamente 90 kDa, lo que corresponde al peso molecular esperado para la cullina neddylada y en el caso del parásito se observaron dos bandas en las tres fases del ciclo, una de aproximadamente 50 kDa y otra de 40 kDa (Figura 56).

Para realizar un análisis más fino de la proteína identificada se realizaron geles bidimensionales para identificar por medio de western-blot la proteína con la modificación postraduccional. En las tres fases (anillos, trofozoítos y esquizontes) se detectó una proteína de 55 kDa con un pI cercano a 10 (Figura 57). Este punto se escindió del gel y se analizó por espectrometría de masas. La proteína correspondió al factor de alargamiento 1 alfa (EF-1 α) como única proteína presente en el punto (Tabla 7). Además, se identificó que la proteína presenta la modificación postraduccional en siete sitios (Tabla 8). La identificación de estos sitios se presenta con los espectros masa carga de cada péptido con la modificación postraduccional (Figura 58A-G)



Figura 55. Alineamiento de la proteína similar a Ubiquitina Nedd8. A) Comparación de la secuencia de aminoácidos de Nedd8 y Ubiquitina en *P. chabaudi*. Entre estas secuencias existe un 51% de identidad. **B)** Comparación de la secuencia de aminoácidos de un rango evolutivo divergente de Nedd8. La identidad se muestra como porcentaje después del número de aminoácidos. Con asteriscos se muestran los residuos idénticos entre las secuencias; con dos puntos, aminoácidos con propiedades muy similares; con un punto se indican los aminoácidos con una baja similitud y las posiciones divergentes se indican con la ausencia de símbolos. En la caja verde se encierra el área reconocida por el anticuerpo (16 aminoácidos) y en la caja roja se muestra la terminación conservada (LRGG) en el C-terminal con la que se establecen los enlaces covalentes con los residuos de lisina. *H. sapiens* (Q15843); *R. norvegicus* (Q71UE8); *D. melanogaster* (Q9VJ33); *A. thaliana* (Q9SHE7); *P. falciparum* (Q8IEI4); *P. vivax* (A5JZB9); *P. berghei* (Q4Z2J6); *P. chabaudi* (Q4XJ22)

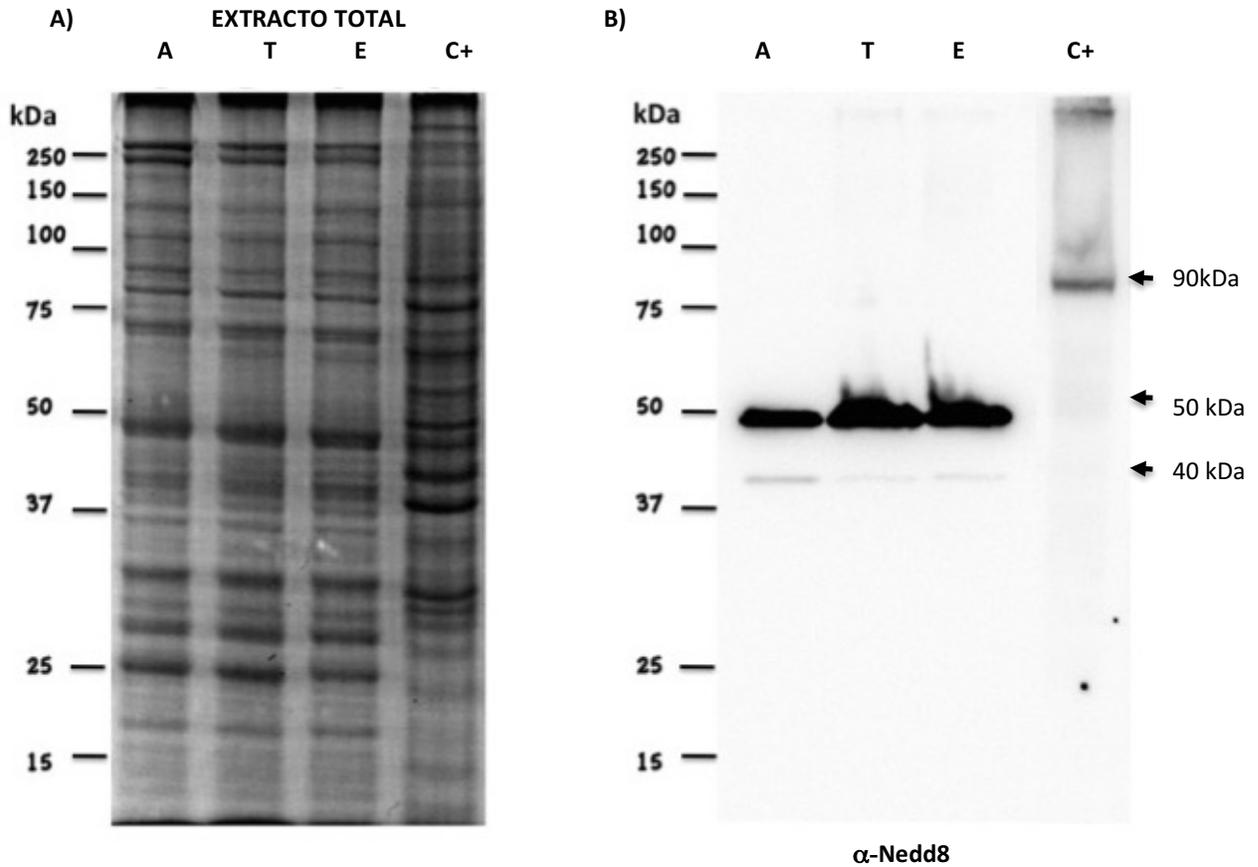


Figura 56. Presencia de Nedd8 en las fases intraeritrocíticas de *P. chabaudi*. A) PAGE-SDS al 12% con 30 μ g de muestra. El gel se tiñó con azul de Coommasie G-250 y una réplica técnica se transfirió para realizar la inmunodetección. B) Se observa una banda de aproximadamente 50 kDa y otra de aproximadamente 40 kDa en los carriles 1, 2 y 3 y en el caso del carril C se observa una banda de aproximadamente 90 kDa. Carriles: A. Anillos; T. Trofozoítos; E. Esquizontes; C+. Control, células de pulmón de ratón.

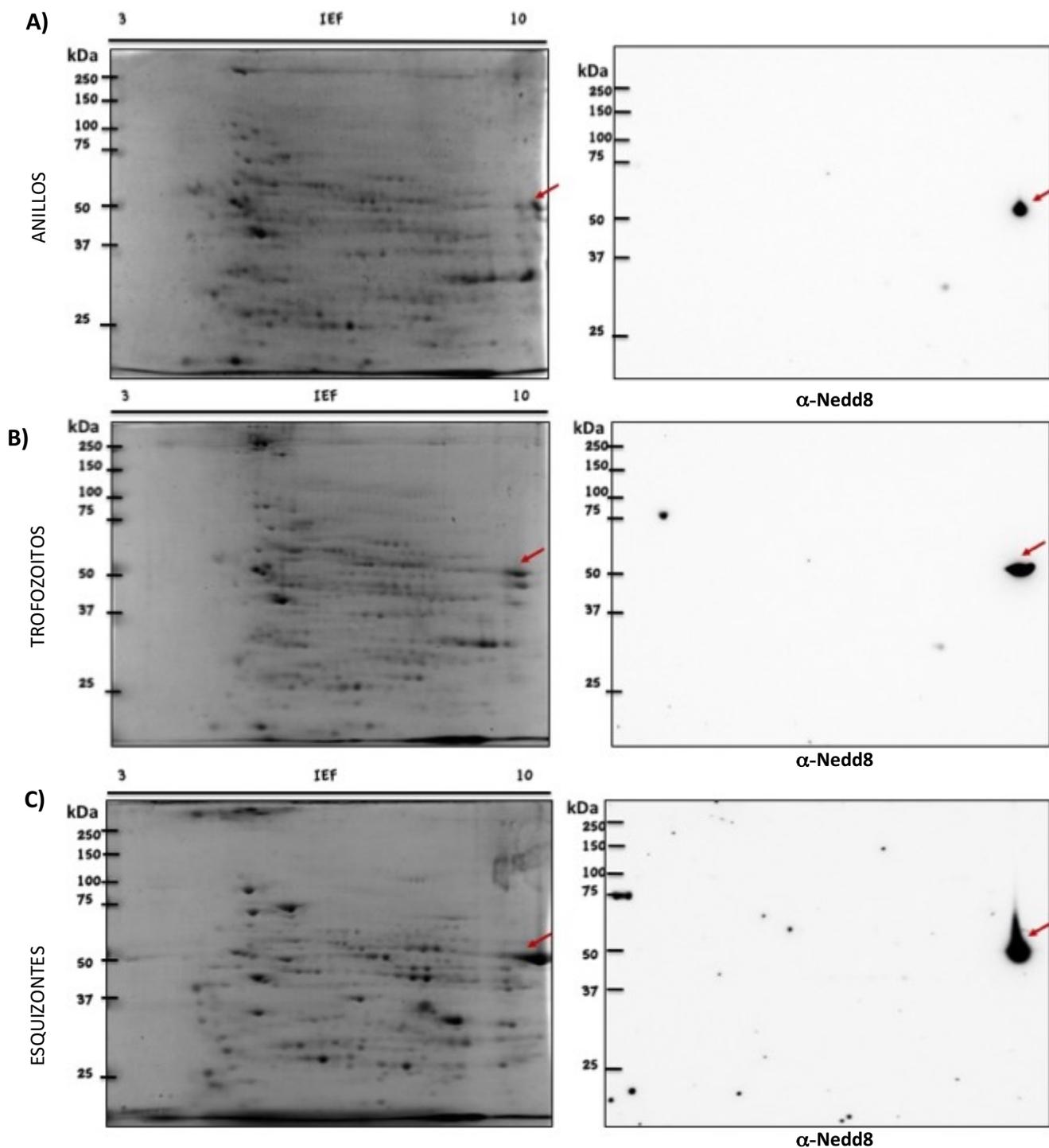


Figura 57. Presencia de una proteína neddylada a lo largo del ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*. Se realizaron geles bidimensionales con 125 μ g de muestra, en un rango de pI 3-10 NL y la segunda dimensión se realizó al 10%. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-250 (panel del lado izquierdo) y una réplica técnica se transfirió para realizar la inmunodetección (panel del lado derecho). Se identificó una proteína de aproximadamente 55 kDa con un pI cercano a 10 en A) Anillos; B) Trofozoitos; C) Esquizontes.

Tabla 7. Identificación por LC-MS/MS de la proteína de 55 kDa y pI 10 Neddylada aislada de esquizontes de *P. chabaudi*

ID Proteína	Número de Acceso (NCBI)	Proteína	Función	PM Teórico/ Exp ^a	PI Teórico ^b	% Covertura ^e	Conteo de Péptidos Único Total ^d
Q4Y7S9	gi 70951273	Factor de Elongación 1 alfa	Biosíntesis de proteínas	49/55	9.6	51 (226/443)	32

^a Masa Teórica/Experimental

^b pI Teórico reportado en ExPasy (www.expasy.org)

^c Covertura de la secuencia: porcentaje de aminoácidos de péptidos identificados en relación con la secuencia completa para cada proteína identificada.

^d La identificación peptídica fue aceptada si se podía establecer una probabilidad superior al 91% para lograr una Tasa de Descubrimiento Falsa (FDR) menor al 1% por el algoritmo FDR Local de Scaffold. Las identificaciones de proteínas se aceptaron si se podía establecer una probabilidad superior al 52% para lograr una FDR menor al 5.0% y que contenga al menos 2 péptidos identificados.

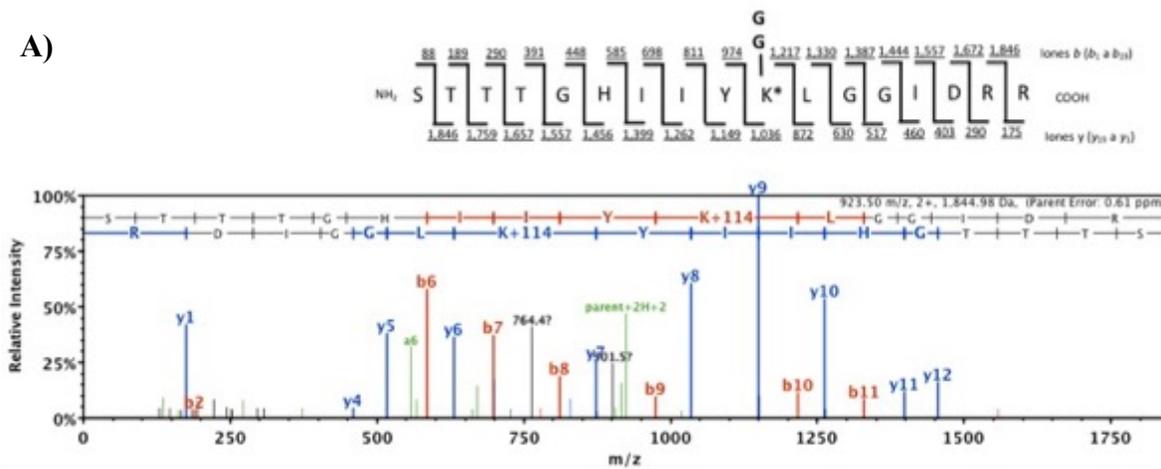
Tabla 8. Secuencias de péptidos donde se identificó el sitio de neddylación

	Secuencia ^a	XI-Tandem ^b	Posición
A	(K)STTTGHIYKLGIDR(R)	10.19	30
B	(K)YSEDRYEEIKK(E)	4.09	169
C	(K)EVKDYLKK(V)	1.77	173
D	(K)RPYDKPLR(I)	4.28	230
E	(R)IPLQGVYKIGGIGTVPVGR(V)	15.0	241
F	(K)AIKSGDSALVTLEPK(K)	3.77	381
G	(K)SVEKKEPGA VSAK(A)	10.77	429

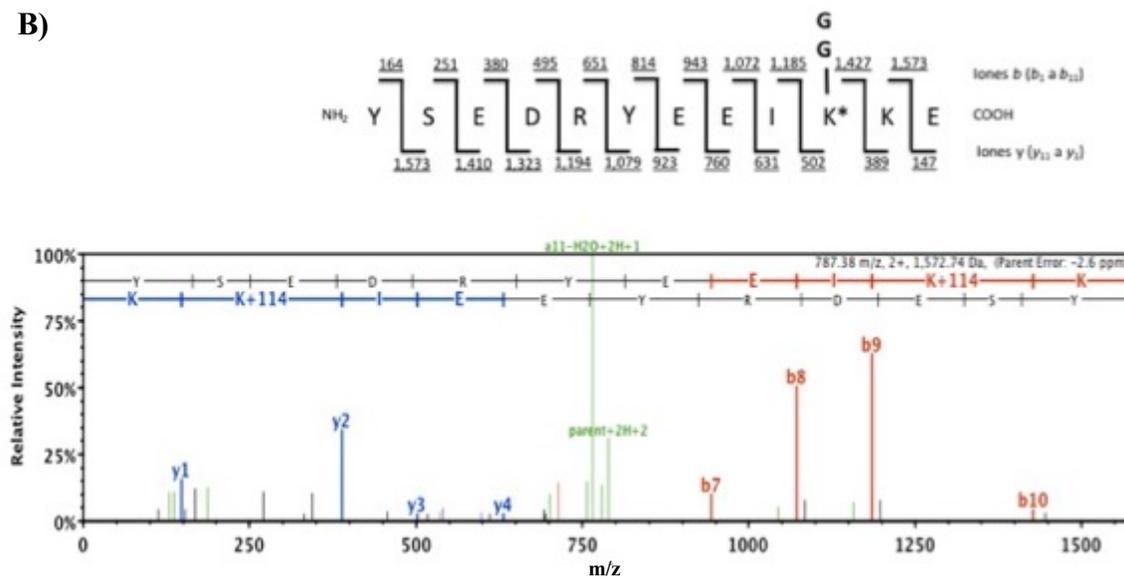
^a Secuencia peptídica obtenida a partir de los espectros masa carga

^b La identificación peptídica fue aceptada si se podía establecer una probabilidad superior al 91% para lograr una Tasa de Descubrimiento Falsa (FDR) menor al 1% por el algoritmo FDR Local de Scaffold. Las identificaciones con XI-Tandem requirieron al menos scores $-\text{Log}(\text{Scores Esperados})$ superiores a 1.5

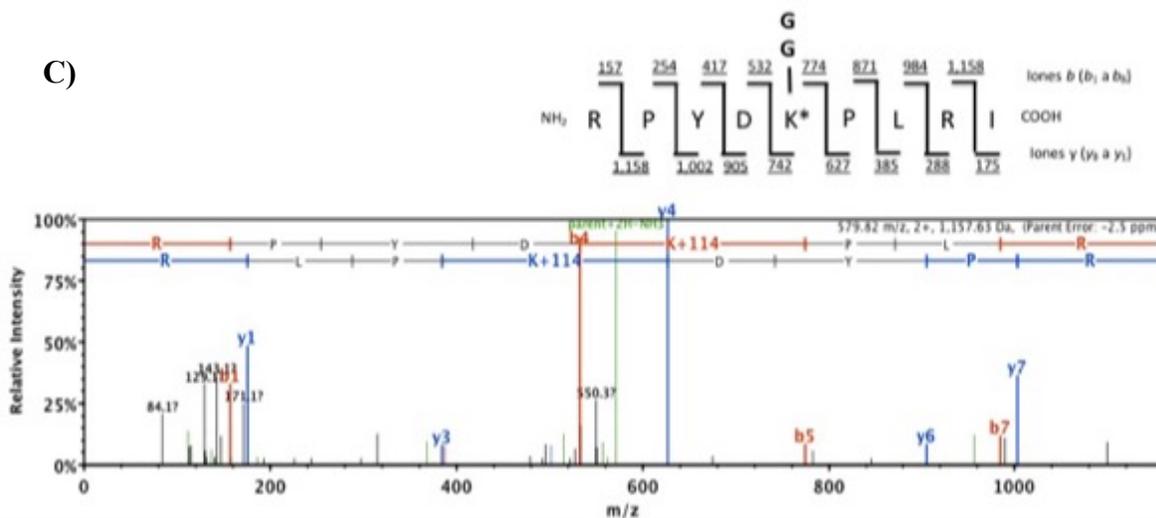
A)



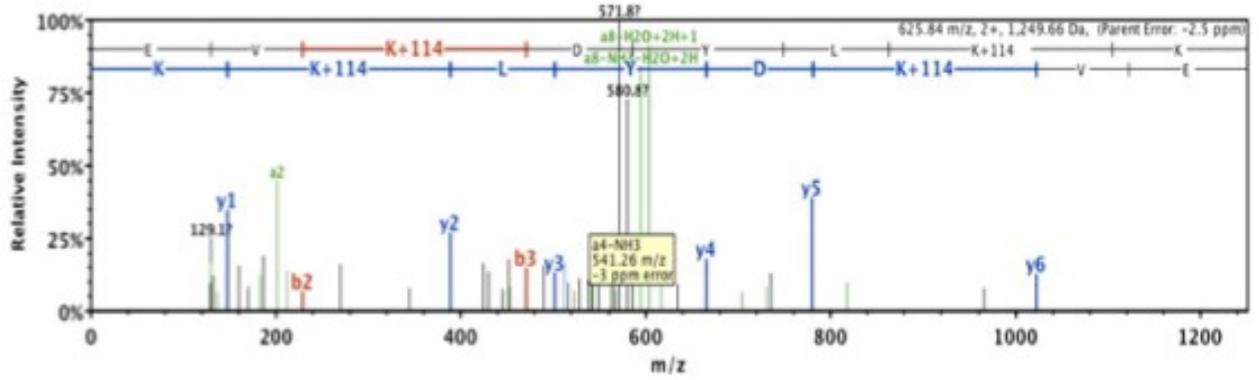
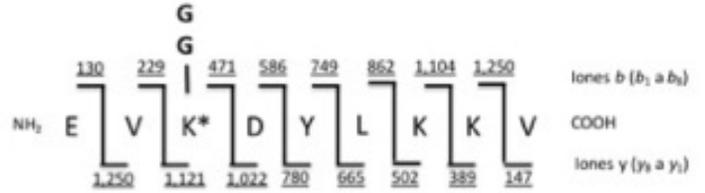
B)



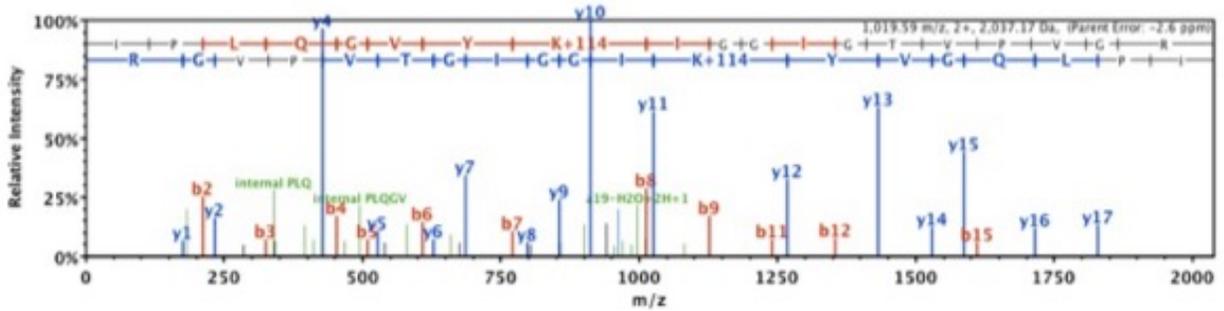
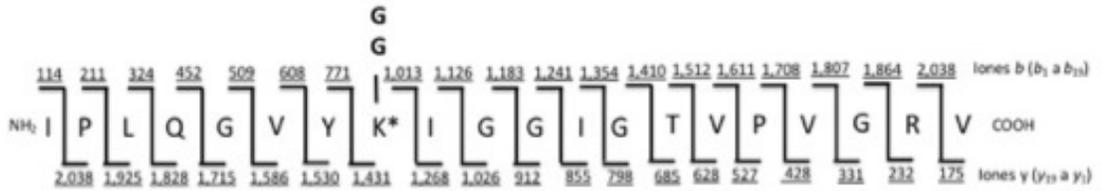
C)



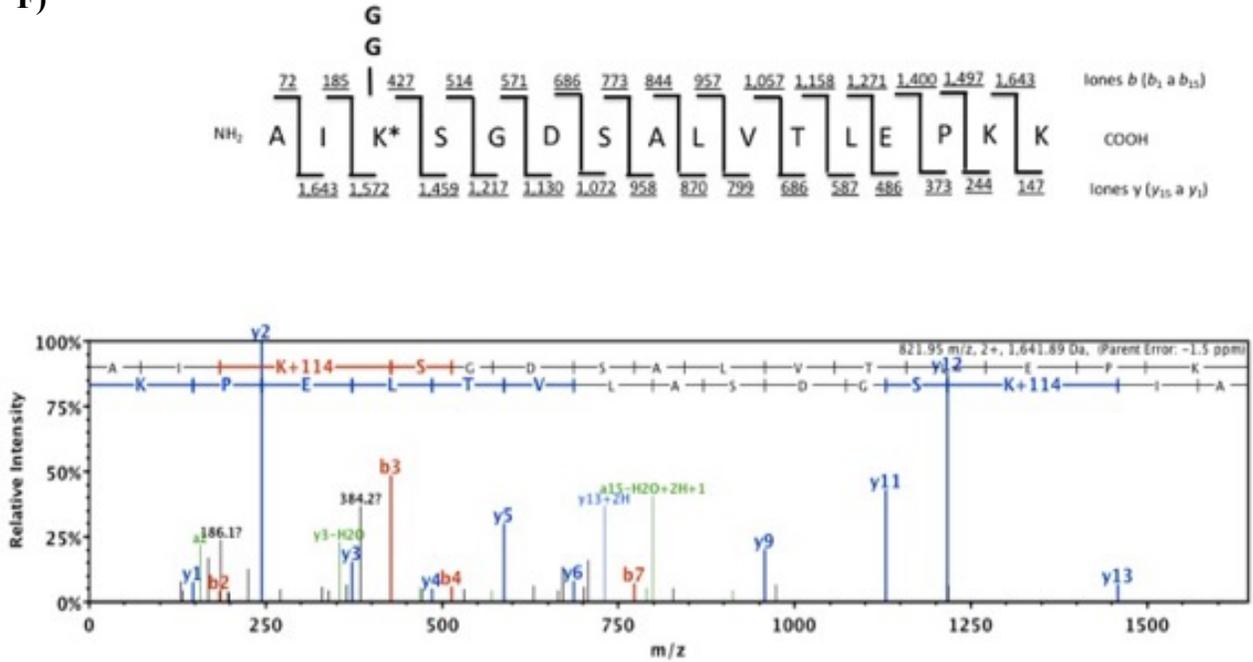
D)



E)



F)



G)

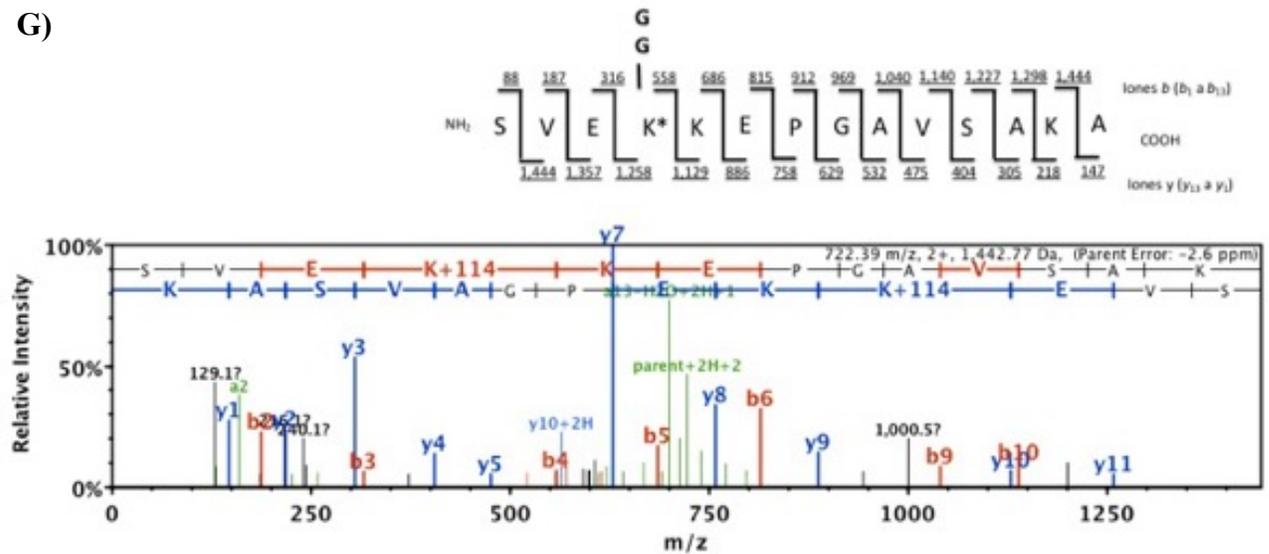


Figura 58. Identificación por LC- MS/MS del sitio de neddylación por de la proteína de 55kDa aislada de esquizontes de *P. chabaudi*. A-G) Al igual que la ubiquitina, después de la digestión con tripsina, el péptido que contiene la modificación postraduccional tiene un remanente de diglicina unido de manera covalente al residuo de lisina que es resistente a la proteólisis con tripsina. En cada figura se muestra la secuencia del péptido producido por la proteólisis con tripsina con las masas de los iones (iones tipo b y tipo y) con la modificación de diglicina. Además, se muestra el patrón de fragmentación (espectro MS/MS) adquirido para la construcción de la secuencia peptídica.

XII. Discusión

12.1 Ubiquitina

La ubiquitinación es un mecanismo importante para regular muchos aspectos de la fisiología celular. Las proteínas sustrato pueden ser modificadas con una sola ubiquitina en uno (monoubiquitinación) o múltiples sitios (multi-monoubiquitinación). En otros casos, a los sustratos se les añade una cadena de monómeros de ubiquitina (poliubiquitinación) unidos entre sí a través de uno de los siete residuos de lisina de una ubiquitina y el amino terminal de otra ubiquitina (Figura 9) (Ye and Rape, 2009).

La ubiquitina se sintetiza típicamente como una proteína de fusión que se procesa cotraduccionalmente en su forma madura (Kerscher *et al.*, 2006). En mamíferos, la ubiquitina se obtiene a partir de cuatro genes, dos de éstos contienen repetidos en tándem (genes de poliubiquitina) o una sola copia que se conjuga a una extensión en el carboxilo terminal de proteínas ribosomales (genes de fusión). En general, en el genoma de un organismo eucarionte típico se codifican los dos genes de fusión de ubiquitina y al menos uno de poliubiquitina. En *Plasmodium* sp. se identificó que, entre las especies del parásito cuyos genomas están secuenciados, se presentan tres genes de ubiquitina, uno de poliubiquitina y dos fusionados a proteínas ribosomales (S27a y L40).

El gen de poliubiquitina en *Plasmodium* presenta características similares al gen de poliubiquitina UbC en humanos. Estructuralmente, el gen UbC presenta un intrón en el extremo 5', no existen secuencias espaciadoras entre cada repetido de ubiquitina y su expresión se induce en respuesta a varios estímulos celulares, principalmente estrés (Radici, 2013). En el caso de *Plasmodium* sp. existen dos exones codificantes, a diferencia del humano o plantas donde existe un primer exón no codificante en la región no traducida del extremo 5' (5'-UTR). Este primer exón en *Plasmodium* sp. es bastante conservado y en todos los casos presenta una longitud de 28 bp, la región intrónica en todos los casos tiene un tamaño variable y los sitios donador y aceptor para el "splicing" son conservados en las distintas especies del parásito. El hecho de que el intrón en el gen de la poliubiquitina este conservado en esa posición en diferentes especies se podría relacionar con el aumento en su expresión mediante un mecanismo denominado potenciamiento mediado por intrón "intron-mediated enhancement" (IME) (Gallegos and Rose, 2015). Las dos vías principales

propuestas para que los intrones aumenten los niveles de transcripción son: actuar como potenciadores transcripcionales o como promotores alternativos, dependiendo de los elementos en *cis* que se encuentren localizados dentro de la secuencia que abarca el intrón. En el caso de la ubiquitina, se ha identificado que la región del intrón en el gen de poliubiquitina UbC del humano tiene elementos en *cis* cruciales para la transcripción del gen y que algunos de estos sitios corresponden a secuencias para la unión del factor de transcripción YY1 (Bianchi *et al.*, 2013, Bianchi *et al.*, 2009).

Por otra parte, el número de repetidos en el gen de la poliubiquitina varía entre las especies de *Plasmodium*, va de tres para *P. berghei* y hasta cinco en el caso de *P. falciparum*. En comparación, en los primates los genes de poliubiquitina UbB presentan un número de repetidos constante (tres) mientras que el gen UbC presenta heterogeneidad entre las especies. Lo anterior podría estar relacionado con el hecho de que el aumento en la cantidad de ubiquitina producida parecería ser ventajoso, especialmente en condiciones de estrés, dado que se podría producir mayor cantidad de ubiquitina (Tachikui *et al.*, 2003).

Nosotros identificamos en *P. chabaudi* que el proceso de ubiquitinación está presente a lo largo del ciclo intraeritrocítico con una mayor abundancia durante la fase de esquizonte. Estudios de Northern-blot realizados en *P. falciparum* mostraron que el gen se expresa a lo largo del ciclo intraeritrocítico y aumenta la cantidad de transcritos de manera importante al final de la fase de trofozoito hasta el esquizonte temprano. También se observó que el gen no sólo se regula en el desarrollo del parásito sino que también es inducible por estrés térmico (Horrocks and Newbold, 2000). Durante el choque térmico, los niveles del polipéptido aumentan dramáticamente sin un aumento significativo en el estado estacionario de los niveles de transcrito. Estas dos observaciones sugieren que mientras la regulación en el desarrollo se mantiene principalmente a nivel transcripcional, la respuesta a choque térmico parece estar mantenida a nivel traduccional (Horrocks and Newbold, 2000).

La secuencia peptídica de los monómeros de ubiquitina es altamente conservada con la de otros organismos, en hasta el 98% con la secuencia de *H. sapiens* y entre las especies de *Plasmodium* hay una identidad de hasta el 100% entre *P. berghei* y *P. falciparum*. La secuencia de la ubiquitina presenta siete lisinas, en las posiciones 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63 similar a lo que se observa en

otros organismos, por lo que se predice que podrían ser utilizadas para formar cadenas de ubiquitina. Igualmente, a nivel de estructura terciaria, esta molécula presenta la estructura típica de las ubiquitinas, con un pliegue compacto de láminas β y un carboxilo terminal de seis residuos (Figura 6) de tal manera que su imagen se superpone a la del humano incluyendo la localización de las siete lisinas responsables para la formación de cadenas de poliubiquitina por lo que los anticuerpos disponibles comercialmente se probaron para la identificación de las ubiquitinas (mono y poliubiquitina) y aquella que forma cadenas utilizando a la lisina 48 (Lys-48). La poliubiquitinación homotípica (con un solo tipo de enlace, es decir, enlace a una lisina en la misma posición) Lys-48 es una de las más estudiadas en los sistemas eucariontes debido a su abundancia y su relación con la degradación por medio del complejo 26S proteasoma (degradación dependiente de ubiquitina) (Kulathu and Komander, 2012) .

En *Plasmodium sp.* el estudiar la ubiquitina y ubiquitinación es particularmente importante debido, por una parte a que dado el aumento de la resistencia a los antimaláricos existentes este proceso puede proponerse como un blanco farmacológico y, por otra, a que se ha demostrado que los fármacos antimaláricos más recientemente desarrollados como la curcumina y artemisina, interfieren con el sistema de degradación vía proteasoma (Hamilton *et al.*, 2014, Neto *et al.*, 2013). En este trabajo, se describe el comportamiento de la ubiquitina durante el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi* y se observó un aumento conforme el parásito se desarrolla de forma similar al único antecedente reportado para *P. falciparum* (Horrocks and Newbold, 2000). Con los resultados obtenidos para identificar a proteínas mono- y poliubiquitinadas, así como las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas mediante ensayos de citometría de flujo como de microscopía confocal, se confirmó que la ubiquitina está presente durante todo el ciclo intraeritrocítico y que ésta presenta una tendencia de aumento conforme el ciclo intraeritrocítico progresó. Este comportamiento en la expresión de la ubiquitina es diferente con respecto a la de otros organismos, ya que típicamente las células mantienen una expresión constitutiva y en condiciones de estrés, como acidosis metabólica, cáncer, sepsis o diabetes aguda, las células tienden a aumentar tanto la expresión del gen de poliubiquitina como la conjugación a proteínas (Price, 2003, Shang and Taylor, 2011). En el caso del parásito, el aumento progresivo de la ubiquitina podría estar relacionado con los cambios en su metabolismo y la disminución de las principales macromoléculas al final del ciclo.

12.2 Proteínas Ubiquitinadas

En este trabajo también se identificaron mediante las técnicas de electroforesis (en una y dos dimensiones) e inmunodetección por medio de Western-blot las proteínas que se modifican con mono y poliubiquitina y las modificadas con poliubiquitina en Lys-48. Las proteínas se obtuvieron en presencia de los inhibidores de desubiquitininas (DUBs) N-etilmaleimida (NEM) y lactacistina para preservar la modificación con ubiquitina. Las DUBs tienen un residuo de cisteína en su sitio activo que es esencial para su actividad catalítica y puede ser bloqueada por NEM que es un agente alquilante de sulfhidrilo. La lactacistina es un inhibidor de la subunidad β del proteasoma, el cual es uno de los inhibidores de proteasoma más específicos y en *P. falciparum* y *P. berghei* se había probado que inhibe el desarrollo durante los ciclo intra- y exoeritrocítico (esporozoitos) (Gantt *et al.*, 1998, Aminake *et al.*, 2012). Lo anterior aseguró la identificación de proteínas ubiquitinadas en las diferentes fases del ciclo.

Al analizar las proteínas totales de los parásitos por PAGE-SDS, el patrón electroforético fue similar entre las diferentes fases sin embargo, al analizar por WB con un anticuerpo que reconoce proteínas mono y poliubiquitinadas, se observaron algunas diferencias. En todos los casos se observaron 7 bandas (30, 40, 50, 60, 65, 120 y 170 kDa) pero las bandas de 120, 50 y 40 kDa presentaron diferencias entre los estadios. La banda de 120 kDa aumentó su intensidad en el esquizonte temprano y disminuyó en la de esquizonte tardío. En el caso de la banda de 50 kDa, presentó una intensidad basal en los trofozoitos que aumentó en el esquizonte temprano e incrementó aún más en el esquizonte tardío. Finalmente, la banda de 40 kDa disminuyó su intensidad en el esquizonte tardío. Lo anterior sugiere que el parásito presenta diferencias de ubiquitinación a lo largo del ciclo intraeritrocítico.

Dado que las fases de anillo, trofozoíto temprano y esquizonte tardío presentaron las diferencias más marcadas en ubiquitinación, éstas se analizaron por WB en geles bidimensionales con un rango de pH de 3 a 10. La mayor cantidad de proteínas se encontró entre 100 y 25 kDa en todos los casos y se observaron diferencias en abundancia de algunas proteínas sobre 30 y 70 kDa. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce proteínas mono y poliubiquitinadas (Lys²⁹, Lys⁴⁸, Lys⁶³) y un anticuerpo monoclonal que reconoce sólo proteínas poliubiquitinadas en Lys-48 (Figura 9) los cuales fueron utilizados por separado. El realizar el Western-blot con dos anticuerpos que reconocen proteínas ubiquitinadas con diferentes tipos de

cadena o diferentes tipos de ubiquitinación nos permitió, por una parte, tener un panorama general de las proteínas ubiquitinadas a lo largo del ciclo (mono y poliubiquitinación) y por otra, identificar aquellas que son destruidas por medio del complejo del proteasoma (poliubiquitinación en Lys-48).

Tanto en anillos, trofozoítos y esquizontes se identificaron proteínas mono y poliubiquitinadas y en acuerdo con los experimentos anteriores, fueron menos abundantes en la fase de anillos (19 proteínas), seguida por la de trofozoítos (22 proteínas) y considerablemente más abundantes en la fase de esquizonte (35 proteínas). De esta población de proteínas mono o poliubiquitinadas (que incluye a las ubiquitinadas en Lys-48), las que presentaron poliubiquitinación en Lys-48 tuvieron este mismo comportamiento, se identificaron para los anillos 7 proteínas, para los trofozoítos 9 y para los esquizontes 30 proteínas. El número (abundancia), proteína y tipo de ubiquitinación, en general, fue diferente a lo largo del ciclo, aunque hubo proteínas que se identificaron como ubiquitinadas en más de una fase. Lo anterior, nuevamente sugiere que durante la fase de esquizonte es en donde se encuentra una mayor ubiquitinación relacionada a la degradación de proteínas.

Durante las fases de anillo y trofozoito encontramos que hay más proteínas ubiquitinadas que no corresponden a un tipo de ubiquitinación homotípica en Lys-48, es decir, las proteínas que se identifican con mono- y poliubiquitina son más que las identificadas exclusivamente con el anticuerpo anti- Lys-48. El hecho de que se presenten otros tipos de ubiquitinación en las fases iniciales del ciclo estaría relacionado con el crecimiento y desarrollo del parásito en el eritrocito, lo que es más evidente en la fase de trofozoito donde se observan más proteínas con diferente tipo de ubiquitinación a la de Lys-48. En otros sistemas, otros tipos de ubiquitinación están relacionados con la expresión génica, reparación del DNA, endocitosis, transducción de señales, activación de cinasas, entre otras. En todos los organismos estudiados hasta la fecha, la ubiquitinación en Lys-48 está íntimamente relacionada a la degradación, principalmente por el complejo del 26S proteasoma (Sadowski *et al.*, 2012).

En el caso del esquizonte, la mayor parte de las proteínas identificadas presenta poliubiquitinación en Lys-48, lo que podría significar que estas proteínas tienen que ser degradadas debido a que el parásito por una parte, disminuye considerable su metabolismo y por otra tiene que prepararse

para salir de la célula hospedera. Esto es comparable con los estudios del ciclo intraeritrocítico en *P. falciparum*, donde en las fases de anillo y trofozoíto hay un aumento paulatino en la abundancia de proteínas, RNA e inicia la replicación del DNA, para la fase de esquizonte estas tres principales macromoléculas disminuyen en abundancia antes de la liberación de merozoítos (Arnot and Gull, 1998, van Dooren *et al.*, 2005).

Las proteínas identificadas por espectrometría de masas fueron aquellas que presentaron reconocimiento por el anticuerpo anti- poliubiquitinación en Lys-48 durante el ciclo intraeritrocítico (anillos, trofozoítos y esquizontes). Esta selección se hizo debido a que la ubiquitinación en Lys-48 es el tipo de poliubiquitinación canónico, más abundante y más estudiado en otros sistemas y existe clara evidencia de su relación con la degradación vía complejo 26S proteasoma (Trempe, 2011, Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2013). Además, en *P. falciparum* y *P. berghei*, los trabajos con inhibidores de proteasoma, ha mostrado la importancia de la actividad de éste para el progreso del ciclo intraeritrocítico y exoeritrocítico (Gantt *et al.*, 1998, Lindenthal *et al.*, 2005).

En la fase de anillo se identificaron por espectrometría de masas únicamente tres proteínas (actina, factor de alargamiento 1 alfa y una proteína hipotética). Para la fase de trofozoíto se identificaron cinco proteínas (cinasa de ser/thr, dos correspondieron a gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y dos a factor de alargamiento 1 alfa). En el caso del esquizonte, se lograron identificar por espectrometría de masas 20 proteínas, donde siete estuvieron relacionados al metabolismo y plegamiento de proteínas (proteínas de choque térmico, factor de alargamiento 1 alfa, complejo T, factor de iniciación eucarionte 4A), seis con el metabolismo y replicación de ácidos nucleicos (uridina fosforilasa, hipoxantina guanina xantina fosforibolsittransferasa, inosina-5-monofosfato deshidrogenasa) y tres con glucólisis (piruvato cinasa, hexocinasa, fosfoglicerato cinasa).

La actina puede sufrir diferentes modificaciones postraduccionales tales como fosforilación metilación, oxidación y ubiquitinación, entre otras. La actina puede mono o poliubiquitinarse. En el caso de mamíferos se ha identificado que la actina puede ser ubiquitinada por ligasas específicas como MuRF1, UbcH5 y Trim32 y este tipo de ubiquitinación está relacionada con la disminución en los niveles de actina en músculo en remodelación y atrofia (Terman and Kashina,

2013). Además, otras modificaciones postraduccionales de la actina, como la arginilación (la adición de arginina al N-terminal de las proteínas mediante una arginiltransferasa) están relacionadas con la degradación de la actina vía proteasoma (Zhang *et al.*, 2010). En *Plasmodium* se han descrito dos genes de actina, la actina-II que se presenta sólo en las fases sexuales (Hliscs *et al.*, 2015) y actina-I que se transcribe durante todo el ciclo de vida del parásito y en dos trabajos se ha reportado ubiquitinada tanto durante la fase de merozoítos (Field *et al.*, 1993) y como durante todo el ciclo intraeritrocítico (Ponts *et al.*, 2008). Nosotros encontramos la actina-I ubiquitinada durante las fases de anillo y esquizonte. La ubiquitinación en estas dos fases podría deberse a que en la primera ocurre la invasión y restructuración del citoesqueleto al tiempo que el parásito entra al eritrocito y en la segunda, a que durante la maduración se restructura el citoesqueleto para la formación de nuevas células y liberación de nuevas formas infectivas.

Otra proteína que se identificó en este trabajo en varias fases del ciclo fue el factor de alargamiento 1 alfa (eEF1A). El eEF1A se ha reconocido como una proteína *moonlighting* ya que presenta varias funciones como la entrega de aa-tRNAs al sitio A del ribosoma, exportación de tRNAs de núcleo a citoplasma, media el plegamiento de proteínas (chaperona), dirige a proteínas dañadas o mal plegadas del ribosoma al proteasoma y tiene funciones pro- y anti-apoptóticas dependiendo del contexto celular (Sasikumar *et al.*, 2012). En *P. knowlesi* y *P. berghei*, los dos genes que codifican esta proteína se expresan en todas las fases asexuales excepto en el esquizonte tardío (Vinkenoog *et al.*, 1998). Nosotros encontramos al eEF1A durante las fases de anillo, trofozoito y esquizonte, pero con diferente peso molecular y punto isoeléctrico en la fase de anillo con respecto al trofozoito y esquizonte, lo que sugiere que podría presentar diferentes tipos de modificaciones postraduccionales. Esta observación es similar a lo observado en el humano, donde existen dos isoformas de esta proteína que se expresan dependiendo del contexto celular (Sasikumar *et al.*, 2012), por lo que es probable que en el parásito suceda un proceso similar, con diferentes isoformas presentando funciones diferentes, incluso opuestas. Además, en células eucariontes típicas, se ha observado que ésta aumenta su expresión en células en crecimiento y disminuye su expresión cuando la célula se encuentra en reposo para reducir los niveles de traducción de proteínas. Un dato interesante es la relación de eEF1A con el proteasoma al llevar a proteínas mal plegadas o dañadas para ser degradadas o bien, ella misma ser degradada para prevenir o evitar la traducción (Gonen *et al.*, 1994, Koiwai *et al.*, 2008, Chuang *et al.*, 2005). Por tanto, en el caso de *P. chabaudi* durante el ciclo intraeritrocítico esta proteína

podría estar cumpliendo las funciones en la síntesis de proteína y de chaperona en las fases de anillo y trofozoito, y su degradación al final del ciclo podría estar directamente relacionado con la disminución del metabolismo del parásito.

En trofozoítos, identificamos ubiquitinada en Lys-48 a una proteína cinasa de actividad dual (ser/thr) homóloga a proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina en humanos (CaMK) (Doerig *et al.*, 2008). El perfil de expresión durante el ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* muestran que el mRNA aumenta su expresión durante las fases de merozoíto y anillo y esta expresión disminuye durante la fase de trofozoíto. Lo anterior podría sugerir que esta proteína podría ser regulada tanto transcripcional como traduccionalmente durante las primeras etapas de desarrollo del parásito.

La replicación del DNA en las fases sanguíneas se lleva a cabo durante la fase de trofozoíto para lo que el parásito requiere purinas y pirimidinas para la síntesis de DNA/RNA para su multiplicación y debido a que *Plasmodium sp.* es un auxótrofo de purina, los precursores de RNA y DNA deben ser obtenidos de la célula hospedera (Cassera *et al.*, 2011). Nosotros identificamos tres proteínas ubiquitinadas en la fase de esquizonte relacionadas con la vía de salvamento de las purinas, la hipoxantina-guanina-xantina-fosforibosiltransferasa, la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa y una proteína anotada como uridina fosforilasa. La primera es una proteína clave para la producción de nucleótidos monofosforilados y pirofosfato inorgánico. La inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, es la enzima encargada de convertir inosina monofosfato (IMP) en xantina monofosfato (XMP) para obtener guanilato (Downie *et al.*, 2008, Cassera *et al.*, 2011). Finalmente, en el caso de la proteína uridina fosforilasa, identificamos tres isoformas poliubiquitinadas. Al realizar el análisis de la secuencia encontramos que en realidad esta proteína está relacionada a la purina nucleósido fosforilasa (PNP). Esta enzima es responsable de la fosforólisis de nucleósidos en las nucleobases correspondientes y ribosa-1-fosfato (Pugmire and Ealick, 2002). En *Plasmodium sp.*, esta proteína es una enzima clave que cataliza la fosforólisis, principalmente de inosina, para producir hipoxantina y ribosa-1-fosfato (Chaikuad and Brady, 2009). Al analizar en las bases de datos el comportamiento de los transcritos de estos genes y otros genes relacionados a la síntesis de nucleótidos durante el ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* encontramos que el mRNA tiene un pico de expresión durante la fase de trofozoíto (de las 18-22 horas post-infección) y pasado este tiempo, los transcritos disminuyen de manera rápida (Bozdech *et al.*, 2003). Otra de las

proteínas identificadas fue el factor de iniciación eucarionte 4A (eIF-4A). Esta proteína es una helicasa dual (DNA y RNA) dependiente de ATP que posee dominios conservados de la familia DEAD-box. En *P. falciparum*, esta proteína se expresa a lo largo del ciclo intraeritrocítico, pero los picos de expresión tanto del mRNA como de la proteína se encontraron asociados a las fases de trofozoito temprano y maduro y disminuyen en la fase de esquizonte (Pradhan and Tuteja, 2007). Estos datos, en conjunto con nuestras observaciones sugieren que las proteínas implicadas en la producción y manejo de precursores de DNA disminuyen por destrucción mediada por ubiquitina en el esquizonte, al final del ciclo, cuando la síntesis de DNA ya no es necesaria y el parásito se prepara para ruptura del eritrocito con la liberación de merozoítos y la invasión de la siguiente célula huésped.

Lo mismo sucede con las proteínas relacionadas con la glucólisis que encontramos ubiquitinadas en la fase de esquizonte: la hexocinasa, la fosfoglicerato cinasa y la piruvato cinasa. En *Plasmodium* durante las fases intraeritrocíticas la fuente principal de energía es la glucosa y las enzimas relacionadas aumentan alrededor de 70 veces durante la fase de trofozoito (Preuss *et al.*, 2012). Después de este punto, el metabolismo del parásito decae durante el desarrollo de merozoítos en la célula hospedera por lo que la evidencia de que estas moléculas presenten poliubiquitinación Lys-48 sugiere fuertemente que estas disminuyen por destrucción vía proteasoma.

Resulta interesante haber encontrado que en esquizontes un grupo de proteínas relacionadas con el plegamiento de proteínas estaba ubiquitinado; entre éstas se incluye a la proteína de choque térmico Hsp70 (dentro del mismo spot dos proteínas de choque térmico, la Hsp70-I y la Hsp70-III), a dos subunidades del complejo T y la co-chaperona HOP (proteína de organización Hsp70/Hsp90). A la fecha, se le han asignado diferentes papeles a las proteínas de choque térmico además de su papel en el plegamiento de proteínas. En particular, las proteínas de choque térmico 70 tienen un papel en el ensamble o desensamble de complejos multiproteicos, translocación, degradación y transducción de señales. Por tanto, las Hsp70 tienen un papel crucial en el control de calidad y disminución de proteínas durante condiciones normales y de estrés (Bozaykut *et al.*, 2014). En *Plasmodium*, las chaperonas han sido ampliamente estudiadas y se ha encontrado que son fundamentales para el crecimiento y desarrollo del parásito. En particular, en *P. falciparum* la Hsp70 se ha encontrado expresada de manera abundante en las fases asexuales a 37°C y también

se induce y se transloca al núcleo en estrés térmico a 41°C (Acharya *et al.*, 2007). Al menos seis homólogos de Hsp70 se han identificado en el parásito, todas presentando diferentes papeles dentro de la célula (Shonhai *et al.*, 2007). La Hsp70-I se localiza principalmente en el citoplasma y núcleo del parásito; sin embargo, esta proteína ha tenido mucha atención debido a su papel en la translocación de aproximadamente 500 proteínas nucleares al apicoplasto (Misra and Ramachandran, 2009) y se le ha encontrado en la vacuola parasitófora y en los cuerpos de Maurer (Shonhai *et al.*, 2007). Las otras Hsp70 han sido poco estudiadas, sin embargo se sabe que la Hsp70-II y la Hsp70- γ se encuentran en retículo endoplásmico (ref), la Hsp70-x es una de las que presentó mayor identidad con la Hsp70-I y es citoplasmática al igual que la Hsp70-z y la Hsp70-III se sabe que se encuentra en la mitocondria.

La Hsp70 forma complejos con otras chaperonas, en particular, el complejo que forma con Hsp90 esta mediado por la proteína de organización Hsp70/Hsp90 (HOP). Este complejo se forma gracias a los motivos EEVD en el carboxilo terminal de ambas chaperonas que interactúan con los dominios TPR (dominios de repetidos de tetratricopéptidos importantes para la interacción proteína-proteína) de HOP (ref). La interacción de ambas Hsp70/Hsp90 es importante para determinar si una proteína mal plegada puede ser reparada o, si no es reparable, deberá ser eliminada por medio del sistema del proteasoma. En cáncer y en células en crecimiento, se eleva la expresión de ésta co-chaperona debido a la función de pro-plegamiento de proteínas a diferencia de otras co-chaperonas como CHIP (Muller *et al.*, 2013). En *P. falciparum* se encontró esta proteína en la fase de trofozoito y se encuentra en interacción con Hsp70 y Hsp90 probablemente facilitando el plegamiento de proteínas (Gitau *et al.*, 2012). Debido a que el trofozoito es la fase más activa, desde el punto de vista metabólico, se espera que presente el pico de actividad de esta molécula y que posteriormente disminuya al final del ciclo intraeritrocítico, por lo que la evidencia de su ubiquitinación sugiere que ésta es regulada postraduccionalmente por medio de ubiquitinación y su posterior degradación vía proteasoma.

Finalmente, se encontraron ubiquitinadas proteínas componentes del complejo T. El complejo T, también denominado complejo de anillo TCP1 (TRiC) consiste de dos anillos idénticos apilados, cada uno con ocho proteínas (α , β , δ , ϵ , ζ , η , θ en mamíferos). Las proteínas mal plegadas entran a la cavidad central del complejo y son plegadas de manera dependiente de ATP. El complejo pliega varias proteínas, incluyendo a la actina y tubulina (Yebeles *et al.*, 2011). En *Plasmodium*, se

desconoce su función y en nuestro grupo de trabajo esta proteína se encontró fosforilada en tirosina en la fase de gametocitos (Alonso-Morales *et al.*, 2015a). Nosotros, en este trabajo encontramos las subunidades beta y épsilon, lo que demostró que este complejo se forma tanto durante las fases sexuales como en las asexuales y es probable que al final del ciclo también se regule mediante poliubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma.

En conjunto, las proteínas identificadas en la fase de esquizonte se espera disminuyan su abundancia y que esto correlacione con que el parásito en esta etapa disminuye al máximo la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Varias de las proteínas que nosotros identificamos como Lys-48 poliubiquitinadas fueron identificadas con cambios en abundancia tanto en el transcrito como a nivel de proteína a diferentes tiempos durante la fase de esquizonte de *P. falciparum*. Estas proteínas fueron la uridina fosforilasa, Hsp70 (I y III), Actina y eIF4A (Foth *et al.*, 2008). Estos datos en conjunto indican que estas proteínas disminuyen su abundancia debido a la poliubiquitinación y posterior degradación en proteasoma. Esta hipótesis se apoyó al detectar la Hsp70 con un anticuerpo específico y se observó que la proteína disminuyó en la fase de esquizonte.

12.3 Identificación del sitio de ubiquitinación

En un estudio previo en *P. falciparum*, se encontró que la Hsp70 y la uridina fosforilasa disminuían en concentración en la fase de esquizonte (Foth *et. al.*, 2008) y en este trabajo las mismas proteínas se encontraron poliubiquitinadas, lo que sugiere que estas proteínas se modifican para ser reguladas postraduccionalmente y así disminuir su abundancia; por lo que fueron interesantes para identificar el sitio específico de ubiquitinación.

En *Plasmodium sp.*, los recursos bioinformáticos que predicen los sitios de ubiquitinación tales como UbPred ó UbiProber, no han sido muy eficaces por la poca información disponible que existe sobre esta modificación postraduccional en el parásito. Además, es importante mencionar que el segundo aminoácido más abundante en el parásito es la lisina, por lo que el análisis con estos programas pueden producir falsos positivos y tal vez las “reglas” de ubiquitinación difieran en el parásito con respecto a otros tipos celulares. La búsqueda en estos sitios se realizó para las proteínas identificadas dando resultados variables y no confiables.

La identificación de los sitios específicos de ubiquitinación en Hsp70 y uridina fosforilasa se realizó por medio de espectrometría de masas después de la digestión con tripsina, ya que se sabe que el corte con esta enzima libera a la ubiquitina dejando un remanente de diglicina (GG) con una masa monoisotrópica de 114.03 Da unido de manera covalente a su lisina blanco. Con base en esto, la modificación en los sitios es identificada por su espectro MS/MS único de los péptidos GG durante la búsqueda en las bases de datos (Peng, 2008).

Los residuos ubiquitinados fueron para la Hsp70-I correspondió al 437, para la Hsp70-III fue el 222 y para la uridina fosforilasa, se identificaron 2, el 101 y el 211. Ninguno de estos sitios ha sido reportado experimentalmente por ningún grupo de investigación en *Plasmodium* y los programas disponibles para la detección de residuos ubiquitinados no pudieron predecir los residuos identificados experimentalmente. La Hsp70 se identificó por MS como ubiquitinada en el estudio del ubiquitoma por LeRoch *et al.* (2011) pero sin la descripción del residuo modificado ni el tipo de ubiquitinación que presenta la molécula.

12.4 Complejo de Ubiquitinación similar a SCF

Las ligasas de ubiquitina (E3) son los componentes básicos del sistema de ubiquitinación. Estas enzimas son numerosas y es un grupo altamente diverso de enzimas que transfieren ubiquitina a las proteínas blanco. Se ha observado que varias E3 trabajan solas y otras por medio de complejos multiproteicos (Weissman, 2001). Las E3 ligasas que trabajan en complejos lo hacen asociadas con proteínas de andamiaje denominadas cullinas y a estos complejos de proteínas se les conoce como Cullina-Ligasas Ring (CRLs) (Marin, 2009). Las E3 ligasas de tipo RING son responsables de al menos el 20% de la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina (Soucy *et al.*, 2009).

Los complejos SCF (Skp1-Cullina- proteína de caja F) y los similares a SCF son los complejos más grandes de ligasas de ubiquitina y poliubiquitinan en Lys-48 a un amplio número de proteínas que están involucradas en la progresión del ciclo celular, transducción de señales y transcripción (Zheng *et al.*, 2002).

En cuanto al ciclo celular, se sabe que los complejos SCF tienen un papel importante en la regulación al controlar la entrada a la fase S y la entrada a la mitosis por medio de la ubiquitinación de inhibidores de CDKs, ciclinas de fase G1 y S e inhibidores de la mitosis (Teixeira

and Reed, 2013). En *Plasmodium*, se desconoce cómo estos complejos podrían participar en el ciclo intraeritrocítico y sí éstos se componen de las mismas proteínas. Nosotros identificamos *in silico* los probables componentes del complejo SCF en *P. chabaudi*, encontrando una E3 ligasa similar a Rbx1 con una identidad del 61% en la secuencia de proteína con la Rbx1 de mamíferos y del 62% con la de plantas; dos genes relacionados a Cullina con identidades a la Cullina 1 (21% con la proteína del humano) y Cullina 4 (19% de identidad con la proteína de humano) y una proteína similar a Skp1 con una identidad del 45% con la proteína del humano. Los genes estudiados *in silico* presentaron la misma secuencia a la anotada en las bases de datos. Los resultados de expresión demostraron que los genes se expresan a lo largo del ciclo intraeritrocítico, con una mayor expresión en todos los casos en la fase de esquizonte.

En *Plasmodium*, se sabe que los genes relacionados al proteasoma se expresan de manera más abundante durante la fase de esquizonte (Aminake *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que la fase de esquizonte es en donde se identificaron la mayor cantidad de proteínas poliubiquitinadas en Lys-48 y es donde se encuentra una mayor expresión de los componentes del complejo SCF. En conjunto, los datos sugieren que complejos como el SCF podrían ser los encargados de ubiquitar a las proteínas para su destrucción vía proteasoma.

Para conocer si proteínas similares a Rbx, Cul y Skp podrían formar un complejo similar a SCF en *Plasmodium*, se realizó el análisis estructural (estructura tridimensional) de cada una de las proteínas y se realizó el empalme molecular con las moléculas ortólogas a las del humano. En el caso de PcRbx1 se observó que la secuencia presenta un 61% de identidad con la Rbx1 de humano, conserva el dominio RING con una inserción de nueve aminoácidos. En cuanto a su estructura tridimensional se observa que la Rbx1 del humano y del parásito logran empalmarse en el dominio RING *in silico*; sin embargo, en el extremo N-terminal no se empalman. Esta diferencia estructural podría repercutir en cómo la Rbx1 podría interactuar con la cullina dado que requiere una lámina β para establecer contacto con la cullina (Calabrese *et al.*, 2011).

En el genoma de *P. chabaudi*, se encuentran dos genes que codifican para proteínas tipo Cullina que al comparar sus secuencias presentan una identidad del 17.2%. Las dos proteínas presentan los dominios de repetidos de cullina (tres repetidos de cinco alfa hélices) y el dominio de homología a cullina (sitio de interacción con la E3 ligasa). Una diferencia importante entre las dos

secuencias es el dominio de neddyación que sólo se encuentra en la PcCul2 y que en otros sistemas se ha identificado su importancia para la función del complejo (Calabrese *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2002). Al realizar el alineamiento de las secuencias peptídicas encontramos que la PcCul2 era la proteína que presentaba una mayor identidad a la Cul1 de otros organismos. Debido a que el complejo SCF se encuentra conformado por la Cul1 se eligió a PcCul2 para realizar el análisis *in silico*. Se realizó el modelaje de la proteína y éste fue comparado con el cristal disponible de Cul1 que fue el del humano. En este caso ambas moléculas presentaron una superposición completa de la toda la molécula, con algunas diferencias en el último repetido de alfa hélice de PcCul2, el cual presenta dos alfa hélices adicionales. Lo anterior sugiere que estructuralmente la cullina del parásito podría formar un complejo similar al del humano.

En el caso de la proteína PcSkp1, la secuencia presenta tres aminoácidos conservados para la interacción con la Cullina (Asn47, Asn107, Tyr108), un dominio BTB/POZ en el extremo N-terminal que le permite la formación de homodímeros y un dominio Skp1 de dimerización en el dominio C-terminal. Estos dominios conservados le permiten a Skp1 interactuar con la Cul1 y con la molécula de reconocimiento al sustrato, denominada proteína de Caja F^{Skp2} (Zheng *et al.*, 2002). De todas las moléculas modeladas con I-Tasser, PcSkp1 fue la que presentó el score más alto a pesar de presentar una menor identidad en secuencia peptídica con sus ortólogas, lo que significa que existe una mayor probabilidad de que la estructura modelada sea similar a la estructura de la molécula *in vivo*.

Finalmente, se realizó el “*docking*” o acomplamiento molecular. Este método predice la conformación preferida de una molécula, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable. El acoplamiento se realizó con las estructuras terciarias de las tres proteínas que podrían formar el complejo SCF en el parásito. En el humano, en el complejo Cul1-Rbx1 las interacciones se establecen entre el dominio C-terminal de Cul1 y el N-terminal de Rbx1 mediante contactos tipo van der Waals. Por el contrario, las moléculas del parásito PcCul1-PcRbx1 no se acoplan aun modificando las variables y los tipo de interacción (balanceada, fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas y van der Waals) que se pueden manipular en el programa simulador Cluspro. Incluso, la molécula pareció tener mayor afinidad por el extremo N-terminal que por el C-terminal, como sucede en otros organismos (Calabrese *et al.*, 2011, Lydeard *et al.*, 2013).

Para determinar si este resultado se debía al modelo tridimensional obtenido en I-Tasser para estas proteínas se realizó el docking molecular heterólogo entre PcRbx1 con la Cul1 del humano y la combinación inversa, la Rbx1 del humano con la PcCul2. De manera interesante con ambas combinaciones se obtuvo acoplamiento entre las Rbx con el dominio CTD de la Cullinas lo que podría explicarse sugiriendo que en el parásito: 1) exista otra E3 ligasa que interactúe con la cullina para formar este complejo; 2) la PcRbx1 (E3 ligasa) y la PcCul1 interactúan de forma diferente en relación con lo reportado para los complejos (Rbx-Cul) de otros organismos; 3) el parásito emplea la E3 ligasa de su hospedero.

Para la interacción molecular de PcCul2-PcSkp1 observamos que con todos los tipos de fuerzas de interacción, estas dos moléculas se acoplaban a través del extremo N-terminal del primer repetido de alfa hélice de la cullina, como se ha reportado para otros complejos (Zheng *et al.*, 2002).

12.5 Neddylación

Nedd8 es una proteína similar a ubiquitina. Hasta el momento, la secuencia de Nedd8 en el humano es la que presenta la mayor identidad con la secuencia de la Ub (58%) (van der Veen and Ploegh, 2012). La vía de conjugación de Nedd8 es similar a la de ubiquitina, requiriendo procesamiento de la molécula por DUBs y tres enzimas (activadora, conjugadora y ligasa de Nedd8). Los principales sustratos de Nedd8 son los miembros de la familia de las Cullinas (ref). La neddylación de las cullinas modula la actividad de ligasa de ubiquitina del complejo SCF, lo que resulta en un aumento de la ubiquitinación y degradación por proteasoma de los sustratos (Xirodimas, 2008). Dado que se han descrito pocos sustratos para Nedd8 y dada la importancia para nuestro trabajo de identificar a la(s) Cullinas se usó como estrategia la inmunodetección de Nedd8 utilizando un anticuerpo monoclonal durante el ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi*.

En *P. chabaudi*, la secuencia de Nedd8 presenta una identidad del 51% con la secuencia de la ubiquitina. En relación con la secuencia de otros organismos, Nedd8 presenta una identidad de hasta el 51% con la secuencia del humano y de hasta el 95% con la secuencia de otras especies de *Plasmodium*(ref). La región que reconoce el anticuerpo corresponde a los primeros 16 aminoácidos en el extremo N-terminal. Cuando los experimentos se realizaron en geles SDS-PAGE al 12% con proteínas de anillos, trofozoítos y esquizontes se observó, reproduciblemente en las tres fases, una banda muy evidente de aproximadamente 50 kDa y una más tenue de

aproximadamente 40 kDa. Como control positivo, se utilizó un extracto proteico de células de pulmón de ratón que presentó una banda en el peso esperado para las cullinas de 80 kDa.

Para un análisis más fino se realizó la inmunodetección sobre proteínas resueltas por electroforesis bidimensional, y en las tres fases del ciclo (anillos, trofozoítos y esquizontes) se observó reproduciblemente un punto en aproximadamente 50 kDa con un pI cercano a 10. Este punto fue analizado por espectrometría de masas a partir de la muestra en la fase de esquizonte y se identificó una sola proteína, el factor de alargamiento 1 alfa (EF1a).

Otros sustratos para neddylación se han descrito en *Drosophila*, *C. elegans*, células de osteosarcoma (U2OS) e incluyen a las proteínas pVHL, MDM2, la proteína supresora de tumores p53 y su homólogo p73, la proteína Hippel-Lindau, el receptor de crecimiento epidermal y la proteína asociada a cáncer de mama 3 (Stickle *et al.*, 2004, Xirodimas *et al.*, 2004, Oved *et al.*, 2006). En otro trabajo se identificaron, en células HeLa, 75 proteínas Neddylladas, entre las que se encontró al factor de alargamiento 1 alfa (Xirodimas *et al.*, 2008).

Como ya se mencionó, Nedd8 en el humano presenta una secuencia muy similar a la de ubiquitina (58% de identidad) y cinco de sus nueve lisinas están conservadas con la ubiquitina (Enchev *et al.*, 2015). En el caso de *Plasmodium*, entre la Ub y Nedd8 existe una identidad del 51%. Nedd8 sólo presenta 6 lisinas a diferencia de la ubiquitina que presenta siete y, de éstas, cuatro están conservadas en la misma posición que la ubiquitina. Lo anterior sugiere que, al igual que la ubiquitina, Nedd8 podría formar cadenas y que éstas podrían representar diferentes destinos y funciones en las proteínas blanco. Lo que se sabe al respecto de los diferentes tipos de neddylación es que proteínas como las cullinas y pVHL tienen un sólo residuo de lisina como sitio aceptor de Nedd8, es decir, mononeddylación. Por el contrario, para p53 y EGFR parece ser que múltiples lisinas están involucradas en la neddylación. Además, las cullinas *in vitro* pueden hiperneddyllarse y se ha encontrado que Nedd8 puede formar cadenas a través de las lisinas 11, 22, 27, 48, 54 y 60 pero se desconoce la función de estas estructuras (Enchev *et al.*, 2015, Jeram *et al.*, 2010).

Nosotros identificamos con alto grado de confianza siete sitios de neddylación para EF1A de *P. chabaudi*. Al realizar un análisis minucioso de las proteínas identificadas previamente con

poliubiquitinación en Lys-48 encontramos que en la fase de esquizonte el factor de alargamiento fue reconocido únicamente con este anticuerpo (anti- Lys-48) y no con el que reconocía a la mono- y poliubiquitinación por lo que nos sugiere que en el factor de alargamiento es probable que se formen cadenas (polineddylación) en Lys-48 o bien, que como se ha visto en los diferentes estudios proteómicos de Nedd8, la proteína presente los dos tipos de modificación postraduccional y que estas dos vías operen para el control de la función de la proteína (Xirodimas, 2008).

En *Plasmodium* poco se sabe acerca de la neddylación, incluyendo las proteínas blanco y la vía de adición de Nedd8, aunque se conoce la presencia experimental de una enzima hidrolasa de tipo desubiquitinasa de actividad dual (ubiquitina y Nedd8) similar a la UCHL3 de mamíferos que podría tener un papel central en la fisiología del parásito (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2010). La neddylación del factor de alargamiento 1 alfa neddylado podría ser importante en el metabolismo de proteínas, y presumiblemente en las otras funciones que esta proteína lleva a cabo, por lo que será importante estudiar el papel de la neddylación de esta proteína.

XIII. Conclusiones

En *Plasmodium* existen tres genes de ubiquitina, dos contienen una sola copia, mientras que el tercero presenta cuatro repetidos en tándem (gen de poliubiquitina).

El gen de poliubiquitina en *Plasmodium* presenta un primer exón de 28 bp, un intrón de tamaño variable entre las diferentes especies y un número variable de repetidos en tándem de ubiquitina.

La ubiquitina en *P. chabaudi* presenta un alto grado de conservación evolutiva. La proteína presenta las siete lisinas en posición para la formación de cadenas de poliubiquitina.

A lo largo del ciclo intraeritrocítico de *P. chabaudi* la proporción de proteínas mono y poliubiquitinadas aumenta conforme el ciclo progresa, siendo más abundante durante la fase de esquizonte.

La fase que presentó proteínas con una ubiquitinación diferente a la poliubiquitinación en Lys-48 fue la de trofozoíto y la que presentó una mayor poliubiquitinación en Lys-48 fue la de esquizonte.

Las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas identificadas en la fase de anillo correspondieron a la actina y al factor de alargamiento 1 alfa.

Las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas identificadas en la fase de trofozoíto correspondieron a factor de alargamiento 1 alfa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y una cinasa de ser/thr.

Las proteínas Lys-48 poliubiquitinadas identificadas en la fase de esquizonte estuvieron relacionadas principalmente con el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos.

Se identificaron moléculas como Hsp70 que disminuyen en abundancia al final del ciclo intraeritrocítico por degradación mediada por poliubiquitinación.

Se identificaron los sitios de ubiquitinación para tres proteínas, Hsp70-I (437), Hsp70-III (222) y Uridina fosforilasa (101 y 211).

Se identificaron *in silico* los probables componentes del complejo SCF de *P. chabaudi*: PcRbx1 (PCHAS_080650), PcCul1 (PCHAS_112810), PcCul2 (PCHAS_142830) y PcSkp1 (PCHAS_114240).

Los genes de los posibles miembros del complejo SCF se expresan de manera cíclica y presentan una expresión máxima en la fase de esquizonte.

El gen de PcCul2 en *P. chabaudi* es el que presentó mayor identidad, en sus dominios y sitio de neddylación con la Cullina 1 del humano.

La estructura terciaria de PcCul2 y PcSkp1 pudo empalmarse con la de sus proteínas ortólogas en el humano.

Se observó únicamente acoplamiento molecular de Rbx1 de humano con PcCul2 y PcRbx1 con HsCul1. Entre las moléculas del parásito no se logra formar el acoplamiento según lo reportado para el complejo Rbx-Cul1 de humano.

Se estableció que la asociación entre PcCul2 y PcSKP1 ocurre por medio del dominio N-terminal de la cullina y el dominio BTB/POZ de Skp.

Se identificó que el factor de alargamiento 1 alfa en *P. chabaudi* se encuentra neddyado y se identificaron siete sitios de neddyación en la fase de esquizonte.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que el parásito *P. chabaudi* posee la maquinaria necesaria para llevar a cabo los procesos de ubiquitinación de proteínas a lo largo del ciclo intraeritrocítico. El tipo de ubiquitinación encontrada (poliubiquitinación en Lys48) sugiere que durante la fase de esquizonte el parásito degrada proteínas mediante el sistema de proteasoma dependiente de ubiquitina.

XIV. Perspectivas

Realizar el fraccionamiento celular de cada fase del parásito para realizar un análisis más cuantitativo de la ubiquitinación.

Analizar la región promotora del gen de poliubiquitina e identificar la probable relevancia de la región intrónica en la expresión.

Identificar por EMSA (ensayo de cambio de movilidad electroforética) posibles factores de transcripción que regulen la expresión del gen de poliubiquitina.

Identificar por espectrometría de masas aquellas proteínas que aumentaron o disminuyeron su abundancia a lo largo del ciclo intraeritrocítico.

Identificar los sitios de ubiquitinación para todas las moléculas encontradas por espectrometría de masas para poder analizar la función de esta modificación dentro del ciclo del parásito.

Producir las proteínas del complejo SCF recombinantes de *P. chabaudi* para realizar ensayos de *pull-down-GST* para evidenciar la interacción entre los componentes de dicho complejo.

Realizar ensayos de SAXS (Dispersión de Rayos-X de Ángulo Pequeño) para obtener la estructura terciaria de cada una de las moléculas que componen al complejo SCF.

Obtener anticuerpos para la localización e inmunoprecipitación de los complejos de ubiquitinación a lo largo del ciclo intraeritrocítico.

Validar la neddylación del factor de alargamiento y estudiar su presencia y efectos a lo largo del ciclo intraeritrocítico

XV. Referencias

1. ABBAS, T. & DUTTA, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9, 400-14.
2. ACHARYA, P., KUMAR, R. & TATU, U. 2007. Chaperoning a cellular upheaval in malaria: Heat shock proteins in Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 153, 85-94.
3. ALONSO-MORALES, A., GONZALEZ-LOPEZ, L., CAZARES-RAGA, F. E., CORTES-MARTINEZ, L., TORRES-MONZON, J. A., GALLEGOS-PEREZ, J. L., RODRIGUEZ, M. H., JAMES, A. A. & HERNANDEZ-HERNANDEZ, F. C. 2015a. Protein phosphorylation during Plasmodium berghei gametogenesis. *Exp Parasitol*, 156, 49-60.
4. ALONSO-MORALES, A., GONZALEZ-LOPEZ, L., CAZARES-RAGA, F. E., CORTES-MARTINEZ, L., TORRES-MONZON, J. A., GALLEGOS-PEREZ, J. L., RODRIGUEZ, M. H., JAMES, A. A. & HERNANDEZ-HERNANDEZ FDE, L. 2015b. Protein phosphorylation during Plasmodium berghei gametogenesis. *Exp Parasitol*, 156, 49-60.
5. ALY, A. S., VAUGHAN, A. M. & KAPPE, S. H. 2009. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*, 63, 195-221.
6. AMINAKE, M. N., ARNDT, H. D. & PRADEL, G. 2012. The proteasome of malaria parasites: A multi-stage drug target for chemotherapeutic intervention? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2, 1-10.
7. AMINAKE, M. N., SCHOOF, S., SOLOGUB, L., LEUBNER, M., KIRSCHNER, M., ARNDT, H. D. & PRADEL, G. 2011. Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1338-48.
8. ARANDA, S., LAGUNA, A. & DE LA LUNA, S. 2011. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J*, 25, 449-62.
9. ARISUE, N. & HASHIMOTO, T. 2015. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol Int*, 64, 254-9.
10. ARNOT, D. E. & GULL, K. 1998. The Plasmodium cell-cycle: facts and questions. *Ann Trop Med Parasitol*, 92, 361-5.
11. ARTAVANIS-TSAKONAS, K., WEIHOFEN, W. A., ANTOS, J. M., COLEMAN, B. I., COMEAUX, C. A., DURAISINGH, M. T., GAUDET, R. & PLOEGH, H. L. 2010. Characterization and structural studies of the Plasmodium falciparum ubiquitin and Nedd8 hydrolase UCHL3. *J Biol Chem*, 285, 6857-66.
12. BAKER, D. A. 2010. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol*, 172, 57-65.
13. BENDRIS, N., LEMMERS, B. & BLANCHARD, J. M. 2015. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle*, 0.
14. BERTOLINO, P. & BOWEN, D. G. 2015. Malaria and the liver: immunological hide-and-seek or subversion of immunity from within? *Front Microbiol*, 6, 41.
15. BESSON, A., DOWDY, S. F. & ROBERTS, J. M. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*, 14, 159-69.
16. BESSON, A. & YONG, V. W. 2001. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol*, 51, 245-64.

17. BIANCHI, M., CRINELLI, R., GIACOMINI, E., CARLONI, E. & MAGNANI, M. 2009. A potent enhancer element in the 5'-UTR intron is crucial for transcriptional regulation of the human ubiquitin C gene. *Gene*, 448, 88-101.
18. BIANCHI, M., CRINELLI, R., GIACOMINI, E., CARLONI, E., RADICI, L. & MAGNANI, M. 2013. Yin Yang 1 intronic binding sequences and splicing elicit intron-mediated enhancement of ubiquitin C gene expression. *PLoS One*, 8, e65932.
19. BODDEY, J. A. & COWMAN, A. F. 2013. Plasmodium nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*, 67, 243-69.
20. BOUTROS, R., LOBJOIS, V. & DUCOMMUN, B. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*, 7, 495-507.
21. BOZAYKUT, P., OZER, N. K. & KARADEMIR, B. 2014. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 195-209.
22. BOZDECH, Z., LLINAS, M., PULLIAM, B. L., WONG, E. D., ZHU, J. & DERISI, J. L. 2003. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol*, 1, E5.
23. BRETONES, G., DELGADO, M. D. & LEON, J. 2015. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*, 1849, 506-16.
24. BULATOV, E. & CIULLI, A. 2015. Targeting Cullin-RING E3 ubiquitin ligases for drug discovery: structure, assembly and small-molecule modulation. *Biochem J*, 467, 365-86.
25. BUSHELL, E. S., ECKER, A., SCHLEGELMILCH, T., GOULDING, D., DOUGAN, G., SINDEN, R. E., CHRISTOPHIDES, G. K., KAFATOS, F. C. & VLACHOU, D. 2009. Paternal effect of the nuclear formin-like protein MISFIT on Plasmodium development in the mosquito vector. *PLoS Pathog*, 5, e1000539.
26. BUTLER, C. L., LUCAS, O., WUCHTY, S., XUE, B., UVERSKY, V. N. & WHITE, M. 2014. Identifying novel cell cycle proteins in Apicomplexa parasites through co-expression decision analysis. *PLoS One*, 9, e97625.
27. CALABRESE, M. F., SCOTT, D. C., DUDA, D. M., GRACE, C. R., KURINOV, I., KRIWACKI, R. W. & SCHULMAN, B. A. 2011. A RING E3-substrate complex poised for ubiquitin-like protein transfer: structural insights into cullin-RING ligases. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 947-9.
28. CASSERA, M. B., ZHANG, Y., HAZLETON, K. Z. & SCHRAMM, V. L. 2011. Purine and pyrimidine pathways as targets in Plasmodium falciparum. *Curr Top Med Chem*, 11, 2103-15.
29. CERTAD, G., ABRAHEM, A. & GEORGES, E. 1999. Cloning and partial characterization of the proteasome S4 ATPase from Plasmodium falciparum. *Exp Parasitol*, 93, 123-31.
30. COMEAU, S. R., GATCHELL, D. W., VAJDA, S. & CAMACHO, C. J. 2004a. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res*, 32, W96-9.
31. COMEAU, S. R., GATCHELL, D. W., VAJDA, S. & CAMACHO, C. J. 2004b. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20, 45-50.
32. CRAIG, A. G., GRAU, G. E., JANSE, C., KAZURA, J. W., MILNER, D., BARNWELL, J. W., TURNER, G., LANGHORNE, J. & PARTICIPANTS OF THE HINXTON RETREAT MEETING ON ANIMAL MODELS FOR RESEARCH ON SEVERE, M. 2012. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog*, 8, e1002401.
33. CHAIKUAD, A. & BRADY, R. L. 2009. Conservation of structure and activity in Plasmodium purine nucleoside phosphorylases. *BMC Struct Biol*, 9, 42.
34. CHIMANUKA, B., FRANCOIS, G., TIMPERMAN, G., VANDEN DRIESSCHE, T. & PLAIZIER-VERCAMMEN, J. 1997. Chronobiology of Plasmodium chabaudi chabaudi: analysis of

- hourly recorded total and differential parasitaemia during a schizogonic cycle. *Parasite*, 4, 319-23.
35. CHUANG, S. M., CHEN, L., LAMBERTSON, D., ANAND, M., KINZY, T. G. & MADURA, K. 2005. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Mol Cell Biol*, 25, 403-13.
 36. CHUNG, D. W., PONTS, N., CERVANTES, S. & LE ROCH, K. G. 2009. Post-translational modifications in Plasmodium: more than you think! *Mol Biochem Parasitol*, 168, 123-34.
 37. DEREPPER, A., GUIGNON, V., BLANC, G., AUDIC, S., BUFFET, S., CHEVENET, F., DUFAYARD, J. F., GUINDON, S., LEFORT, V., LESCOT, M., CLAVERIE, J. M. & GASCUEL, O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36, W465-9.
 38. DESHAIES, R. J. & JOAZEIRO, C. A. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 78, 399-434.
 39. DICK, L. R., CRUIKSHANK, A. A., DESTREE, A. T., GRENIER, L., MCCORMACK, T. A., MELANDRI, F. D., NUNES, S. L., PALOMBELLA, V. J., PARENT, L. A., PLAMONDON, L. & STEIN, R. L. 1997. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J Biol Chem*, 272, 182-8.
 40. DOERIG, C., BILLKER, O., HAYSTEAD, T., SHARMA, P., TOBIN, A. B. & WATERS, N. C. 2008. Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol*, 24, 570-7.
 41. DOERIG, C., RAYNER, J. C., SCHERF, A. & TOBIN, A. B. 2015. Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nat Rev Microbiol*, 13, 160-72.
 42. DOWNIE, M. J., KIRK, K. & MAMOUN, C. B. 2008. Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell*, 7, 1231-7.
 43. DUBIEL, W. & GORDON, C. 1999. Ubiquitin pathway: another link in the polyubiquitin chain? *Curr Biol*, 9, R554-7.
 44. EJIGIRI, I. & SINNIS, P. 2009. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol*, 12, 401-7.
 45. ENCHEV, R. I., SCHULMAN, B. A. & PETER, M. 2015. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 30-44.
 46. FENTEANY, G. & SCHREIBER, S. L. 1998. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem*, 273, 8545-8.
 47. FENTEANY, G., STANDAERT, R. F., LANE, W. S., CHOI, S., COREY, E. J. & SCHREIBER, S. L. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, 268, 726-31.
 48. FIELD, S. J., PINDER, J. C., CLOUGH, B., DLUZEWSKI, A. R., WILSON, R. J. & GRATZER, W. B. 1993. Actin in the merozoite of the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Cell Motil Cytoskeleton*, 25, 43-8.
 49. FOTH, B. J., ZHANG, N., MOK, S., PREISER, P. R. & BOZDECH, Z. 2008. Quantitative protein expression profiling reveals extensive post-transcriptional regulation and post-translational modifications in schizont-stage malaria parasites. *Genome Biol*, 9, R177.
 50. FRANCIA, M. E. & STRIEPEN, B. 2014. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol*, 12, 125-36.
 51. FREVERT, U., USYNIN, I., BAER, K. & KLOTZ, C. 2006. Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell Microbiol*, 8, 1537-46.
 52. GALLEGOS, J. E. & ROSE, A. B. 2015. The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci*, 237, 8-15.

53. GANTT, S. M., MYUNG, J. M., BRIONES, M. R., LI, W. D., COREY, E. J., OMURA, S., NUSSENZWEIG, V. & SINNIS, P. 1998. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 2731-8.
54. GARDNER, M. J., HALL, N., FUNG, E., WHITE, O., BERRIMAN, M., HYMAN, R. W., CARLTON, J. M., PAIN, A., NELSON, K. E., BOWMAN, S., PAULSEN, I. T., JAMES, K., EISEN, J. A., RUTHERFORD, K., SALZBERG, S. L., CRAIG, A., KYES, S., CHAN, M. S., NENE, V., SHALLOM, S. J., SUH, B., PETERSON, J., ANGIUOLI, S., PERTEA, M., ALLEN, J., SELENGUT, J., HAFT, D., MATHER, M. W., VAIDYA, A. B., MARTIN, D. M., FAIRLAMB, A. H., FRAUNHOLZ, M. J., ROOS, D. S., RALPH, S. A., MCFADDEN, G. I., CUMMINGS, L. M., SUBRAMANIAN, G. M., MUNGALL, C., VENTER, J. C., CARUCCI, D. J., HOFFMAN, S. L., NEWBOLD, C., DAVIS, R. W., FRASER, C. M. & BARRELL, B. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498-511.
55. GERALD, N., MAHAJAN, B. & KUMAR, S. 2011. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*, 10, 474-82.
56. GERARDO REYES CABRERA, R. S. A. 2014. Manual Técnico de Entomología Para el Programa de Paludismo. In: SALUD, S. D. (ed.) 1 ed. Mexico: Secretaría de Salud.
57. GITAU, G. W., MANDAL, P., BLATCH, G. L., PRZYBORSKI, J. & SHONHAI, A. 2012. Characterisation of the *Plasmodium falciparum* Hsp70-Hsp90 organising protein (PfHop). *Cell Stress Chaperones*, 17, 191-202.
58. GONEN, H., SMITH, C. E., SIEGEL, N. R., KAHANA, C., MERRICK, W. C., CHAKRABURTTY, K., SCHWARTZ, A. L. & CIECHANOVER, A. 1994. Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7648-52.
59. GRAEWE, S., RANKIN, K. E., LEHMANN, C., DESCHERMEIER, C., HECHT, L., FROEHLKE, U., STANWAY, R. R. & HEUSSLER, V. 2011. Hostile takeover by *Plasmodium*: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. *PLoS Pathog*, 7, e1002224.
60. GU, Z. C. & ENENKEL, C. 2014. Proteasome assembly. *Cell Mol Life Sci*, 71, 4729-45.
61. HAFALLA, J. C., SILVIE, O. & MATUSCHEWSKI, K. 2011. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev*, 240, 297-316.
62. HAMILTON, M. J., LEE, M. & LE ROCH, K. G. 2014. The ubiquitin system: an essential component to unlocking the secrets of malaria parasite biology. *Mol Biosyst*, 10, 715-23.
63. HAMMARTON, T. C., MOTTRAM, J. C. & DOERIG, C. 2003. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res*, 5, 91-101.
64. HARPER, J. W. & TAN, M. K. 2012. Understanding cullin-RING E3 biology through proteomics-based substrate identification. *Mol Cell Proteomics*, 11, 1541-50.
65. HEDRICK, S. M. 2009. The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. *Nat Immunol*, 10, 1057-63.
66. HERMEKING, H. & BENZINGER, A. 2006. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol*, 16, 183-92.
67. HLISCS, M., MILLET, C., DIXON, M. W., SIDEN-KIAMOS, I., MCMILLAN, P. & TILLEY, L. 2015. Organization and function of an actin cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cell Microbiol*, 17, 207-25.
68. HOCHEGGER, H., TAKEDA, S. & HUNT, T. 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 910-6.
69. HORROCKS, P. & NEWBOLD, C. I. 2000. Intraerythrocytic polyubiquitin expression in *Plasmodium falciparum* is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol*, 105, 115-25.

70. HUSNJAK, K. & DIKIC, I. 2012. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem*, 81, 291-322.
71. HWANG, C. S., SHEMORRY, A., AUERBACH, D. & VARSHAVSKY, A. 2010. The N-end rule pathway is mediated by a complex of the RING-type Ubr1 and HECT-type Ufd4 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol*, 12, 1177-85.
72. JERAM, S. M., SRIKUMAR, T., ZHANG, X. D., ANNE EISENHAUER, H., ROGERS, R., PEDRIOLI, P. G., MATUNIS, M. & RAUGHT, B. 2010. An improved SUMmOn-based methodology for the identification of ubiquitin and ubiquitin-like protein conjugation sites identifies novel ubiquitin-like protein chain linkages. *Proteomics*, 10, 254-65.
73. JIN, S., ANTINORE, M. J., LUNG, F. D., DONG, X., ZHAO, H., FAN, F., COLCHAGIE, A. B., BLANCK, P., ROLLER, P. P., FORNACE, A. J., JR. & ZHAN, Q. 2000. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem*, 275, 16602-8.
74. KERSCHER, O., FELBERBAUM, R. & HOCHSTRASSER, M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 159-80.
75. KISSELEV, A. F. & GOLDBERG, A. L. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*, 8, 739-58.
76. KNELL, A. J. & WELLCOME TROPICAL INSTITUTE. 1991. *Malaria : a publication of the tropical programme of the Wellcome Trust*, Oxford ; New York, Oxford University Press.
77. KOIWAI, K., MAEZAWA, S., HAYANO, T., IITSUKA, M. & KOIWAI, O. 2008. BPOZ-2 directly binds to eEF1A1 to promote eEF1A1 ubiquitylation and degradation and prevent translation. *Genes Cells*, 13, 593-607.
78. KOMANDER, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, 37, 937-53.
79. KONSTANTINOVA, I. M., TSIMOKHA, A. S. & MITTENBERG, A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol*, 267, 59-124.
80. KOYAMA, F. C., CHAKRABARTI, D. & GARCIA, C. R. 2009. Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol*, 165, 1-7.
81. KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y. & CIECHANOVER, A. 2012. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci*, 125, 539-48.
82. KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y., SOMMER, T. & CIECHANOVER, A. 2013. The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52, 192-8.
83. KULATHU, Y. & KOMANDER, D. 2012. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 508-23.
84. LAEMMLI, U. K., BEGUIN, F. & GUJER-KELLENBERGER, G. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*, 47, 69-85.
85. LAZARUS, M. D., SCHNEIDER, T. G. & TARASCHI, T. F. 2008. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Cell Sci*, 121, 1937-49.
86. LEE, J. & ZHOU, P. 2010. Cullins and cancer. *Genes Cancer*, 1, 690-9.
87. LI, L., CRABTREE, J., FISCHER, S., PINNEY, D., STOECKERT, C. J., JR., SIBLEY, L. D. & ROOS, D. S. 2004. ApiEST-DB: analyzing clustered EST data of the apicomplexan parasites. *Nucleic Acids Res*, 32, D326-8.
88. LIM, S. & KALDIS, P. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140, 3079-93.

89. LINDENTHAL, C., WEICH, N., CHIA, Y. S., HEUSSLER, V. & KLINKERT, M. Q. 2005. The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of Plasmodium parasites. *Parasitology*, 131, 37-44.
90. LIU, C. W. & JACOBSON, A. D. 2013. Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem Sci*, 38, 103-10.
91. LYDEARD, J. R., SCHULMAN, B. A. & HARPER, J. W. 2013. Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep*, 14, 1050-61.
92. MAIER, A. G., COOKE, B. M., COWMAN, A. F. & TILLEY, L. 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol*, 7, 341-54.
93. MALUMBRES, M. & BARBACID, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 9, 153-66.
94. MARIN, I. 2009. Diversification of the cullin family. *BMC Evol Biol*, 9, 267.
95. MCCUBREY, J. A., STEELMAN, L. S., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., WONG, E. W., CHANG, F., LEHMANN, B., TERRIAN, D. M., MILELLA, M., TAFURI, A., STIVALA, F., LIBRA, M., BASECKE, J., EVANGELISTI, C., MARTELLI, A. M. & FRANKLIN, R. A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1263-84.
96. MISRA, G. & RAMACHANDRAN, R. 2009. Hsp70-1 from Plasmodium falciparum: protein stability, domain analysis and chaperone activity. *Biophys Chem*, 142, 55-64.
97. MOLINA, J. R. & ADJEI, A. A. 2006. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*, 1, 7-9.
98. MONIA, B. P., ECKER, D. J., JONNALAGADDA, S., MARSH, J., GOTLIB, L., BUTT, T. R. & CROOKE, S. T. 1989. Gene synthesis, expression, and processing of human ubiquitin carboxyl extension proteins. *J Biol Chem*, 264, 4093-103.
99. MULLER, P., RUCKOVA, E., HALADA, P., COATES, P. J., HRSTKA, R., LANE, D. P. & VOJTESEK, B. 2013. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*, 32, 3101-10.
100. MURATA, S., YASHIRODA, H. & TANAKA, K. 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 104-15.
101. MYUNG, J., KIM, K. B. & CREWS, C. M. 2001. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev*, 21, 245-73.
102. NAKAYAMA, K. I. & NAKAYAMA, K. 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 369-81.
103. NANDI, D., TAHILIANI, P., KUMAR, A. & CHANDU, D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 31, 137-55.
104. NAUGHTON, J. A. & BELL, A. 2007. Studies on cell-cycle synchronization in the asexual erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *Parasitology*, 134, 331-7.
105. NESVIZHSKII, A. I., KELLER, A., KOLKER, E. & AEBERSOLD, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 75, 4646-58.
106. NETO, Z., MACHADO, M., LINDEZA, A., DO ROSARIO, V., GAZARINI, M. L. & LOPES, D. 2013. Treatment of Plasmodium chabaudi Parasites with Curcumin in Combination with Antimalarial Drugs: Drug Interactions and Implications on the Ubiquitin/Proteasome System. *J Parasitol Res*, 2013, 429736.
107. NEWBOLD, C. I., BOYLE, D. B., SMITH, C. C. & BROWN, K. N. 1982. Stage specific protein and nucleic acid synthesis during the asexual cycle of the rodent malaria Plasmodium chabaudi. *Mol Biochem Parasitol*, 5, 33-44.

108. NINO, C. A., CHAPARRO, J., SOFFIENTINI, P., POLO, S. & WASSERMAN, M. 2013. Ubiquitination dynamics in the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen*, 2, 525-39.
109. NUNES, M. C., GOLDRING, J. P., DOERIG, C. & SCHERF, A. 2007. A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol*, 63, 391-403.
110. OTTO, T. D., BOHME, U., JACKSON, A. P., HUNT, M., FRANKE-FAYARD, B., HOEIJMAKERS, W. A., RELIGA, A. A., ROBERTSON, L., SANDERS, M., OGUN, S. A., CUNNINGHAM, D., ERHART, A., BILLKER, O., KHAN, S. M., STUNNENBERG, H. G., LANGHORNE, J., HOLDER, A. A., WATERS, A. P., NEWBOLD, C. I., PAIN, A., BERRIMAN, M. & JANSE, C. J. 2014. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biol*, 12, 86.
111. OVED, S., MOSESSON, Y., ZWANG, Y., SANTONICO, E., SHTIEGMAN, K., MARMOR, M. D., KOCHUPURAKKAL, B. S., KATZ, M., LAVI, S., CESARENI, G. & YARDEN, Y. 2006. Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 281, 21640-51.
112. PAN, Z. Q., KENTSI, A., DIAS, D. C., YAMOA, K. & WU, K. 2004. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*, 23, 1985-97.
113. PENG, J. 2008. Evaluation of proteomic strategies for analyzing ubiquitinated proteins. *BMB Rep*, 41, 177-83.
114. PICKART, C. M. & EDDINS, M. J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 55-72.
115. PIERCE, S. K. & MILLER, L. H. 2009. World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not. *J Immunol*, 182, 5171-7.
116. PONTS, N., SARAF, A., CHUNG, D. W., HARRIS, A., PRUDHOMME, J., WASHBURN, M. P., FLORENS, L. & LE ROCH, K. G. 2011. Unraveling the ubiquitome of the human malaria parasite. *J Biol Chem*, 286, 40320-30.
117. PONTS, N., YANG, J., CHUNG, D. W., PRUDHOMME, J., GIRKE, T., HORROCKS, P. & LE ROCH, K. G. 2008. Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. *PLoS One*, 3, e2386.
118. PRADHAN, A. & TUTEJA, R. 2007. Bipolar, Dual *Plasmodium falciparum* helicase 45 expressed in the intraerythrocytic developmental cycle is required for parasite growth. *J Mol Biol*, 373, 268-81.
119. PRASAD, R., ATUL, K., KOLLA, V. K., LEGAC, J., SINGHAL, N., NAVALE, R., ROSENTHAL, P. J. & SIJWALI, P. S. 2013. Blocking *Plasmodium falciparum* development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132. *PLoS One*, 8, e73530.
120. PREUSS, J., JORTZIK, E. & BECKER, K. 2012. Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life*, 64, 603-11.
121. PRICE, S. R. 2003. Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 617-28.
122. PRUDENCIO, M., RODRIGUEZ, A. & MOTA, M. M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 4, 849-56.
123. PUGMIRE, M. J. & EALICK, S. E. 2002. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J*, 361, 1-25.

124. RADICI, L. B., M; CRINELLI, R; MAGNANI, M 2013. Ubiquitin C gene: Structure, function, and transcriptional regulation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 1057-1062.
125. REINHARDT, H. C. & YAFFE, M. B. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 245-55.
126. REYES, A. F. B. 2011. La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 68, 10.
127. RODRIGUEZ, M. H., ULLOA A., RAMSEY J. 2008. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica. *Instituto Nacional de Salud Pública*, Primera Edición, 214.
128. ROTH, E., JR. 1990. Plasmodium falciparum carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells*, 16, 453-60; discussion 461-6.
129. SADOWSKI, M., SURYADINATA, R., TAN, A. R., ROESLEY, S. N. & SARCEVIC, B. 2012. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*, 64, 136-42.
130. SANTAMARINA, M., HERNANDEZ, G. & ZALVIDE, J. 2008. CDK redundancy guarantees cell cycle progression in Rb-negative tumor cells independently of their p16 status. *Cell Cycle*, 7, 1962-72.
131. SARIKAS, A., HARTMANN, T. & PAN, Z. Q. 2011. The cullin protein family. *Genome Biol*, 12, 220.
132. SASIKUMAR, A. N., PEREZ, W. B. & KINZY, T. G. 2012. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3, 543-55.
133. SCHAFER, K. A. 1998. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, 35, 461-78.
134. SCHERF, A., LOPEZ-RUBIO, J. J. & RIVIERE, L. 2008. Antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol*, 62, 445-70.
135. SHANG, F. & TAYLOR, A. 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 51, 5-16.
136. SHERR, C. J. & ROBERTS, J. M. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 18, 2699-711.
137. SHEVCHENKO, A., JENSEN, O. N., PODTELEJNIKOV, A. V., SAGLIOCCO, F., WILM, M., VORM, O., MORTENSEN, P., SHEVCHENKO, A., BOUCHERIE, H. & MANN, M. 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14440-5.
138. SHONHAI, A., BOSHOF, A. & BLATCH, G. L. 2007. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from Plasmodium falciparum. *Protein Sci*, 16, 1803-18.
139. SOLYAKOV, L., HALBERT, J., ALAM, M. M., SEMBLAT, J. P., DORIN-SEMBLAT, D., REININGER, L., BOTTRILL, A. R., MISTRY, S., ABDI, A., FENNELL, C., HOLLAND, Z., DEMARTA, C., BOUZA, Y., SICARD, A., NIVEZ, M. P., ESCHENLAUER, S., LAMA, T., THOMAS, D. C., SHARMA, P., AGARWAL, S., KERN, S., PRADEL, G., GRACIOTTI, M., TOBIN, A. B. & DOERIG, C. 2011. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nat Commun*, 2, 565.
140. SOUCY, T. A., SMITH, P. G., MILHOLLEN, M. A., BERGER, A. J., GAVIN, J. M., ADHIKARI, S., BROWNELL, J. E., BURKE, K. E., CARDIN, D. P., CRITCHLEY, S., CULLIS, C. A., DOUCETTE, A., GARNSEY, J. J., GAULIN, J. L., GERSHMAN, R. E., LUBLINSKY, A. R., MCDONALD, A., MIZUTANI, H., NARAYANAN, U., OLHAVA, E. J., PELUSO, S., REZAEI, M., SINTCHAK, M. D., TALREJA, T., THOMAS, M. P., TRAORE, T., VYSKOCIL, S., WEATHERHEAD, G. S., YU, J., ZHANG, J., DICK, L. R., CLAIBORNE, C. F., ROLFE, M., BOLEN, J. B. & LANGSTON, S. P. 2009. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, 458, 732-6.

141. SPENCE, P. J., JARRA, W., LEVY, P., NAHRENDORF, W. & LANGHORNE, J. 2012. Mosquito transmission of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Malar J*, 11, 407.
142. SRIRAM, S. M., KIM, B. Y. & KWON, Y. T. 2011. The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 735-47.
143. STEPHENS, R., CULLETON, R. L. & LAMB, T. J. 2012. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol*, 28, 73-82.
144. STEWART, C. L., SORIA, A. M. & HAMEL, P. A. 2001. Integration of the pRB and p53 cell cycle control pathways. *J Neurooncol*, 51, 183-204.
145. STICKLE, N. H., CHUNG, J., KLCO, J. M., HILL, R. P., KAELIN, W. G., JR. & OHH, M. 2004. pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol*, 24, 3251-61.
146. STRIEPEN, B., JORDAN, C. N., REIFF, S. & VAN DOOREN, G. G. 2007. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog*, 3, e78.
147. SUAREZ, C., VOLKMANN, K., GOMES, A. R., BILLKER, O. & BLACKMAN, M. J. 2013. The malarial serine protease SUB1 plays an essential role in parasite liver stage development. *PLoS Pathog*, 9, e1003811.
148. SURYADINATA, R., ROESLEY, S. N., YANG, G. & SARCEVIC, B. 2014. Mechanisms of generating polyubiquitin chains of different topology. *Cells*, 3, 674-89.
149. TACHIKUI, H., SAITOU, N., NAKAJIMA, T., HAYASAKA, I., ISHIDA, T. & INOUE, I. 2003. Lineage-specific homogenization of the polyubiquitin gene among human and great apes. *J Mol Evol*, 57, 737-44.
150. TEIXEIRA, L. K. & REED, S. I. 2013. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem*, 82, 387-414.
151. TERMAN, J. R. & KASHINA, A. 2013. Post-translational modification and regulation of actin. *Current Opinion in Cell Biology*, 25, 30-38.
152. TILLEY, L., DIXON, M. W. & KIRK, K. 2011. The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 839-42.
153. TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
154. TREMPE, J. F. 2011. Reading the ubiquitin postal code. *Curr Opin Struct Biol*, 21, 792-801.
155. VAN DER VEEN, A. G. & PLOEGH, H. L. 2012. Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem*, 81, 323-57.
156. VAN DOOREN, G. G., MARTI, M., TONKIN, C. J., STIMMLER, L. M., COWMAN, A. F. & MCFADDEN, G. I. 2005. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 57, 405-19.
157. VINKENOOG, R., SPERANCA, M. A., VAN BREEMEN, O., RAMESAR, J., WILLIAMSON, D. H., ROSS-MACDONALD, P. B., THOMAS, A. W., JANSE, C. J., DEL PORTILLO, H. A. & WATERS, A. P. 1998. Malaria parasites contain two identical copies of an elongation factor 1 alpha gene. *Mol Biochem Parasitol*, 94, 1-12.
158. WEI, D. & SUN, Y. 2010. Small RING Finger Proteins RBX1 and RBX2 of SCF E3 Ubiquitin Ligases: The Role in Cancer and as Cancer Targets. *Genes Cancer*, 1, 700-7.
159. WEISSMAN, A. M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 169-78.

160. WHITE, N. J. 2008. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*, 46, 172-3.
161. WHO 2014. World Malaria Report 2014. Geneva, Switzerland *WHO Press*, 142.
162. WILEY, J. D., MERINO, E. F., KRAI, P. M., MCLEAN, K. J., TRIPATHI, A. K., VEGA-RODRIGUEZ, J., JACOBS-LORENA, M., KLEMB, M. & CASSERA, M. B. 2015. Isoprenoid precursor biosynthesis is the essential metabolic role of the apicoplast during gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell*, 14, 128-39.
163. WILKINS, M. R., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, J. C., WILLIAMS, K. L., APPEL, R. D. & HOCHSTRASSER, D. F. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.
164. WOELK, T., SIGISMUND, S., PENENGO, L. & POLO, S. 2007. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div*, 2, 11.
165. WOLTERS, J. 1991. The troublesome parasites--molecular and morphological evidence that Apicomplexa belong to the dinoflagellate-ciliate clade. *Biosystems*, 25, 75-83.
166. XIRODIMAS, D. P. 2008. Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans*, 36, 802-6.
167. XIRODIMAS, D. P., SAVILLE, M. K., BOURDON, J. C., HAY, R. T. & LANE, D. P. 2004. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, 118, 83-97.
168. XIRODIMAS, D. P., SUNDQVIST, A., NAKAMURA, A., SHEN, L., BOTTING, C. & HAY, R. T. 2008. Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep*, 9, 280-6.
169. YANG, J., YAN, R., ROY, A., XU, D., POISSON, J. & ZHANG, Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12, 7-8.
170. YE, Y. & RAPE, M. 2009. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 755-64.
171. YEBENES, H., MESA, P., MUNOZ, I. G., MONTOYA, G. & VALPUESTA, J. M. 2011. Chaperonins: two rings for folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 424-432.
172. ZHANG, F., SAHA, S., SHABALINA, S. A. & KASHINA, A. 2010. Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation. *Science*, 329, 1534-7.
173. ZHENG, N., SCHULMAN, B. A., SONG, L., MILLER, J. J., JEFFREY, P. D., WANG, P., CHU, C., KOEPP, D. M., ELLEDGE, S. J., PAGANO, M., CONAWAY, R. C., CONAWAY, J. W., HARPER, J. W. & PAVLETICH, N. P. 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416, 703-9.
174. ZIMMERMAN, E. S., SCHULMAN, B. A. & ZHENG, N. 2010. Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol*, 20, 714-21.