



UNSAM

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde"
Universidad Nacional de San Martín

....

Estudio del sistema de SUMOilación en *Trypanosoma brucei*

....

Tesis para optar al título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología

....

Bioq. Paula Ana Iribarren

Directora: Dra. Vanina Eder Alvarez

Co-director: Dr. Juan José Cazzulo

....

Año 2016

AGRADECIMIENTOS

A la UNSAM y al CONICET por brindarme el apoyo económico e institucional necesario para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Cazzulo por abrirme las puertas del laboratorio generosamente y permitirme trabajar con absoluta libertad.

A Vanina. Gracias por formarme y transmitirme tu pasión. Por tu paciencia infinita, por resolver todas mis dudas y aguantarme siempre. Gracias por tu apoyo incondicional en los momentos más difíciles. Por tu generosidad y confianza. Por tu compromiso, dedicación y entusiasmo. Gracias por ser protagonista de mi aprendizaje y enseñarme con el ejemplo.

A los Dres. Igor Almeida, Miguel Navarro y Ron Hay por su invaluable contribución en los experimentos de proteómica. Al Dr. Santiago Carmona por su ayuda desinteresada en el análisis de los primeros resultados.

A Julio, mi primer maestro. Por enseñarme todo y acompañarme siempre con una alegría que extraño hasta hoy.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, León, Gabi, Emir, Joaquín, Dante, Sol, Agus, Brian, Flor, Nico y Lu, por la ayuda y apoyo permanente. Por hacer del laboratorio un lugar en el que disfruto estar. Gracias Gabi por hacer que todo funcione y compartir conmigo tu experiencia. Gracias Emir por tus consejos y tu ayuda desinteresada. Gracias Brian por hacer divertida la rutina. A Agus, Lili y Berta, por la ayuda, consejo y compañía.

A Agus, mi compañera perfecta y ayuda constante. Gracias por tu apoyo y compromiso fundamental para la finalización de este trabajo.

A Sol, Ale y Ana, con quienes compartí los fracasos y alegrías de todos los días. Gracias por estar siempre. Por aconsejarme y ayudarme en todo. Por su amistad.

A todos los integrantes del IIB que desde su lugar contribuyeron directa o indirectamente al desarrollo de este trabajo. A todos con los que compartí festejos y frustraciones del día a día.

A mis amigos de siempre, incondicionales.

A mis hermanas, que adoro. A mi abuelita y a las mejores tías que alguien puede tener. A mis suegros por su infinita generosidad. A mi mamá y a mi papá, por apoyarme de manera constante y haber hecho todo lo que estuvo a su alcance, y más, para que todo sea siempre más fácil para mí. A mi compañero de la vida. Al solcito de mis días.

A mi familia entera. La de hoy y la de mañana.

A Dios por permitirme llegar hasta acá, feliz con todos ellos.

RESUMEN

La SUMOilación es una modificación post-traducciona de proteínas exclusiva de eucariotas, intensamente estudiada en la actualidad. Esta modificación consiste en la unión covalente de una proteína con homología estructural a ubiquitina, llamada SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), a un residuo de lisina de la proteína blanco, alterando su superficie de interacción y afectando así su localización, estabilidad, actividad y/o interacción con otras proteínas. Normalmente sólo un bajo porcentaje de una proteína se encuentra SUMOilada en un momento dado y el efecto que esta modificación ejerce en ella no puede ser predicho *a priori*. La SUMOilación es una modificación dinámica y reversible, asociada a muchos procesos celulares como replicación y reparación del ADN, remodelación de la cromatina, segregación cromosómica, metabolismo del ARN, transporte núcleo-citoplasma, etc. De hecho, la SUMOilación ha demostrado ser esencial en muchos organismos, incluyendo nuestro modelo de estudio, *Trypanosoma brucei*.

T. brucei es un parásito extracelular de la familia Trypanosomatidae responsable de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño en humanos y del *Nagana* en ganado. Estas enfermedades son endémicas del continente africano, lugar de residencia de su insecto vector: la mosca del género *Glossina* (tse-tse). El ciclo de vida de este kinetoplastido alterna entre formas replicativas y no replicativas ya sea dentro del hospedador mamífero como del insecto vector, pero sólo dos de ellas, la forma procíclica (intestino de la mosca) y sanguínea alargada (sangre/líquidos tisulares del mamífero) son cultivables de manera axénica en el laboratorio. *T. brucei* presenta un mecanismo sofisticado de variación antigénica que le permite evadir la respuesta inmune humoral montada por el hospedador contra su principal glicoproteína de superficie (VSG). Recientemente, este proceso ha sido asociado de manera directa con la SUMOilación de proteínas aún no caracterizadas.

Considerando la relevancia de esta modificación post-traducciona en este trabajo de Tesis nos propusimos identificar de manera global proteínas SUMOiladas en el parásito. Para llevar esto a cabo, desarrollamos líneas transgénicas de parásitos procíclicos y sanguíneos en las que los dos alelos que codifican para *TbSUMO* fueron reemplazados por variantes etiquetadas para permitir la purificación de proteínas SUMOiladas en base a diferentes principios de afinidad y posterior identificación por espectrometría de masas. Estas líneas celulares nos permitieron validar la funcionalidad de las etiquetas empleadas pero las proteínas SUMOiladas no pudieron ser enriquecidas significativamente por sobre los contaminantes de la purificación. Las líneas transgénicas desarrolladas a continuación expresaron exclusivamente una versión de *TbSUMO* etiquetada en su extremo N-terminal y deficiente en residuos de lisina, reduciendo la copurificación de proteínas contaminantes tras digestión con la endoproteasa Lys-C. Esta estrategia permitió la identificación de un número reducido de proteínas SUMOiladas. Sin embargo resultó de utilidad para demostrar que las cadenas de poliSUMO no serían esenciales para la viabilidad del parásito. Para optimizar los resultados obtenidos implementamos finalmente una estrategia recientemente descrita en la que expresamos una variante de *TbSUMO* que posee etiquetas para la detección y purificación de conjugados en su extremo N-terminal y una mutación cercana a su extremo C-terminal T106K. Esta modificación genera un sitio de clivado para la enzima Lys-C permitiendo que un fragmento de *TbSUMO* de solo 114 Da (motivo diglicina) permanezca unido al péptido modificado tras la digestión con la enzima. Tras un paso

de enriquecimiento con anticuerpos anti diglicina, estos péptidos pequeños en forma de T pueden ser identificados por espectrometría de masas. De esta manera es posible realizar la identificación de las proteínas SUMOiladas y sus sitios de SUMOilación en un mismo experimento de proteómica. Siguiendo esta metodología pudimos identificar en parásitos procíclicos 52 sitios de SUMOilación en 44 proteínas de manera confiable, muchas de ellas asociadas a procesos de replicación y reparación del ADN, procesamiento y degradación del ARN, etc. Estos resultados en conjunto permiten evidenciar el rol de este modificador en la regulación de muchos procesos fisiológicos relevantes para *T. brucei*.

Para el estudio posterior de las proteínas SUMOiladas de interés desarrollamos también un sistema de SUMOilación específico para *T. brucei* en un sistema heterólogo bacteriano. Dado que la maquinaria de SUMOilación se encuentra ausente en procariotas, co-expresamos en *E. coli* las enzimas *TbE1a*, *TbE1b*, *TbE2* y *TbSUMO* con etiquetas apropiadas en dos vectores compatibles de la serie Duet (pCDFDuet-1-*TbSUMO*-*TbE2* y pACYCDuet-1-*TbE1a*-*TbE1b*). La proteína a SUMOilar fue co-expresada en el sistema completo con una etiqueta en su extremo C-terminal, para evaluar su patrón de modificación por Western blot en extractos bacterianos solubles. Esta estrategia nos permitió describir la formación de cadenas de poliSUMO *in vitro* y evaluar la SUMOilación de un sustrato modelo, como PCNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Para validar la modificación de esta proteína blanco realizamos ensayos de deconjugación *in vitro* empleando la proteasa recombinante *TbSENP*. Esta proteasa específica de *T. brucei* permite revertir el patrón de SUMOilación del sustrato observado por Western blot. Este sistema sencillo y versátil constituye una herramienta fundamental para la validación de potenciales sustratos de SUMOilación, generación de mutantes, estudios funcionales y determinación de sitios de SUMOilación.

ABSTRACT

SUMOylation is a widely studied post-translational modification of proteins in eukaryotes. This modification involves the covalent attachment of a small protein with structural homology to ubiquitin, called SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), to a lysine residue within the target protein, affecting its localization, stability, activity or interactions with other proteins. Normally a small fraction of a protein is SUMOylated and the effect of this modifier on its targets can not be predicted. SUMOylation is a dynamic and reversible modification associated with many cellular processes such as DNA replication and repair, chromatin remodeling, chromosome segregation, RNA metabolism, nuclear-cytoplasmic transport, among others. SUMOylation has proved to be essential in many organisms, including *Trypanosoma brucei*.

T. brucei is an extracellular parasite responsible for African trypanosomiasis or sleeping sickness in humans and *Nagana* in cattle. These diseases are characteristic of sub-Saharan African countries. The life cycle of this parasite comprises replicating and non-replicating forms in the tsetse fly vector and the infected mammal, but only two of them, the procyclic form (replicative in the fly mid-gut) and bloodstream form (replicative in bloodstream and other fluids of the mammal) are cultivated axenically. *T. brucei* has a sophisticated mechanism of antigenic variation to elude host's antibody response and ensure a persistent infection. Recently, this mechanism has been associated with still uncharacterized SUMOylated proteins.

Considering the importance of this post-translational modification we aimed to globally identify SUMOylated proteins in the parasite. To accomplish this, we developed transgenic procyclic and bloodstream lines in which the two alleles encoding for *TbSUMO* in the parasite were replaced by tagged variants to allow purification of SUMOylated proteins based on different affinity principles and subsequent identification by mass spectrometry. HisHA-*TbSUMO* cell line was useful to validate the tag functionality but *TbSUMO* conjugates were not enriched enough over contaminants after affinity purification. A Lys-deficient *TbSUMO* version, created to reduce contaminants by Lys-C digestion, was able to overcome this issue but did not allow mapping many SUMOylation sites. This cell line was in turn useful to demonstrate that polySUMO chains are not essential for parasite viability. To optimize these results, we also implemented a recently described strategy to express another tagged *TbSUMO* variant with a T106K mutation close to the C-terminal end of the protein. This modification generates a new cleavage site for the endoprotease Lys-C, allowing a small *TbSUMO* fragment of 114 Da (diglycine) to remain attached to the modified peptide after digestion with the enzyme. After an enrichment step with anti diglycine antibodies, the small T-shape peptides can be identified by mass spectrometry. Thus it is possible to identify SUMOylated proteins and SUMOylation sites in the same proteomic experiment. Following this methodology, we were able to unambiguously identify in procyclic parasites 52 SUMOylation sites in 44 proteins, many of them associated with important cellular processes, such as DNA replication and repair and RNA processing and degradation.

For further study of the SUMOylated proteins of interest we developed a specific SUMOylation system for *T. brucei*, reconstituting the SUMOylation machinery of this parasite in *Escherichia coli*. Since SUMO is absent in prokaryotes, we co-expressed *in bacteria* recombinant *TbSUMO*, *TbE1a*, *TbE1b*, and *TbE2* enzymes using two compatible Duet vectors (pCDFDuet-1-*TbSUMO*-*TbE2* and pACYCDuet-1-*TbE1a*-*TbE1b*). Additionally, we co-expressed in the complete system different SUMO targets with a 3xFlag tag at its C-terminal end to evaluate its SUMOylation pattern

by Western blot. We applied this strategy to describe the ability of *TbSUMO* to form chains *in vitro* and to detect SUMOylation of a model substrate, PCNA from *Saccharomyces cerevisiae*. To further validate targets, we applied an *in vitro* deconjugation assay using the *T. brucei* SUMO-specific protease capable to revert the pattern of modification. This simple and versatile system constitutes a useful tool for target validation, mutant generation, functional studies and determination of SUMOylation sites.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis han sido publicados en:

Biosynthesis of SUMOylated Proteins *in Bacteria* Using the *Trypanosoma brucei* Enzymatic System.

Iribarren PA, Berazategui MA, Cazzulo JJ, Alvarez VE.

PLoS One. 2015 Aug 10;10(8):e0134950. doi: 10.1371/journal.pone.0134950.

Different proteomic strategies to identify genuine Small Ubiquitin-like MOdifier targets and their modification sites in *Trypanosoma brucei* procyclic forms.

Iribarren PA, Berazategui MA, Bayona JC, Almeida IC, Cazzulo JJ, Alvarez VE.

Cell Microbiol. 2015 Oct;17(10):1413-22. doi: 10.1111/cmi.12467.

ABREVIATURAS

A	Amper
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Aos	Activation of Smt3p
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BS	<i>T. brucei</i> estadio sanguíneo
BSA	Seroalbúmina bovina
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
DAPI	4,6-diamidino -2 fenilindol
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxiciclina
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
E1	Enzima activadora
E2	Enzima conjugadora
E3	Enzima ligasa
EDTA	Ácido etilen-di-amino-tetraacético
F	Faradios
FA	Ácido Fórmico
FDR	Probabilidad de falso positivo
G418	Geneticina
GST	Glutación-S-transferasa
HA	Epitope de hemaglutinina
His	Tracto de 6 u 8 histidinas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IAA	Iodoacetamida
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertoni
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas
m/v	Masa en volumen
m/z	Relación masa carga
NEM	N-etilmaleimida
NP-40	Nonidet P-40 (octilfenoxi-polietoxietanol)
OD _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm

ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PC	<i>T. brucei</i> estadio procíclico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PAF	Paraformaldehído
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SAE	SUMO-activating enzyme
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SENP	Sentrin-specific protease
SFB	Suero fetal bovino
SIM	Motivo de interacción con SUMO
SL	Spliced leader
SMT	Supresor of Mif2 temperature-sensitive mutation
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TA	Temperatura ambiente
Taq	Termus aquaticus
TBE	Buffer tris borato EDTA
TBS	Buffer tris salino
TCA	Ácido tricloroacético
TDB	Buffer para dilución de <i>T. brucei</i> en estadio sanguíneo
Tet	Tetraciclina
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano
Uba	Ubiquitin activation enzyme
Ubc	Ubiquitin conjugating enzyme
Ubl	Ubiquitin-like protein
UI	Unidades Internacionales
Ulp	Ubiquitin-like protease
UTRs	Regiones no traducidas
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltios
VSG	Glicoproteína variable de superficie
v/v	Volumen en volumen
WT	Cepa silvestre
Ω	Ohm

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 Modificaciones post-traduccionales de proteínas.....	1
1.1 Modificación de proteínas por ubiquitina y proteínas similares a ubiquitina.....	1
1.2 Modificación de proteínas por SUMO.....	2
1.2.1 Sistema de SUMOilación.....	4
1.2.2 Descripción funcional del sistema enzimático de SUMOilación	5
1.2.3 Selección del sitio de SUMOilación.....	7
1.2.4 Efectos de la modificación por SUMO.....	8
2 Trypanosomátidos	10
2.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	10
2.1.1 Enfermedad del sueño	11
2.1.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	12
2.1.3 Variación antigénica	13
3 SUMOilación en trypanosomátidos.....	15
OBJETIVOS	18

----- PRIMERA PARTE -----

Identificación global de proteínas SUMOiladas

RESULTADOS	19
CAPÍTULO I - Primeras estrategias para la identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en <i>Trypanosoma brucei</i>	19
1.1 Generación de líneas celulares que expresan una versión modificada de <i>TbSUMO</i>	19
1.2 Confirmación del reemplazo y análisis de la proteína de fusión generada	22
1.2.1 Evaluación de las líneas celulares: análisis del reemplazo de los alelos de <i>TbSUMO</i>	22
1.2.2 Evaluación de las líneas celulares: análisis del patrón de SUMOilación por Western blot y de la localización subcelular de los conjugados por inmunofluorescencia indirecta	24
1.2.3 Evaluación de las líneas celulares: curvas de crecimiento.....	29
1.3 Purificación de proteínas SUMOiladas.....	30
1.4 Análisis proteómico: HisHA- <i>TbSUMO</i> S / HisHA- <i>TbSUMO</i> D.....	36
1.5 Validación <i>in vivo</i> de potenciales blancos de SUMOilación.....	39
1.6 Conclusiones parciales.....	43
CAPÍTULO II - Identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en <i>Trypanosoma brucei</i> : estrategia para la reducción de contaminantes e identificación de sitios de SUMOilación	44
2.1 Generación de líneas celulares que expresan una versión modificada de <i>TbSUMO</i>	44

2.2 Confirmación del reemplazo y análisis de la proteína de fusión generada	48
2.2.1 Evaluación de las líneas celulares: análisis del reemplazo de los alelos de <i>TbSUMO</i>	48
2.2.2 Evaluación de las líneas celulares: análisis del patrón de SUMOilación por Western blot y de la localización subcelular de los conjugados por inmunofluorescencia indirecta	49
2.2.3 Evaluación de las líneas celulares: curvas de crecimiento.....	52
2.3 Purificación de proteínas SUMOiladas.....	52
2.4 Análisis proteómico: HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R}	56
2.5 Conclusiones parciales.....	57
CAPÍTULO III - Identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en <i>Trypanosoma brucei</i> : estrategia para optimizar la identificación de sitios de SUMOilación.....	59
3.1 Generación de líneas celulares que expresan una versión modificada de <i>TbSUMO</i>	59
3.2 Evaluación de las líneas celulares y análisis de la proteína de fusión generada	62
3.2.1 Evaluación de las líneas celulares: análisis del patrón de SUMOilación por Western blot y de la localización subcelular de los conjugados por inmunofluorescencia indirecta	62
3.2.2 Evaluación de las líneas celulares: curvas de crecimiento.....	64
3.3 Purificación de proteínas SUMOiladas.....	64
3.4 Análisis proteómico: HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K}	67
3.5 Conclusiones parciales.....	70
DISCUSIÓN – Primera parte	72
----- SEGUNDA PARTE -----	
Herramientas para el estudio del sistema de SUMOilación	
RESULTADOS	86
CAPÍTULO IV - Desarrollo de un sistema de SUMOilación <i>in bacteria</i> específico de <i>Trypanosoma brucei</i>	86
4.1 Reconstitución de la maquinaria de SUMOilación de <i>T. brucei</i> en un sistema bacteriano..	86
4.2 Modificación de un sustrato modelo empleando el sistema de SUMOilación de <i>T. brucei</i> .	90
4.3 Estrategia para la validación de la modificación por <i>TbSUMO</i> : ensayos de deconjugación.....	93
4.4 Reconstitución del sistema de SUMOilación de <i>T. brucei in bacteria</i> : análisis de sustratos y potenciales aplicaciones	95
4.5 Conclusiones parciales.....	98
DISCUSIÓN – Segunda parte	99
MATERIALES Y MÉTODOS.....	102

1 Técnicas utilizadas para la Identificación global de proteínas SUMOiladas	103
1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo de parásitos	103
1.2 Construcción de plásmidos de expresión en <i>T. brucei</i>	103
1.3 Transfección de parásitos y generación de líneas celulares	105
1.4 Extracción de parásitos sanguíneos de sangre de ratas infectadas.....	108
1.5 Extracción de ADN genómico de parásitos y confirmación del reemplazo de <i>TbSUMO</i>	108
1.6 Análisis de crecimiento en cultivo.....	109
1.7 Inmunofluorescencia indirecta.....	109
1.8 Análisis de estabilidad de conjugados a <i>TbSUMO</i> y preparación de lisados totales de células	110
1.9 Purificación de proteínas y péptidos SUMOilados	111
1.10 Identificación de proteínas purificadas.....	112
1.11 Análisis bioinformático de sitios de SUMOilación	115
2 Técnicas utilizadas para el desarrollo de Herramientas para el estudio del sistema de SUMOilación.....	116
2.1 Construcción de plásmidos de expresión en <i>E. coli</i>	116
2.2 Reconstitución del sistema de SUMOilación del parásito <i>in vivo</i> en bacteria.....	118
2.3 Expresión de <i>TbSENP</i> recombinante.....	119
2.4 Ensayos de deconjugación de <i>TbSUMO</i>	119
3 Técnicas generales de biología molecular.....	121
3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	121
3.2 Electroforesis en gel de agarosa	121
3.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	122
3.4 Cuantificación de ADN purificado.....	122
3.5 Ligación de fragmentos de ADN.....	122
3.6 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	122
3.7 Preparación de bacterias competentes.....	122
3.8 Transformación de bacterias por golpe térmico	123
3.9 Purificación de ADN plasmídico	123
3.10 Secuenciación automática de ADN	124
4 Técnicas generales para el análisis de proteínas	125
4.1 Determinación de la concentración de proteínas.....	125
4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	125
4.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y Western blot.....	125
4.4 Tinción de geles de poliacrilamida	126
ANEXO	128
BIBLIOGRAFÍA	154

INTRODUCCIÓN

1 Modificaciones post-traduccionales de proteínas

Las **proteínas** son las biomoléculas más diversas y versátiles de un organismo, con un rol fundamental en la mayoría de los procesos biológicos conocidos. Las proteínas llevan a cabo una amplia **variedad de funciones** y estas pueden incluso **expandirse** por modificación de su estructura, ya sea por procesamientos proteolíticos o por unión covalente a moléculas de distinta naturaleza química. Las **modificaciones post-traduccionales** son frecuentemente reversibles, permitiendo respuestas celulares dinámicas ante estímulos externos. Estas modificaciones pueden alterar la funcionalidad de la proteína, generando por ejemplo cambios de actividad, localización subcelular y/o interacción con otros componentes celulares. Las modificaciones covalentes post-traduccionales más caracterizadas involucran la unión de moléculas orgánicas pequeñas, como la acetilación, metilación y fosforilación. Las proteínas también pueden unirse covalentemente a aminoácidos (poliglutaminación), carbohidratos (glicosilación) y lípidos (miristoilación, palmitoilación) e incluso a otras proteínas. En este último grupo encontramos a la **ubiquitina**, polipéptido pequeño estrictamente conservado en eucariotas, y **proteínas similares a ubiquitina (Ubls, ubiquitin-like proteins)**.

1.1 Modificación de proteínas por ubiquitina y proteínas similares a ubiquitina

La proteína **ubiquitina** fue inicialmente identificada en 1978 como un polipéptido pequeño termo-resistente, de aproximadamente 9 kDa, en un lisado de reticulocitos de conejo (Ciechanover, Hod et al. 2012). Esta proteína fue asociada inicialmente a la **degradación proteolítica** intracelular, no lisosomal, dependiente de ATP (Hershko, Ciechanover et al. 1980); sin embargo, actualmente se sabe que este modificador posee también **funciones no degradativas** (Komander and Rape 2012).

La ubiquitina es una proteína ausente en bacterias y arqueas, **evolutivamente conservada en eucariotas**. Desde su descubrimiento, han sido descritas otras proteínas pequeñas relacionadas con esta, conformando la familia de **Ubls**. En eucariotas superiores se han descrito aproximadamente 10, conocidas como SUMO, NEDD8, UCRP, FAT10, HAB, ISGN15, Apg8, Apg12, URM1 y An1. Las Ubls presentan baja similitud de secuencia aminoacídica con ubiquitina pero poseen alta **homología estructural**, presentando el plegamiento característico de ubiquitina, **β -grasp**.

La proteína ubiquitina y la mayor parte de las Ubls son sintetizadas como **precursores inmaduros**, que deben ser clivados proteolíticamente para exponer en su extremo C-terminal dos residuos de glicina. Este motivo diglicina es necesario para la conjugación de estos modificadores a los sustratos específicos. Este proceso, ATP dependiente, es llevado a cabo básicamente por una cascada enzimática que involucra enzimas activadoras (E1), conjugadoras (E2) y ligasas (E3) que permiten finalmente la formación de un **enlace isopeptídico** entre el **carboxilo terminal de la glicina** del modificador y el ϵ -amino de la **lisina modificada** en el sustrato. Esta modificación puede ser **revertida** por la acción de **proteasas deconjugadoras** específicas, en algunos casos también involucradas en el clivaje madurativo (Kerscher, Felberbaum et al. 2006).

De manera general, la proteína ubiquitina y las Ubls pueden unirse covalentemente a uno o varios residuos de lisina independientes, formando incluso, en algunos casos, distintos tipos de

estructuras catenarias. Las moléculas de estas cadenas se unen entre sí de la misma manera en que lo hacen a las proteínas sustrato, formando una unión isopeptídica entre el extremo C-terminal del modificador más distal y el ϵ -amino de un residuo de lisina de la molécula previa. La ubiquitina, por ejemplo, posee siete lisinas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), todas ellas involucradas en la **formación de cadenas** con distintas características y funciones asociadas (Herhaus and Dikic 2015). Las K11, K48 y K63 son los residuos mejor caracterizados involucrados en la poliubiquitinación, siendo las cadenas de al menos cuatro ubiquitinas, unidas a través de la K48, responsables de la degradación de sustratos via el proteasoma (Thrower, Hoffman et al. 2000; Komander and Rape 2012). La monoubiquitinación, por el contrario, ha sido vinculada a procesos como endocitosis y regulación transcripcional (Haglund and Dikic 2005). Recientemente se ha reportado además que esta proteína puede ser a su vez modificada post-traduccionalmente por otro tipo de moléculas. En particular, la acetilación de la ubiquitina en los residuos K6 y K48 previene la formación y elongación de cadenas, mientras que la fosforilación en múltiples residuos del modificador puede alterar el ciclo de ubiquitinación (Herhaus and Dikic 2015). Este hecho permite ejemplificar la gran diversidad de modificadores y su interacción dinámica, reflejando la complejidad del estudio de proteínas como ubiquitina y Ubls.

1.2 Modificación de proteínas por SUMO

La proteína **SUMO** (**S**mall **U**biquitin-like **M**odifier) fue descrita inicialmente a mediados de los 90 en *Saccharomyces cerevisiae* (Meluh and Koshland 1995). Esta proteína fue luego identificada como modificador post-traducciona l relacionado con ubiquitina, modulando el transporte núcleo-citoplasma de la proteína activadora de Ran-GTPasa, RanGAP1 (Matunis, Coutavas et al. 1996; Mahajan, Delphin et al. 1997).

Esta proteína pequeña de aproximadamente 12 kDa pertenece a la familia de Ubls dado que presenta alta similitud estructural con ubiquitina, pese a que su identidad de secuencia aminoacídica es inferior al 20%. Como puede visualizarse en la **Figura 1**, el dominio característico de ubiquitina, también presente en SUMO y otras Ubls, contiene un plegamiento de tipo β -grasp ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) (Iyer, Burroughs et al. 2006).

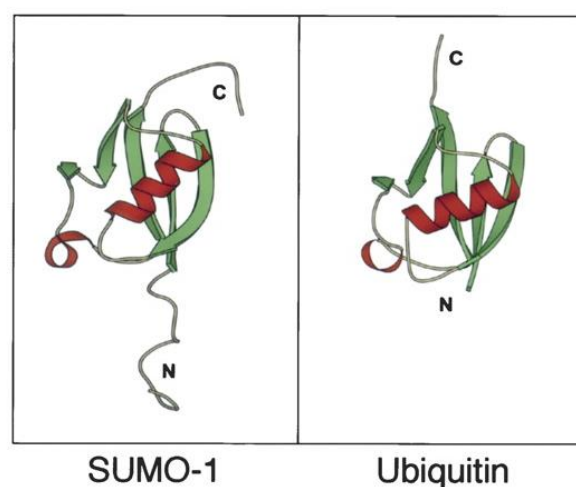


Figura 1. Estructura comparativa de SUMO1 y ubiquitina. Se observa la alta similitud de las estructuras tridimensionales de *HsSUMO1* [pdb 1A5R, (Bayer, Arndt et al. 1998)] y *HsUbiquitina* [pdb 1UBQ, (Vijay-Kumar, Bugg et al. 1987)]. Los elementos de estructura secundaria, hojas β y hélices α , se destacan en verde y rojo, respectivamente. Es posible observar la extensión N-terminal de SUMO, ausente en ubiquitina (Gill 2004).

A diferencia de ubiquitina y otras Ubls, las proteínas SUMO presentan una **extensión flexible** de entre 10-25 aminoácidos en su extremo **N-terminal** que ha sido asociada a la formación de cadenas de poliSUMO. La distribución de **cargas superficiales** constituye también otro punto diferencial entre ubiquitina y SUMO: la primera presenta cargas superficiales positivas, mientras que en la segunda predominan las cargas **negativas** (Gill 2004).

El número de genes que codifican para SUMO varía en los distintos eucariotas, encontrándose más de una isoforma de la proteína en algunos de ellos. En *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* existe sólo una copia del gen, mientras que en *Arabidopsis thaliana* existen ocho genes parálogos de SUMO. En mamíferos se han reportado cuatro **isoformas** de SUMO (SUMO1-2-3-4); las formas ya procesadas de SUMO2 y SUMO3 presentan un 97% de identidad de secuencia aminoacídica en humanos, a diferencia de SUMO1, con un 47% de identidad con SUMO2. Estas isoformas también se diferencian en los niveles de expresión, susceptibilidad a isopeptidasas y respuesta al estrés. A pesar de las diferencias descritas, muchos sustratos son modificados indistintamente por estas isoformas de SUMO, aunque existen también reportes de blancos modificados diferencialmente por ellas (Gareau and Lima 2010; Citro and Chiocca 2013; Flotho and Melchior 2013). SUMO1 se encuentra normalmente en su forma conjugada en células de mamíferos, mientras que SUMO2/3, cuya expresión es 10 veces superior a la de su parálogo, es detectado fundamentalmente en su forma libre (Saitoh and Hinchev 2000). A pesar de esto, los niveles de conjugación de ambas isoformas son equivalentes, dada la mayor tasa de deconjugación de sustratos modificados por SUMO2/3 (Kolli, Mikolajczyk et al. 2010). La cuarta isoforma descrita en humanos, SUMO4, es la identificada más recientemente y, en consecuencia, la menos estudiada. Esta proteína es similar a SUMO2/3 (87% identidad de secuencia aminoacídica) pero posee un residuo de prolina que dificulta su clivaje madurativo por las proteasas convencionales encargadas de la maduración de las otras isoformas. Por este motivo se especula la existencia de peptidasas específicas para este parálogo (Owerbach, McKay et al. 2005). A diferencia de las otras isoformas de SUMO, SUMO4 se expresa sólo en algunos tejidos (riñón, nódulos linfáticos, bazo) (Guo, Li et al. 2004). Se ha observado también su expresión en islotes pancreáticos, modificando factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune. De hecho, el gen que codifica para esta proteína ha sido asociado a susceptibilidad a diabetes (Wang and She 2008).

La formación de cadenas de SUMO es una característica controversial de algunas isoformas. Por ejemplo, SUMO (o Smt3) en levaduras y SUMO2/3 en humanos poseen al menos una lisina identificada dentro de sitios consenso de SUMOilación (Ver sección 1.2.3) en el extremo N-terminal, capaces de conjugarse con otras moléculas equivalentes para formar cadenas. Se cree que SUMO1, al carecer de sitios consenso, no podría formar cadenas convencionales *in vivo* pero estaría involucrado en la terminación de este tipo de estructuras (Matic and Hay 2012). Algunos reportes en mamíferos han identificado, sin embargo, cadenas de las tres isoformas de SUMO, involucrando también lisinas no-consenso (Hsiao, Meulmeester et al. 2009; Blomster, Imanishi et al. 2010; Matic, Schimmel et al. 2010; Bruderer, Tatham et al. 2011). La formación de cadenas de SUMO ha sido asociada a la meiosis en levaduras (Cheng, Lo et al. 2006), a procesos del cinetocoro en mamíferos (Zhang, Mikkonen et al. 2008) e incluso a la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina (Prudden, Pebernard et al. 2007; Sun, Leverson et al. 2007; Uzunova, Gottsche et al. 2007; Xie, Kerscher et al. 2007; Lallemand-Breitenbach, Jeanne et al. 2008; Mullen and Brill 2008; Tatham, Geoffroy et al. 2008). Cabe destacar que la formación de

cadena de proteínas Ubls puede involucrar incluso la interacción de distintos modificadores, como se observa en el caso de SUMO2/3 y ubiquitina, constituyendo cadenas mixtas (Aillet, Lopitz-Otsoa et al. 2012).

1.2.1 Sistema de SUMOilación

La SUMOilación es resultado de un **coordinado sistema enzimático**, similar al de ubiquitinación (Figura 2). Sin embargo, a pesar de que las enzimas conjugadoras de ambos sistemas presentan similitud estructural, estas son altamente **específicas** siendo incapaces de intervenir en la conjugación de un modificador ajeno al sistema al que pertenecen.

Inicialmente SUMO es sintetizado como un precursor inmaduro que luego es clivado por proteasas específicas para dejar expuesto un motivo diglicina en su extremo C-terminal, necesario para su conjugación. Este procesamiento es mediado por una familia de proteasas específicas de SUMO, conocidas como ubiquitin-like-protein-specific proteases (Ulp) en levaduras y sentrin-specific proteases (SENP) en mamíferos. La proteína madura es luego activada por una enzima E1 (heterodímero E1a/E1b) en una reacción de dos pasos dependiente de ATP, formándose un enlace tioéster entre el carboxilo terminal de SUMO (glicina) y la cisteína catalítica de E1b. La proteína SUMO activada es luego transferida por trans-esterificación a otra cisteína en la enzima conjugadora E2, encargada de catalizar la formación de un enlace isopeptídico entre el C-terminal de SUMO y el ϵ -amino de la lisina modificada en la proteína blanco (Johnson, Schwienhorst et al. 1997; Saitoh, Sparrow et al. 1998). Esta reacción en algunos casos es asistida por ligasas E3 que facilitan la conjugación de SUMO a sustratos específicos.

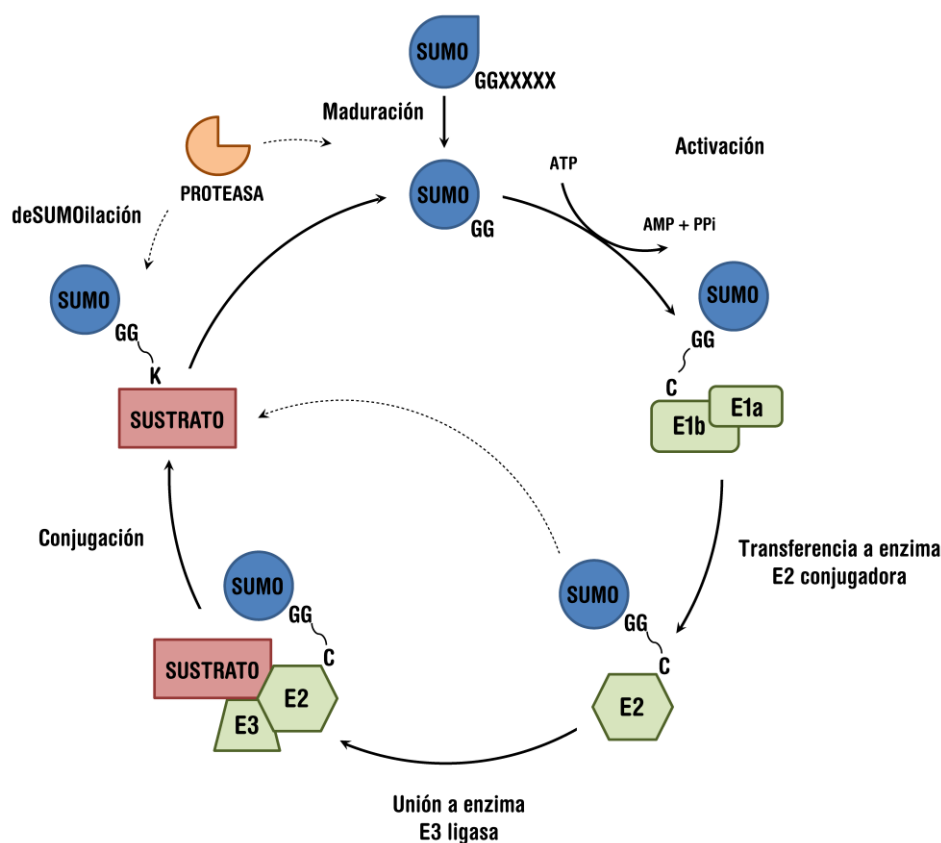


Figura 2. Sistema de SUMOilación. El precursor de SUMO es madurado por acción de proteasas específicas que presentan actividad hidrolítica, exponiendo un motivo diglicina (GG) en su extremo C-terminal. La conjugación del modificador a sus sustratos ocurre mediante una cascada enzimática que involucra la activación mediada por una enzima E1, una enzima E2 conjugadora y en ocasiones una ligasa E3. La unión covalente de SUMO ocurre mediante la formación de un enlace isopeptídico entre la glicina C-terminal de SUMO y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina presente en el sustrato. La SUMOilación es un proceso reversible y esto se debe a la acción de proteasas específicas de SUMO que presentan actividad isopeptidasa.

La SUMOilación es una modificación **dinámica y reversible** dada la actividad de proteasas específicas (Ulp1, SENPs) que clivan el enlace isopeptídico que une a SUMO con su sustrato (Hickey, Wilson et al. 2012).

1.2.2 Descripción funcional del sistema enzimático de SUMOilación

Enzima activadora E1

La enzima activadora de SUMO, E1, es un heterodímero formado por las subunidades E1a (SAE1 en mamíferos y Aos1 en levaduras) y E1b (SAE2 en mamíferos y Uba2 en levaduras) (Johnson, Schwienhorst et al. 1997; Desterro, Rodriguez et al. 1999). La activación de SUMO catalizada por esta enzima ocurre en una reacción de dos pasos, en la que SUMO es inicialmente adenilado por hidrólisis de una molécula de ATP, con liberación de pirofosfato (PPi). Posteriormente, se produce la remodelación del sitio activo de E1b para permitir la formación del enlace tioéster de alta energía entre el extremo C-terminal de SUMO y la cisteína catalítica de esta subunidad. El dominio C-terminal de E1b interactúa y recluta a la enzima E2, necesaria para el proceso de conjugación (Lois and Lima 2005).

Enzima conjugadora E2

La enzima conjugadora E2 (Ubc9 en mamíferos y levaduras) permite la conjugación de SUMO activado a sus sustratos (Johnson, Schwienhorst et al. 1997), formando un enlace tioéster flexible entre su cisteína catalítica y el extremo C-terminal del modificador. A diferencia de ubiquitina (que posee alrededor de 40 enzimas E2) sólo se ha descrito una única enzima conjugadora de SUMO en eucariotas, con localización predominantemente nuclear, aunque también puede visualizarse en menor medida en el citoplasma (Saitoh, Pu et al. 1997). El extremo N-terminal de la proteína es capaz de interactuar de manera no covalente con SUMO, participando también en la selección de sustratos de SUMOilación al unirse de manera directa, a través de una región adyacente a la cisteína catalítica, a sitios de SUMOilación consenso presentes en muchos sustratos (Ψ KXE/D; Ver sección 1.2.3) (Lin, Tatham et al. 2002).

Esta proteína ha sido descrita como SUMOilada en su K14, alterando esta modificación su interacción con distintos blancos (Knipscheer, Flotho et al. 2008).

Enzimas E3 ligasas

Las E3 ligasas catalizan la transferencia de SUMO desde la enzima conjugadora E2 a la lisina que será modificada en la proteína blanco. Muchas proteínas han sido identificadas como ligasas de SUMO pero solamente aquellas que presentan esta actividad en cantidades subestequiométricas pueden considerarse auténticas E3.

Estas proteínas pueden catalizar la transferencia de SUMO a sus sustratos mediante diversos mecanismos: (i) interactuando con el complejo E2-SUMO (y no necesariamente con el sustrato) para posicionarlo en una orientación óptima para favorecer la transferencia del modificador; (ii) reclutando por interacción directa el complejo E2-SUMO y el sustrato, para facilitar la conjugación. Este mecanismo es importante para la SUMOilación de residuos de lisina que no forman parte de sitios de SUMOilación consenso.

Es importante destacar que algunas E3 ligasas caracterizadas presentan especificidad de sustrato, mientras que otras muestran también preferencia por isoformas específicas de SUMO (Gareau and Lima 2010).

Existen dos familias de E3 ligasas ampliamente caracterizadas. El grupo principal está formado por proteínas que poseen un dominio conservado SP-RING (Siz/PIAS RING-finger-like domain), esencial para su función, similar al presente en ligasas de ubiquitina. Estas ligasas pueden unir SUMO a sus sustratos reclutando el complejo E2-SUMO para facilitar su conjugación. El dominio SP-RING es necesario para la interacción de estas proteínas con E2, mientras que regiones adyacentes a este median el reconocimiento de los distintos sustratos. Dentro de este grupo encontramos a las proteínas Siz1, Siz2 (SAP and Miz finger domain) y Mms21 en levaduras (Johnson and Gupta 2001; Takahashi, Kahyo et al. 2001; Zhao and Blobel 2005) y la familia de proteínas PIAS (protein inhibitor of activated STAT) en humanos, con seis miembros: PIAS1, PIAS α , PIAS β , PIAS3, PIAS γ y Nse2/Mms21 (Kahyo, Nishida et al. 2001; Sachdev, Bruhn et al. 2001; Sapetschnig, Rischitor et al. 2002; Schmidt and Muller 2002; Andrews, Palecek et al. 2005; Potts and Yu 2005). Aunque muchas de las funciones atribuidas a estas proteínas se relacionan con su actividad E3 ligasa, otras dependen de su interacción no covalente con proteínas SUMOiladas.

El segundo grupo de E3 ligasas, está representado por la proteína RanBP2 o Nup358 (proteína 2 de unión a Ran y nucleoporina de 358 kDa), exclusiva de vertebrados. Esta ligasa, que cataliza la SUMOilación de RanGAP1, se localiza en el complejo de poro nuclear, regulando el transporte núcleo-citoplasma (Reverter and Lima 2004). Esta proteína, junto con RanGAP1 SUMOilada y Ubc9, forma un complejo multimérico de relevancia fisiológica con actividad E3 ligasa (Werner, Flotho et al. 2012).

Además de las hasta aquí mencionadas, han sido reportadas otras proteínas con actividad E3 ligasa. Entre ellas podemos destacar a la proteína Pc2 (polycomb protein Pc2), la cual forma parte de complejos multiméricos (PcG bodies) involucrados en el silenciamiento de genes (Kagey, Melhuish et al. 2003).

Proteasas de SUMO

Las enzimas encargadas de la deconjugación del modificador de sus blancos poseen actividad isopeptidasa, clivando de manera específica la unión entre la glicina C-terminal de SUMO y la lisina del sustrato. Todas las peptidasas de SUMO conocidas hasta el momento son cisteín proteasas que pueden clasificarse en tres grupos principales: proteasas Ulp/SEN, proteasas Desi (deSUMOylating isopeptidase) y USPL (ubiquitin-specific peptidase-like protein).

Las proteasas Ulp/SEN fueron las primeras proteasas de SUMO en ser descubiertas y constituyen el grupo más estudiado hasta el momento. Estas proteasas pertenecen al clan CE y presentan un dominio catalítico C-terminal conservado C48, con la triada catalítica His-Asp-Cys. En levaduras solo se han identificado dos deSUMOilasas de esta familia, Ulp1 y Ulp2, mientras que en humanos se conocen 6 miembros; cuatro de ellos (SEN-1, SEN-2, SEN-3 y SEN-5) presentan homología a Ulp1 mientras que los dos restantes, SEN-6 y SEN-7, se encuentran relacionados con la proteasa Ulp2. Las enzimas Ulp1 y Ulp2 poseen actividad isopeptidasa sobre una gran variedad de blancos de SUMOilación. Sin embargo, ambas presentan una alta especificidad de sustrato y cumplen roles particulares dentro del sistema de SUMOilación. La proteasa Ulp1 y sus homólogos presentan actividad hidrolasa, siendo responsables del proceso de maduración de SUMO; mientras que la proteasa Ulp2 y sus homólogos tienen la capacidad

de editar cadenas de poliSUMO. Las proteasas SENP muestran además especificidad por las distintas variantes de SUMO. Además de poseer el dominio C48 conservado, las proteasas Ulp/SENP presentan regiones N-terminales no conservadas de longitud variable, con funciones regulatorias vinculadas a su localización subcelular. Es posible que la ubicación diferencial de estas proteasas, Ulp1 en el complejo del poro nuclear y Ulp2 en el nucleoplasma, junto con dominios de interacción con otras proteínas presentes en esta región, contribuyan a la especificidad de sustrato (Mukhopadhyay and Dasso 2007).

Las proteasas Desi fueron descritas recientemente, en el año 2012. Las deSUMOilasas de esta familia pertenecen al clan CP y presentan en su extremo N-terminal un dominio proteasa conservado C97, con la diada catalítica His-Cys. Actualmente se conocen dos proteasas Desi (Desi 1 y Desi 2) con un 23% de identidad de secuencia aminoacídica entre sí. Ensayos de localización subcelular demostraron que Desi 1 se localiza en el citoplasma y en el núcleo, mientras que Desi 2 se encuentra principalmente distribuida en el citoplasma. Desi 1 parece no tener actividad sobre sustratos de las proteasas SENP y hasta el momento se conoce un único blanco para esta enzima: el represor de transcripción BZEL (BTB-ZF protein expressed in effector lymphocytes). Se especula que el número de sustratos reconocidos por estas proteasas es limitado (Shin, Shin et al. 2012).

La proteasa USPL1 es la única deSUMOilasa conocida de la familia C98, presentando la triada catalítica Cys-His-Asp. A diferencia de Ulp y Desi (sin homología con las proteasas de ubiquitina), el dominio catalítico de esta enzima presenta homología con la familia C19 de deubiquitininas. A pesar de esto, USPL1 no tiene capacidad de unir ni clivar ubiquitina y ha demostrado ser una eficiente deSUMOilasa. USPL1 presenta actividad isopeptidasa sobre una gran variedad de sustratos e incluso sobre cadenas de poliSUMO y, aunque es menos eficiente que Ulp/SENP, también es capaz de clivar el precursor inmaduro. Esta deSUMOilasa se localiza en el núcleo, específicamente en los cuerpos de Cajal, siendo esencial para la viabilidad celular. Este hecho no parece estar relacionado, sin embargo, con su actividad como deSUMOilasa (Schulz, Chachami et al. 2012).

1.2.3 Selección del sitio de SUMOilación

La selección de la lisina a SUMOilar dentro de las distintas proteínas blanco depende de varios factores. En particular, se han postulado tres mecanismos que, de manera independiente o combinada, determinan esto.

El primer mecanismo propuesto (**Figura 3 A**) involucra la modificación de residuos de lisina dentro de **sitios de SUMOilación consenso**. Estos pequeños motivos Ψ KXE/D (donde Ψ es un aminoácido hidrofóbico, K es la lisina modificada por SUMO, X es un aminoácido cualquiera y E/D pueden ser, alternativamente, el ácido glutámico o el aspártico) (Rodríguez, Dargemont et al. 2001) son reconocidos, como parte de una estructura extendida, de manera directa por E2 (Bernier-Villamor, Sampson et al. 2002; Pichler, Knipscheer et al. 2005). La interacción descrita justifica la SUMOilación de sustratos en presencia de altas concentraciones de E2 observada *in vitro*, en ausencia de E3 ligasas (Flotho and Melchior 2013). Se cree que estos sitios consenso están presentes en más de la mitad de los sustratos de SUMO (Matic, Schimmel et al. 2010), aunque existen otros motivos de SUMOilación, menos frecuentes, dependientes incluso de

fosforilación de residuos cercanos a la lisina modificada (Hietakangas, Anckar et al. 2006; Yang, Galanis et al. 2006; Picard, Caron et al. 2012).

El segundo mecanismo propuesto (**Figura 3 B**) involucra la interacción del sustrato con SUMO (unida a E2) vía **motivos SIM** (SUMO Interaction Motif), favoreciendo la modificación de residuos de lisina cercanos a la zona de contacto. Los motivos SIM son los motivos de interacción con SUMO más estudiados (aunque no los únicos) y constituyen regiones hidrofóbicas asociadas a la secuencia consenso [V/I]-x-[V/I][V/I] (Song, Durrin et al. 2004). Los sustratos modificados de esta manera suelen SUMOilarse en múltiples residuos de lisina, no necesariamente dentro de sitios de SUMOilación consenso. De la misma manera, en aquellos sustratos con motivos SIM y residuos de lisina dentro de sitios consenso se observa un aumento significativo de su modificación tras la SUMOilación de E2 (Knipscheer, Flotho et al. 2008). Es importante destacar que la mutación de las lisinas modificadas de esta manera no impide necesariamente la SUMOilación de la proteína, mientras existan otros residuos accesibles (**sitios críticos de SUMOilación**).

El tercer mecanismo propuesto (**Figura 3 C**) involucra sustratos que dependen de **enzimas E3 ligasas** para su SUMOilación. Los residuos de lisina de este modo modificados no resultan accesibles a E2-SUMO por los mecanismos anteriormente mencionados.

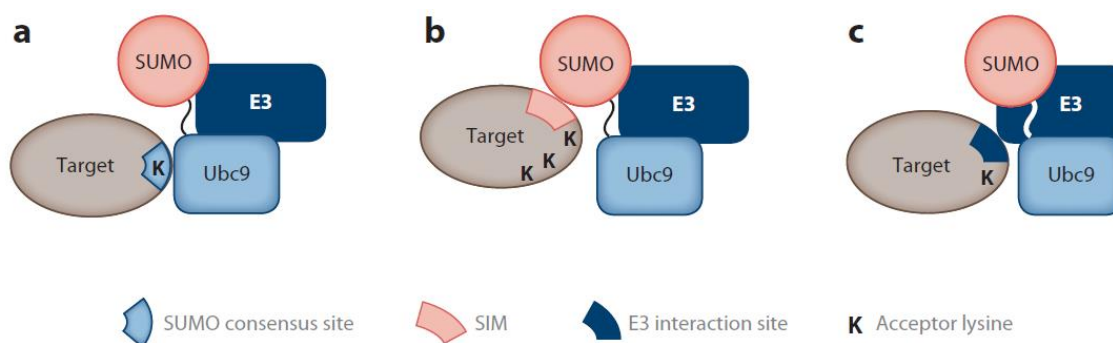


Figura 3. Mecanismos de selección del sitio de SUMOilación. (a) SUMOilación dependiente de sitios consenso; (b) SUMOilación dependiente de motivos SIM; (c) SUMOilación dependiente de E3 ligasas (Flotho and Melchior 2013).

1.2.4 Efectos de la modificación por SUMO

A partir de su descubrimiento, el número de proteínas identificadas como sustrato de este modificador ha crecido exponencialmente. A nivel molecular SUMO altera la superficie de las proteínas a las que se une, modificando su interacción con otras macromoléculas. De esta manera, SUMO puede interferir o promover interacciones proteína-proteína de distintas maneras, enmascarando por ejemplo sitios de unión, adicionando nuevos presentes en el modificador o generando cambios conformacionales en la proteína blanco que expongan nuevos sitios de interacción o alteren su actividad, estabilidad y/o localización (Geiss-Friedlander and Melchior 2007). De esta manera la SUMOilación puede regular la actividad de una proteína de diferentes formas sin poder predecirse *a priori* el efecto que tendrá sobre el sustrato modificado.

La **mayoría** de las proteínas identificadas como **sustratos de SUMOilación** hasta el momento son, al igual que la localización subcelular de **SUMO**, **fundamentalmente nucleares**, aunque

existen reportes de proteínas mitocondriales (Harder, Zunino et al. 2004), de membrana plasmática (Benson, Li et al. 2007) o de retículo endoplasmático (Dadke, Cotteret et al. 2007) conjugadas al modificador.

Generalmente sólo una pequeña fracción de una proteína, menor al 5%, se encuentra SUMOilada, siendo esta cantidad suficiente para evidenciar la relevancia de esta Ubl. La SUMOilación se encuentra involucrada en una gran variedad de procesos celulares como replicación del ADN, regulación transcripcional, respuesta al daño al ADN, control epigenético, metabolismo del ARN, transporte núcleo-citoplasma, degradación de proteínas, progresión del ciclo celular, respuesta al estrés, etc. Recientemente se ha postulado incluso la SUMOilación simultánea de varias proteínas pertenecientes a un mismo proceso biológico, definiéndose el concepto de **SUMOilación de grupo** (Psakhye and Jentsch 2012).

Su relevancia en algunos de los procesos más estudiados se ejemplifica a continuación.

Regulación de la transcripción

Muchos sustratos de SUMOilación identificados regulan la expresión génica a nivel transcripcional, como factores de transcripción y reguladores de la estructura de la cromatina, en respuesta a distintos estímulos (Enserink 2015). La SUMOilación de factores de transcripción ha sido ampliamente estudiada y se ha asociado tanto a procesos de represión como de estimulación de la transcripción. Se ha descrito por ejemplo la unión de corepresores, como los complejos de histonas deacetilasas (HDACS), a versiones SUMOiladas de factores de transcripción (García-Domínguez and Reyes 2009). De hecho, la SUMOilación de histonas ha sido asociada directamente a la represión de la transcripción (Shiio and Eisenman 2003; Nathan, Ingvarsdottir et al. 2006). En contraposición, la SUMOilación de los factores de transcripción de choque térmico HSF1 y HSF2 estimula su función, siendo esta alterada por mutación de lisinas involucradas en la modificación (Goodson, Hong et al. 2001). Un efecto similar se observa sobre la actividad transcripcional de p53, al SUMOilarse tras exposición a rayos UV (Gostissa, Hengstermann et al. 1999).

Localización subcelular

Inicialmente la SUMOilación de proteínas se relacionó directamente con la determinación de la localización subcelular de las proteínas modificadas. La proteína RanGAP1, el primer sustrato de SUMOilación descrito, cambia su localización citosólica tras su modificación por SUMO, interaccionado con la nucleoporina RanBP2 y anclándose al complejo de poro nuclear (Mahajan, Delphin et al. 1997). De manera contrapuesta, la proteína MEK1 (MAP kinasa involucrada en el proceso de quimiotaxis) se relocaliza del núcleo al citoplasma tras su SUMOilación en *Dictyostelium* (Sobko, Ma et al. 2002).

Degradación de proteínas

Dado que tanto SUMO como ubiquitina se unen al ϵ -amino de residuos de lisina, pueden competir de manera directa en la modificación de sustratos. Por esta razón SUMO puede impedir la degradación de proteínas por el proteasoma al bloquear su unión a ubiquitina. Un ejemplo de este tipo de interacciones lo constituye la SUMOilación del inhibidor del factor de transcripción NF- κ B (I κ B), que previene su degradación y, en consecuencia, la translocación al núcleo de NF- κ B, al bloquear su ubiquitinación (Desterro, Rodríguez et al. 1998). De manera contrapuesta

SUMO puede promover la degradación de sustratos por el proteasoma, como se observa en proteínas asociadas a fibrosis quística (Gong, Ahner et al. 2016).

La diversidad y relevancia de los procesos mencionados permiten evidenciar el rol fundamental de este modificador en la biología celular. De hecho, SUMO ha demostrado ser esencial en muchos eucariotas (Flotho and Melchior 2013), incluso en nuestro modelo de estudio: *Trypanosoma brucei* (Liao, Wang et al. 2010; Obado, Bot et al. 2011).

2 Trypanosomátidos

La familia trypanosomatidae comprende un grupo de protistas flagelados. Como parte del orden Kinetoplástida, estos eucariotas se caracterizan por poseer una única mitocondria de gran tamaño que concentra su ADN en una estructura particular, llamada **kinetoplasto**, asociada al cuerpo basal del flagelo. En particular, los trypanosomátidos son parásitos unicelulares que infectan organismos vertebrados e invertebrados. Dentro de este género podemos destacar dos especies de relevancia médica: *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana y *Trypanosoma brucei*, responsable de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana. Si bien el estudio de *T. cruzi* resulta de interés al ser responsable de una enfermedad endémica en Argentina, las dificultades asociadas a su manipulación genética hacen que para el análisis de algunos procesos celulares básicos se utilice el parásito relacionado *T. brucei*. Este organismo presenta la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi) y puede ser modificado genéticamente con mayor facilidad.

2.1 *Trypanosoma brucei*

T. brucei es uno de los protozoarios más estudiados en la actualidad. Este parásito es **diploide** para la mayoría de sus genes y presenta algunas **características particulares** que lo diferencian de otros eucariotas. Posee peroxisomas no convencionales (llamados glicosomas), conteniendo las primeras siete enzimas de la glicólisis, acidocalcisomas, involucrados en la osmoregulación, y organelas en copia única (bolsillo flagelar, aparato de Golgi, mitocondria, núcleo). Estas últimas tienen una posición específica dada por el citoesqueleto, concentrándose entre el extremo posterior y el centro del parásito.

La **transcripción** en estos parásitos es mayormente **policistronica**, donde las secuencias codificantes de proteínas no necesariamente relacionadas (Colasante, Robles et al. 2007) **raramente** se encuentran interrumpidas por **intrones** (Clayton 2002). Estos transcritos son procesados por poliadenilación en el extremo 3' y adición de una secuencia específica, el mini-exón o *spliced leader* (SL), al extremo 5', por **trans-splicing** (De Lange, Liu et al. 1983).

Los aproximadamente 10000 genes codificantes de proteínas en el parásito son transcritos por la **ARN polimerasa II** (ARN pol II) aunque, a excepción del gen SL (Das, Zhang et al. 2005), **no se han identificado promotores** para esta polimerasa en el genoma del parásito. Dado que la transcripción de grandes porciones del genoma es constitutiva la **expresión de proteínas** es fundamentalmente **regulada** por control de la **estabilidad del ARNm**, y a nivel **traduccional** y **post-traduccional** (Achcar, Kerkhoven et al. 2014).

De manera muy peculiar, los genes codificantes de **antígenos de superficie** (prociclina y VSG, Variant Surface Glycoprotein) son **transcritos por la ARN polimerasa I** (ARN pol I), enzima que normalmente no transcribe ARNm en otros eucariotas.

2.1.1 Enfermedad del sueño

T. brucei es el agente causal de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño en humanos y del *Nagana* en ganado. Estas enfermedades son exclusivas de 36 países del continente africano donde habita su vector transmisor, la mosca tse-tse del género *Glossina*. Gracias a la implementación de programas de control, la incidencia de la enfermedad ha disminuido en los últimos años. En 2009, el número de casos notificados se redujo a menos de 10000 por primera vez en 50 años y en 2013 se registraron 6314 personas infectadas. En **2014**, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró **3796 casos nuevos**, siendo la República Democrática del Congo el país más afectado, con más de 3000 casos reportados. Sin embargo, dada la dificultad de acceso a muchas áreas y la falta de reportes de numerosos países en riesgo, se cree que estos valores están **subestimados**, siendo el número real de casos nuevos cercano a 20000. En base a estos datos se estima que la población expuesta, con riesgo de contraer la enfermedad, es de aproximadamente 65 millones de personas.

Las dos subespecies involucradas en la enfermedad en humanos son: *T. brucei rhodesiense* en el este y sur de África, responsable del 2% de los casos reportados, causando **infección aguda**; y *T. brucei gambiense* en el oeste y centro del continente, responsable del 98% de los casos reportados y causante de una **infección crónica**. Las personas más expuestas a contraer la enfermedad son habitantes de zonas rurales, dedicados a la agricultura, ganadería, pesca y caza. En África sub-sahariana *T. brucei brucei* es el agente causal del *Nagana*, con severos efectos sobre la ganadería. Esta última subespecie es la que se utiliza con mayor frecuencia en estudios de laboratorio.

Aunque la transmisión de la enfermedad ocurre fundamentalmente por la picadura de la mosca tse-tse, existen también otras vías de contagio que incluyen la transmisión vertical de madre a hijo, mecánica por intermedio de otros insectos hematófagos e incluso por contacto sexual.

El cuadro clínico de la enfermedad es variado y en su desarrollo pueden diferenciarse dos etapas. En la primera, los parásitos se multiplican en tejidos subcutáneos, sangre y linfa (fase hemolinfática) observándose episodios de fiebre, cefaleas, dolores articulares y prurito. Esta etapa suele ser prolongada e incluso asintomática. En la segunda etapa, los parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica, accediendo al sistema nervioso central (fase neurológica o meningoencefálica). Esta etapa es la más severa, observándose en los pacientes cambios comportamentales, confusión, falta de coordinación, trastornos sensoriales y del ciclo del sueño. Aunque se han reportado casos de portadores sanos, la enfermedad tiene un desenlace mortal sin el tratamiento adecuado. Su diagnóstico y tratamiento son complejos y exigen la intervención de personal especializado. Algunos de los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la enfermedad en humanos han sido desarrollados hace más de 60 años y presentan alta toxicidad y resistencia. Entre ellos encontramos la pentamidina, suramina, melarsoprol y, más recientemente, eflornitina y nifurtimox. Teniendo en cuenta estas consideraciones el desarrollo de nuevas drogas es de vital importancia para el control y tratamiento de esta enfermedad tropical desatendida (OMS; www.who.int).

2.1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*

El ciclo de vida de *T. brucei* es complejo e involucra diferentes formas o estadios en sus dos hospedadores: el insecto vector (mosca tse-tse) y el mamífero en el que desarrolla la enfermedad. En cada hospedador es posible encontrar diferentes formas o estadios del parásito, con características estructurales y metabólicas distintivas que le permiten adaptarse a los distintos ambientes en los que se desarrolla (Figura 4).

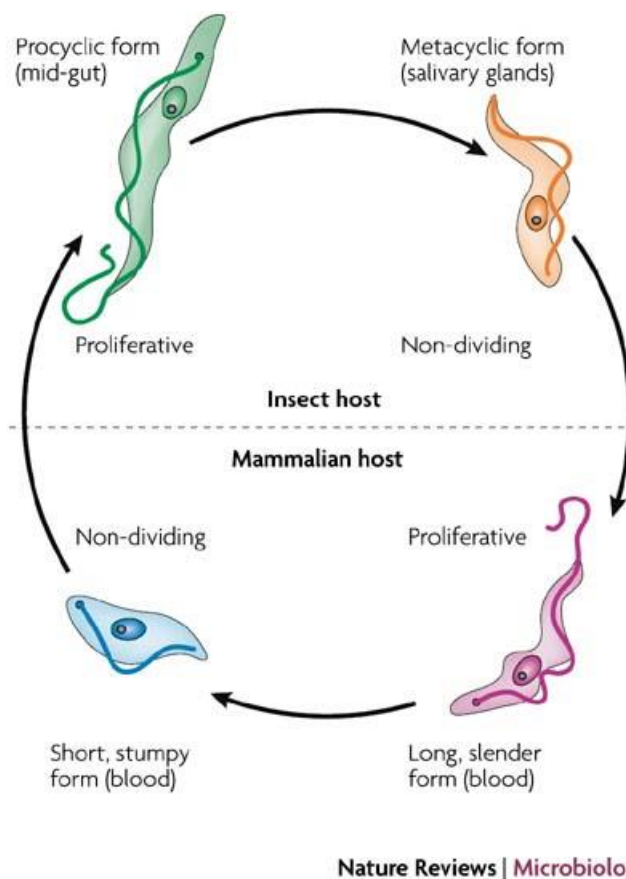


Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Representación simplificada del ciclo de vida del parásito resaltando los estadios más relevantes presentes en cada hospedador (Lee, Stephens et al. 2007).

Encontramos así formas replicativas que dan paso a otras pre-adaptadas al siguiente hospedador, sin capacidad de división. En la mosca infectada los parásitos se replican en el intestino del insecto en su estadio **procíclico (PC)**. Cuando alcanzan cierta densidad, estos parásitos dejan de dividirse y migran a las glándulas salivales, donde quedan sujetos al epitelio y replican nuevamente como epimastigotes. Aquí, algunos de estos parásitos se diferencian al estadio metacíclico. Este estadio de *T. brucei* no puede dividirse y constituye la forma infecciosa del parásito. Cuando una mosca infectada pica a un mamífero inyecta tripomastigotes metacíclicos en el torrente sanguíneo del hospedador. Estos parásitos se diferencian a tripomastigotes **sanguíneos alargados** o *slender (BS)*, multiplicándose por fisión binaria en

distintos fluidos corporales como sangre, linfa y líquido cefalorraquídeo. Parte de la población parasitaria deja luego de dividirse, diferenciándose a tripomastigotes cortos o *stumpy*, forma no replicativa pre-adaptada al vector. El ciclo se cierra cuando una mosca pica a un hospedador mamífero infectado y, junto con su sangre, absorbe tripomastigotes cortos, que pasan al intestino del insecto donde se diferencian al estadio PC, reiniciando el ciclo (www.cdc.gov).

Las formas del parásito más frecuentemente estudiadas son la forma procíclica (replicativa en el intestino del vector) y sanguínea alargada (replicativa en sangre y líquidos tisulares del mamífero). Estos dos estadios han sido adaptados al cultivo *in vitro*, perdiendo su capacidad de completar el ciclo (monomórficos).

A diferencia de otros trypanosomátidos que cumplen etapas de su ciclo dentro de las células de los mamíferos que infectan, *T. brucei* es un parásito extracelular que en todo momento se encuentra expuesto al sistema inmunológico del hospedador. Sin embargo, estos parásitos logran evadir la respuesta inmune mediante un mecanismo complejo y sofisticado de variación antigénica de sus proteínas de superficie.

2.1.3 Variación antigénica

Los parásitos procíclicos se encuentran recubiertos de proteínas prociclinas, ricas en prolina y ácido glutámico. Los parásitos sanguíneos, en cambio, presentan sobre su superficie una cubierta densa (aproximadamente 10^7 moléculas) de un único tipo de glicoproteína VSG, que varía de manera estocástica con cierta frecuencia en la población (10^{-2} - 10^{-5}) permitiéndole al parásito evadir la respuesta humoral montada por el hospedador contra la VSG mayoritaria (Figura 5). Este hecho posibilita la infección persistente y dificulta el desarrollo de vacunas efectivas.

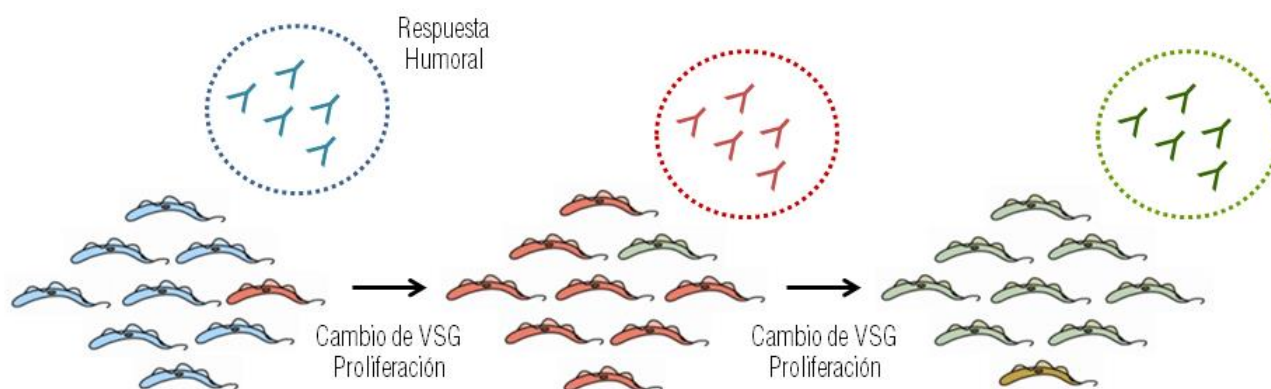


Figura 5. Evasión de la respuesta inmune. La forma sanguínea del parásito está cubierta por una capa densa de un único tipo de VSG, que cambia de manera estocástica en la población, permitiéndole al parásito evadir la respuesta humoral montada por el hospedador contra la VSG mayoritaria.

Existen más de mil copias de genes VSG y pseudo-VSG en el genoma del parásito (Berriman, Ghedin et al. 2005) pero aproximadamente solo 20 se encuentran en regiones conocidas como **sitios de expresión del gen VSG (VSG-ES, VSG Expression Site)** (Navarro and Cross 1996;

Pays and Nolan 1998). Estos sitios de expresión, localizados en regiones subteloméricas de cromosomas grandes e intermedios, son unidades policistrónicas de 40 a 60 kb que se extienden desde el promotor hasta el gen VSG y contienen genes asociados al sitio de expresión (ESAGs, Expression Site Associated Genes) de función desconocida, y repeticiones cortas de 50 y 70 pb. En la forma sanguínea del parásito solo uno de los 20 VSG-ES se encuentra activo en un momento dado y se lo conoce como **VSG-ES activo** (Borst 2002).

En la actualidad se han identificado varios mecanismos para explicar este proceso de variación antigénica. El más frecuente involucra la recombinación homóloga: un gen VSG donador se duplica al VSG-ES activo (**conversión génica**) (Robinson, Burman et al. 1999) o se intercambian dos genes VSG (**intercambio telomérico**) (Aitchison, Talbot et al. 2005) o dos fragmentos teloméricos completos con sus genes VSG asociados (**conversión telomérica**) (Aitchison, Talbot et al. 2005). El otro mecanismo descrito no se basa en procesos de recombinación, sino que involucra la activación de un nuevo VSG-ES, antes inactivo, con la concomitante inactivación del que se expresaba con anterioridad (**cambio *in situ***) (Cross, Wirtz et al. 1998).

De manera complementaria, la **expresión monoalélica** es crucial para la evasión de la respuesta inmune. Este proceso complejo permite el silenciamiento de los genes VSG en parásitos PC y de todos los VSG-ES, a excepción del activo, en BS (Kooter and Borst 1984). Aunque los mecanismos moleculares que la regulan son mayoritariamente desconocidos, algunos modelos han sido propuestos. Uno de ellos es el modelo de **compartimentación nuclear**. Como fue mencionado anteriormente, la expresión de la **VSG activa** en parásitos sanguíneos, y de la prociclina en procíclicos, es llevada a cabo por la **ARN pol I** (Rudenko and Van der Ploeg 1989; Navarro and Gull 2001; Gunzl, Bruderer et al. 2003) (complejo que normalmente no transcribe ARNs codificantes en otros eucariotas), en asociación con la subunidad RPB7, parte del complejo de la ARN pol II en eucariotas (Penate, Lopez-Farfan et al. 2009). La transcripción de prociclina y ADN ribosomal llevada a cabo por esta polimerasa ocurre en el nucléolo mientras que la transcripción del VSG-ES activo ocurre en un cuerpo extranucleolar que también contiene ARN pol I, denominado **ESB (Expression Site Body)** (Navarro and Gull 2001; Landeira and Navarro 2007). Este cuerpo extranucleolar se asocia exclusivamente al VSG-ES activo (**Figura 6**), sugiriendo que el reclutamiento del sitio de expresión activo al ESB es fundamental para el proceso de expresión monoalélica (Navarro, Penate et al. 2007).

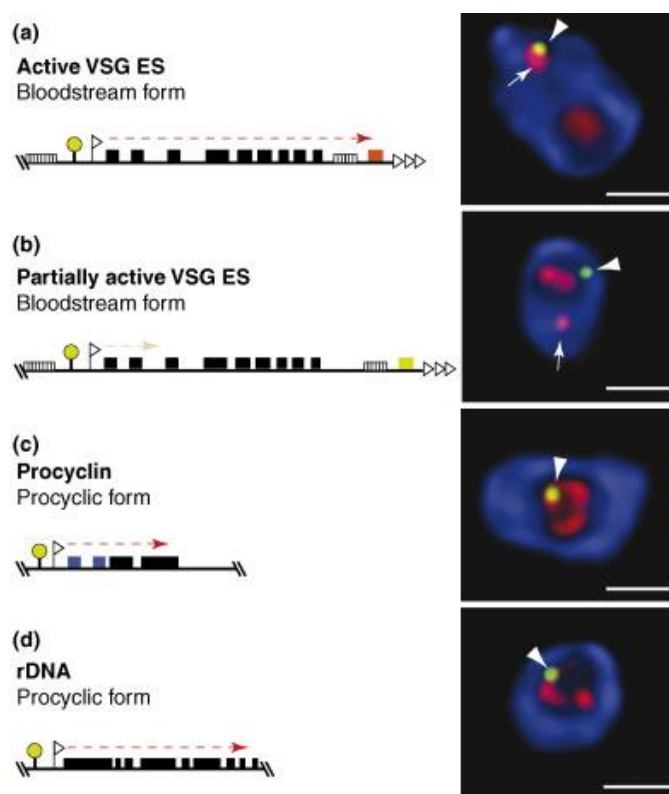


Figura 6. Compartimentación nuclear. Compartimentación nuclear de la ARN pol I en *T. brucei* y localización de los loci por ella transcritos: **(a)** VSG-ES activo; **(b)** VSG-ES parcialmente activo; **(c)** prociclina; **(d)** ADN ribosomal; marcados con GFP-LacI. En amarillo se esquematiza la inserción de secuencias del operador *lac* que permiten la unión de LacI fusionado a GFP en estas líneas celulares (Navarro and Gull 2001). Inmunofluorescencias empleando anticuerpos anti ARN pol I (rojo) y anti GFP (verde). El ADN nuclear se visualiza por tinción con DAPI (azul). El nucléolo es la región de menor tinción donde se concentra la ARN pol I. La punta de flecha indica la posición en el núcleo del locus marcado con GFP-LacI. La flecha señala el ESB (compartimento extranucleolar de ARN pol I) en (a) y (b) (Navarro, Penate et al. 2007).

Otros modelos han sido propuestos, como el **silenciamiento telomérico** (Yang, Figueiredo et al. 2009) y la **regulación de la elongación/maduración del ARNm** (Vanhamme, Poelvoorde et al. 2000). Sin embargo, estos mecanismos no son mutuamente excluyentes por lo que se postula que, probablemente, la expresión monoalélica esté regulada a distintos niveles.

3 SUMOilación en trypanosomátidos

T. brucei posee un sólo gen ortólogo de SUMO y su **esencialidad** en el parásito ha sido demostrada mediante experimentos de ARNi, provocando su ausencia disociación entre la mitosis y la citoquinesis, tanto en su estadio PC como BS (Liao, Wang et al. 2010; Obado, Bot et al. 2011). La estructura tridimensional de *TbSUMO* fue determinada por RMN en 2009, destacándose una alta similitud con SUMO1 y Smt3, y un extremo N-terminal más largo, involucrado en la interacción con Ubc9 de humanos (Shang, Xu et al. 2009). Los componentes del sistema de SUMOilación han sido también identificados *in silico* en trypanosomátidos y su funcionalidad ha sido evaluada *in vivo* y por métodos bioquímicos (Bayona, Nakayasu et al. 2011;

Klein, Droll et al. 2013; Ye, Zhang et al. 2015). De manera particular, en *T. brucei* se han purificado recientemente las enzimas individuales recombinantes empleando etiquetas de glutatión S-transferasa (GST) e His, siendo luego utilizadas para **reconstruir *in vitro* la maquinaria de SUMOilación del parásito** (Ye, Zhang et al. 2015).

A pesar de la importancia de este modificador, antes y durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, sólo **cinco proteínas fueron identificadas como SUMOiladas en trypanosomátidos**. La metacaspasa 3 (proteasa involucrada en procesos de proliferación, muerte celular y diferenciación) (Bayona, Nakayasu et al. 2011) y la proteína flagelar PFR1 (paraflagellar rod protein 1) (Annoura, Makiuchi et al. 2012) han sido descritas como SUMOiladas en *T. cruzi*, mientras que en *T. brucei* ha sido reportada la modificación por SUMO de la subunidad mayor de la ARN pol I (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014), la centrina 3 (proteína flagelar asociada a la motilidad celular) (Ye, Zhang et al. 2015) y la quinasa Aurora B (Hu, Yu et al. 2014). Esta última se encuentra involucrada en la regulación de la mitosis y la citoquinesis, y la modificación de su lisina 154 parece ser necesaria para su función, dado que en parásitos que expresan mutantes no SUMOilables el ensamblado del huso mitótico y la segregación de cromosomas se ven afectados (Hu, Yu et al. 2014).

De manera global, estudios previos realizados en el laboratorio empleando una aproximación proteómica en condiciones no desnaturalizantes, han permitido describir los procesos biológicos que podrían estar siendo modulados por SUMO en *T. cruzi*, al identificar el conjunto de proteínas SUMOiladas y sus interactores. De esta manera fue posible identificar 236 proteínas relacionadas con diversos procesos celulares como reparación y replicación del ADN, transporte nuclear, metabolismo del ARN, biosíntesis de ribosomas, etc (Bayona, Nakayasu et al. 2011).

Recientemente, la importancia de esta modificación post-traducciona en *T. brucei* ha sido nuevamente evidenciada, vinculándose a uno de los procesos fundamentales para la patogenia del parásito y de gran relevancia científica: **la regulación de la variación antigénica**. De esta manera, se ha reportado como el **VSG-ES activo** (Ver sección 2.1.3) transcrito por la ARN pol I, colocaliza con **regiones nucleares de alta concentración de proteínas SUMOiladas** (HSF, High SUMOylated Eocus) (**Figura 7**). Además ha sido posible identificar **una E3 ligasa de SUMO, *TbSIZ1/PIAS1***, como la enzima responsable de la modificación en esta región de la cromatina. Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) demostraron la presencia de la subunidad mayor de la ARN pol I, RPA1 (recientemente descrita como SUMOilada en el parásito) y proteínas SUMOiladas todavía no identificadas en la región de la cromatina asociada al VSG-ES activo y no en otros locus transcritos por la ARN pol I, ARN pol II o ARN polimerasa III. Este efecto se reduce tras la depleción de *TbSIZ* (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

Pese a la relevancia de estas observaciones, las bases moleculares de este proceso y el rol de SUMO en la expresión del VSG-ES no han sido aún dilucidados.

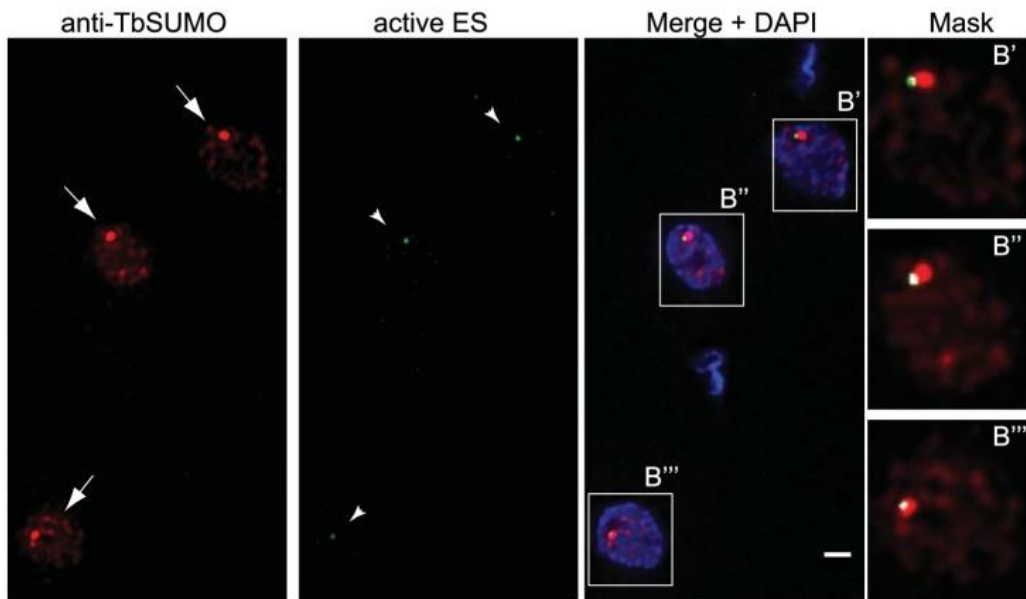


Figura 7. Asociación entre el HSF y el VSG-ES activo. Inmunofluorescencias indirectas sobre la línea celular mencionada en la Figura 6 (a), con el VSG-ES activo marcado por unión de la proteína de fusión LacI-GFP (Navarro and Gull 2001). La proteína *TbSUMO* fue detectada con anticuerpos monoclonales anti *TbSUMO* (rojo), destacando las flechas el HSF. El ES activo marcado con GFP fue detectado empleando anticuerpos anti GFP (verde, puntas de flecha). (B', B'', B''') Imágenes amplificadas de los núcleos marcados con anti GFP y anti *TbSUMO* (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La relevancia de la modificación por SUMO ha sido descrita en diversos organismos eucariotas. En *Trypanosoma brucei* este sistema de modificación post-traducciona también ha sido identificado, pero los procesos celulares en los que se encuentra involucrado no han sido descritos en profundidad. En particular, la asociación recientemente descrita entre SUMO y el proceso de variación antigénica, permite resaltar la importancia de este modificador en el parásito.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo de Tesis nos propusimos profundizar el estudio del sistema de SUMOilación en *T. brucei*, para dilucidar el potencial rol del modificador en los distintos procesos celulares relevantes para su biología. Para llevar esto a cabo, decidimos identificar de manera global proteínas SUMOiladas en los dos estadios cultivables del parásito, por espectrometría de masas.

Como objetivos específicos nos propusimos:

- (i) Desarrollar líneas de parásitos que expresen de manera estable una versión de SUMO etiquetada;
- (ii) Purificar de manera eficiente proteínas SUMOiladas;
- (iii) Analizar por espectrometría de masas las muestras purificadas;
- (iv) Desarrollar un sistema de SUMOilación específico de *T. brucei* para el análisis de potenciales sustratos.

PRIMERA PARTE

Identificación global de proteínas SUMOiladas

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Primeras estrategias para la identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en *Trypanosoma brucei*

1.1 Generación de líneas celulares que expresan una versión modificada de *TbSUMO*

La identificación proteómica de modificaciones post-traduccionales es una tarea compleja y laboriosa. En particular, la identificación por espectrometría de masas de proteínas SUMOiladas presenta algunas dificultades dado que normalmente sólo una fracción minoritaria de una proteína blanco se encuentra SUMOilada y esta modificación es rápidamente revertida si no se inactivan las proteasas encargadas de su deconjugación. Estas desventajas son las que justifican el uso poco frecuente de anticuerpos policlonales y monoclonales anti SUMO como herramientas para la purificación por cromatografía de inmutafinidad de proteínas conjugadas al modificador (Becker, Barysch et al. 2013). El enfoque empleado con mayor frecuencia involucra la generación de líneas celulares transgénicas que permiten la expresión de **SUMO modificado** en su extremo N-terminal con distintas etiquetas que favorecen la purificación de conjugados mediante diversos principios de afinidad. De manera particular, las **etiquetas de histidinas** (tracto de 6 a 8 residuos) son frecuentemente empleadas, al permitir la purificación de conjugados a SUMO de manera sencilla y económica por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y posibilitar además el trabajo en condiciones desnaturalizantes (6 M urea) favoreciendo la inactivación de las proteasas deconjugadoras y la purificación exclusiva de proteínas SUMOiladas y no de interactores no covalentes del modificador (Tatham, Rodriguez et al. 2009; Hendriks, D'Souza et al. 2014; Tammsalu, Matic et al. 2014). Esta estrategia puede **combinarse con la adición de otras etiquetas**, brindando nuevos principios para un segundo paso de purificación por cromatografía de afinidad.

Teniendo en cuenta estas consideraciones es que decidimos inicialmente generar líneas celulares transgénicas que expresen una versión etiquetada de SUMO en su extremo N-terminal [tracto de **8 histidinas (His)** y el epítoto de hemaglutinina (**HA**)] (**Figura 8**) en nuestro modelo de estudio: *Trypanosoma brucei*.

Considerando los reportes de bibliografía y teniendo en cuenta nuestra propia experiencia previa en relación al estudio del sistema de SUMOilación en *Trypanosoma cruzi* (Bayona, Nakayasu et al. 2011), estimamos que no sólo la modificación post-traducciona por *TbSUMO* ocurre en un muy bajo porcentaje de las proteínas totales de una célula sino que además, la fracción modificada de cada proteína en particular suele ser inferior al 5%. Por esta razón es que, en vez de simplemente expresar de manera ectópica la variante de *TbSUMO* modificada, decidimos **reemplazar los dos alelos de la forma endógena** mediante **recombinación homóloga** por la versión etiquetada de *TbSUMO* con His y HA de manera de poder maximizar la producción de conjugados que puedan ser posteriormente purificados por cromatografía de afinidad en

tándem. Para realizar el reemplazo del gen endógeno por la forma etiquetada, las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región 5' no traducible (5'UTR) y al extremo 5' de HisHA-*TbSUMO*, fueron sintetizadas químicamente (GenScript) y clonadas en el vector de reemplazo pEnT6P (con marcador de resistencia a puromicina) y pEnT6H (con marcador de resistencia a higromicina) (Kelly, Reed et al. 2007), para favorecer la recombinación homóloga en cada locus de *TbSUMO* en el parásito (Figura 9).

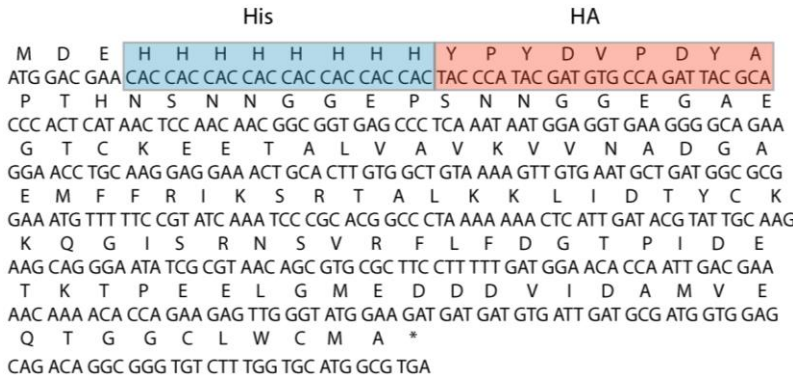


Figura 8. Esquema de la variante HisHA-*TbSUMO*. Secuencia aminoacídica y nucleotídica de *TbSUMO* (Tb927.5.3210) con el agregado de etiquetas His-HA tras los primeros tres aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína.

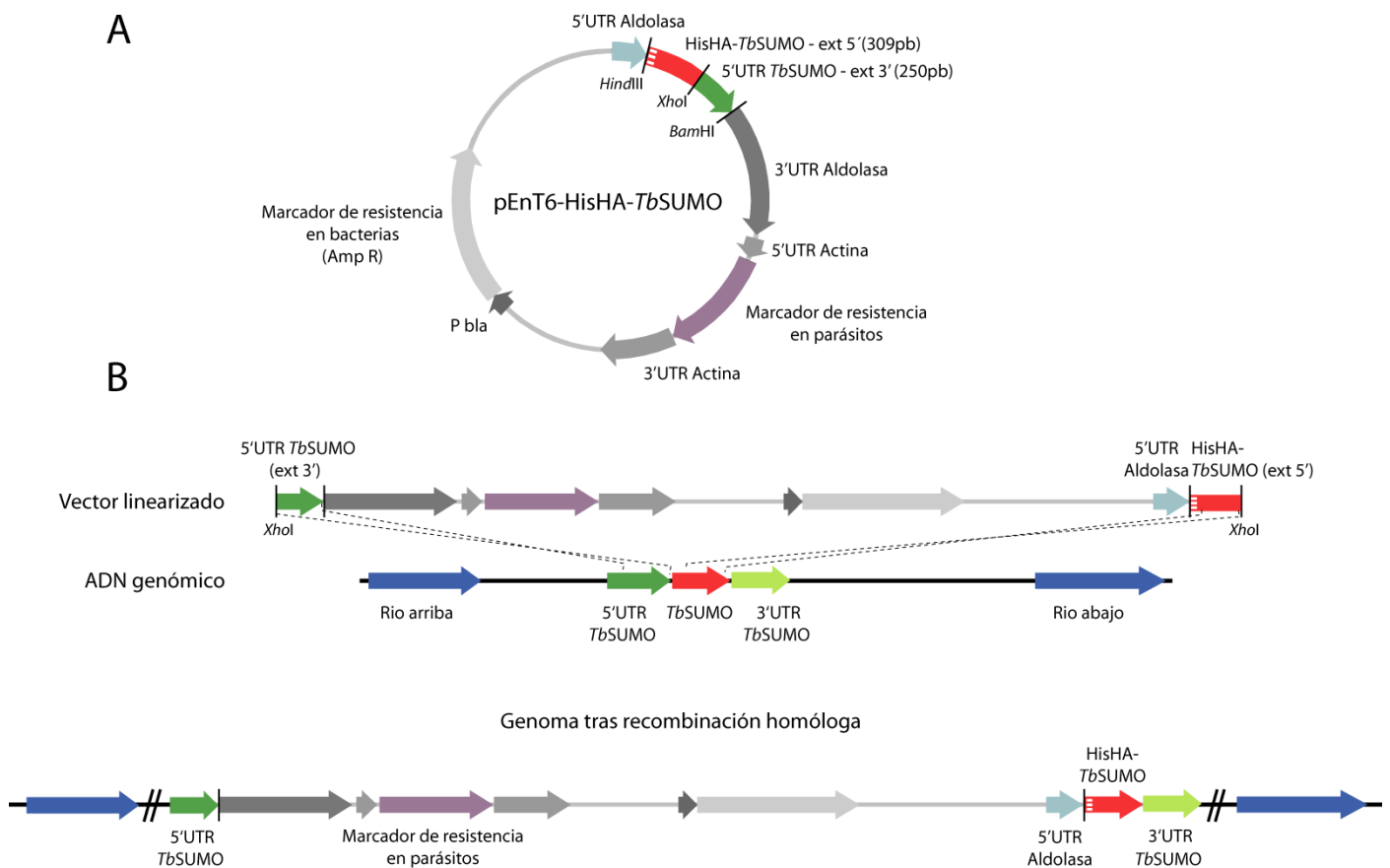
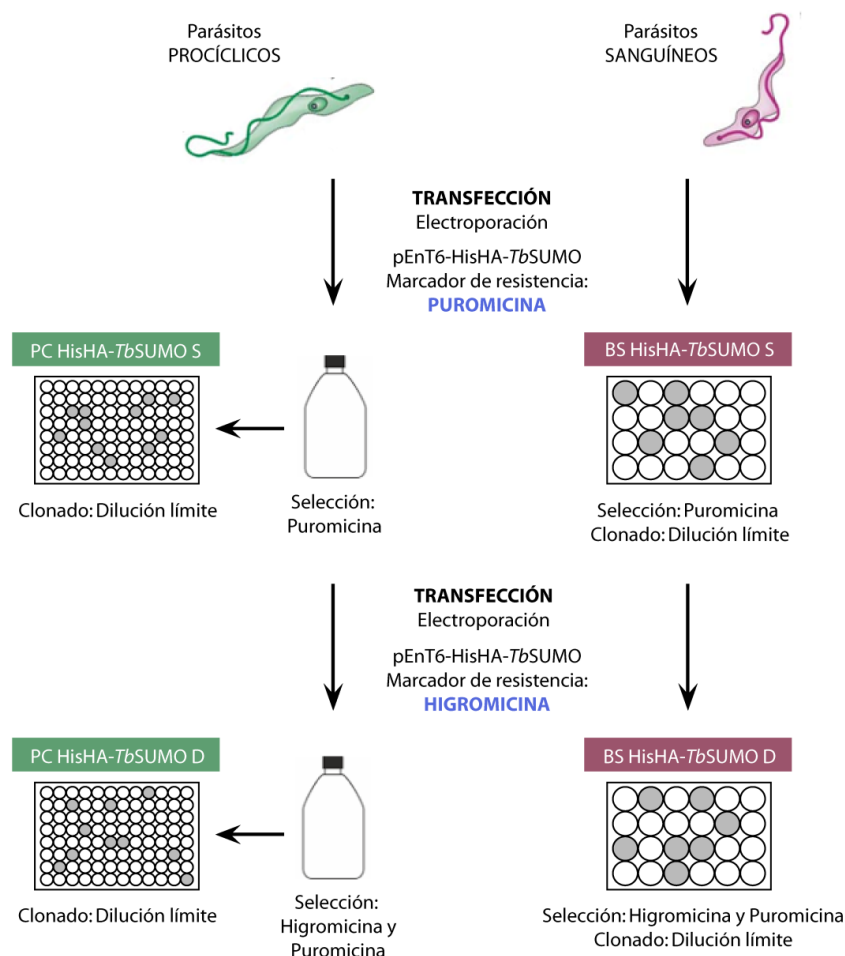


Figura 9. Reemplazo del gen endógeno de *TbSUMO* por la variante HisHA-*TbSUMO*. (A) Representación esquemática de la construcción HisHA-*TbSUMO* en el vector pEnT6. En rojo se observa el extremo 5' del gen que codifica para *TbSUMO* con el agregado de etiquetas de His y HA (líneas blancas), tal como se esquematiza en la Figura 8. En verde se observa el extremo 3' del 5'UTR del gen, necesario para la recombinación. La enzima de restricción *XhoI* fue utilizada en todos los casos para linearizar el vector. (B) Representación esquemática de la recombinación teórica y la inserción de la construcción HisHA-*TbSUMO* en el genoma del parásito.

El reemplazo del alelo permitiría la **expresión** de la versión de *TbSUMO* modificada de manera similar a la **fisiológica**, al conservar el extremo 3' no traducible (3'UTR) propio del gen silvestre. De manera general, la interacción de los 3'UTR con proteínas de unión al ARN específicas determina la estabilización o desestabilización de los ARNm particulares (Kolev, Ullu et al. 2014). Este mecanismo es particularmente relevante si consideramos que la regulación de la expresión génica en trypanosomátidos ocurre fundamentalmente a nivel post-transcripcional.

La construcción mencionada pEnT6-HisHA-*TbSUMO*, conteniendo un marcador de resistencia a puromicina, fue utilizada para transfectar por electroporación parásitos **procíclicos (PC)** o **sanguíneos (BS)**. La población fue seleccionada con el antibiótico correspondiente y, por cuestiones metodológicas¹, clonada simultáneamente (en el caso de BS) o *a posteriori* (para PC) por el método de dilución límite. El reemplazo del segundo alelo empleando el vector pEnT6-HisHA-*TbSUMO*, conteniendo un marcador de resistencia a higromicina, se realizó de manera equivalente transfectando la población (en PC) o los clones (en BS) seleccionados tras la primera transfección. Los parásitos fueron seleccionados en medio de cultivo con higromicina y puromicina y, nuevamente para el caso de BS, clonados simultáneamente por dilución límite. La población obtenida para PC fue posteriormente clonada por dilución límite tras la selección con los dos antibióticos (Ver el esquema de trabajo completo en la **Figura 10**).



¹ A diferencia de los parásitos PC, los parásitos BS no pueden seleccionarse en botellas de cultivo convencionales sino que deben clonarse por dilución límite inmediatamente luego de la transfección. La selección con antibióticos adecuados se realiza en todos los casos en placas de cultivo de 24 pocillos (Ver Materiales y Métodos).

Figura 10. Esquema de trabajo para la generación de líneas celulares HisHA-*TbSUMO* en PC y BS. Parásitos PC y BS fueron transfectados por electroporación con el vector pEnT6-HisHA-*TbSUMO*, con marcador de resistencia a puromicina y seleccionados en presencia del antibiótico. El clonado por dilución límite fue realizado de manera simultánea a la selección en el caso de parásitos BS. La población (PC) y los clones (BS) obtenidos fueron transfectados nuevamente con la construcción pEnT6-HisHA-*TbSUMO*, con marcador de resistencia a higromicina, y seleccionados y/o clonados según el caso en presencia de los dos antibióticos.

En cada caso se obtuvieron numerosos clones, analizados como se detalla a continuación.

1.2 Confirmación del reemplazo y análisis de la proteína de fusión generada

1.2.1 Evaluación de las líneas celulares: análisis del reemplazo de los alelos de *TbSUMO*

Para examinar si la recombinación homóloga ocurría correctamente en el lugar esperado realizamos extracciones de ADN genómico a partir de los clones obtenidos luego de un **simple** (HisHA-*TbSUMO* S) o un **doble reemplazo** (HisHA-*TbSUMO* D) de los alelos de *TbSUMO* y evaluamos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la amplificación de productos específicos, indicativos de este evento. Los oligonucleótidos empleados, que hibridan con el marcador de resistencia a puromicina o higromicina (presente en el vector) y el gen río arriba de *TbSUMO* (Tb927.5.3200) en el ADN genómico, permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 2150 pb (puromicina) o 2730 pb (higromicina). Estos productos de amplificación solo pueden visualizarse si el proceso de recombinación y, en consecuencia, el reemplazo del alelo, fue exitoso (Figura 11).

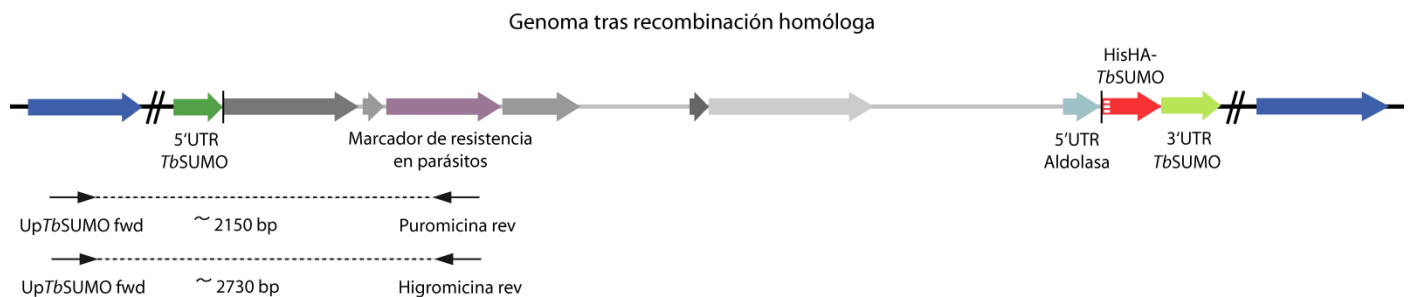


Figura 11. Confirmación de la recombinación de la construcción HisHA-*TbSUMO* en el genoma del parásito. Representación teórica del genoma del parásito tras la recombinación. Las flechas señalan los oligonucleótidos empleados en la confirmación de la localización del reemplazo y los productos de amplificación esperados.

Como puede visualizarse en la Figura 12, para los clones seleccionados de los dos estadios del parásito se observan los productos de amplificación mencionados que, como es de esperar, se encuentran ausentes en los parásitos silvestres utilizados como control negativo, confirmando así la correcta recombinación de la construcción HisHA-*TbSUMO*.

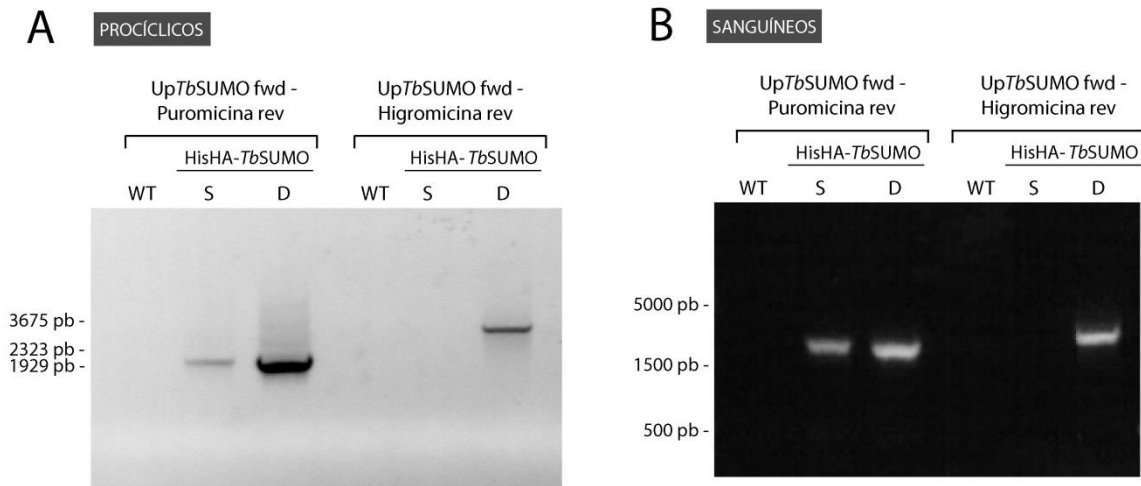


Figura 12. Confirmación de la recombinación de la construcción HisHA-*TbSUMO*. Productos de PCR separados por electroforesis en un gel de agarosa 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio y transiluminación UV. Los amplicones fueron obtenidos a partir de ADN genómico extraído de clones representativos tras el reemplazo de uno (HisHA-*TbSUMO* S) o dos (HisHA-*TbSUMO* D) alelos para el estadio (A) PC y (B) BS. WT: ADN genómico extraído a partir de parásitos silvestres utilizados como control negativo.

La identidad del alelo reemplazado y la recombinación adecuada conservando la fase en el extremo 3' del gen, fue también confirmada por **secuenciación** del producto de amplificación por PCR que se obtiene utilizando oligonucleótidos complementarios a las etiquetas His-HA y al 3'UTR conservado del gen.

Para evaluar la ausencia de copias silvestres de *TbSUMO* tras el **doble reemplazo** de los alelos por la versión modificada, amplificamos por PCR a partir de ADN genómico el marco de lectura abierto (ORF) de *TbSUMO* (aproximadamente 500 pb) utilizando oligonucleótidos que hibridan de manera específica sobre el 5'UTR y el 3'UTR del gen. De esta manera, dado que el 5'UTR silvestre de *TbSUMO* se encuentra en las líneas transgénicas a más de 4500 pb río arriba del gen HisHA-*TbSUMO*, la amplificación de un producto de aproximadamente 500 pb se corresponde únicamente con la presencia del gen silvestre. Así pudimos observar que aún cuando todos los clones evaluados de PC y BS poseían un doble reemplazo exitoso del alelo en muchos casos persistía al menos una copia del alelo silvestre en el genoma. De hecho, aproximadamente solo 1 de cada 5 clones con un doble reemplazo exitoso no poseía una copia extra del gen (Ver Anexo - Figura A1).

Estas copias extras pueden haber sido generadas durante el proceso de doble recombinación homóloga que permite el reemplazo de *TbSUMO* por la versión etiquetada, ya sea en la primera o segunda transfección. Esta observación ya ha sido reportada en trypanosomátidos (Obado, Taylor et al. 2005; Ambit, Fasel et al. 2008; Minning, Weatherly et al. 2009) y podría relacionarse, en este caso, con la respuesta del parásito a una conjugación menos eficiente de HisHA-*TbSUMO* en comparación con su variante endógena.

Dado que uno de los objetivos del reemplazo de los alelos de *TbSUMO* era reducir la competencia de la variante etiquetada con la versión silvestre del gen para incrementar el rendimiento de la purificación de conjugados, elegimos para cada estadio un clon que cumpliera

con estas características: **doble reemplazo exitoso y ausencia de copia silvestre del gen**, para proseguir con el estudio de las líneas y la purificación de conjugados a HisHA-*TbSUMO*. Como se observa entonces en la **Figura 13**, mientras que los parásitos silvestres (utilizados como control positivo) y los clones HisHA-*TbSUMO* S presentan un amplicón de 500 pb, los clones HisHA-*TbSUMO* D seleccionados no originan este producto de amplificación, indicando estos resultados en conjunto que efectivamente los dos alelos de *TbSUMO* fueron reemplazados por la versión etiquetada sin presentar copias adicionales del alelo silvestre.

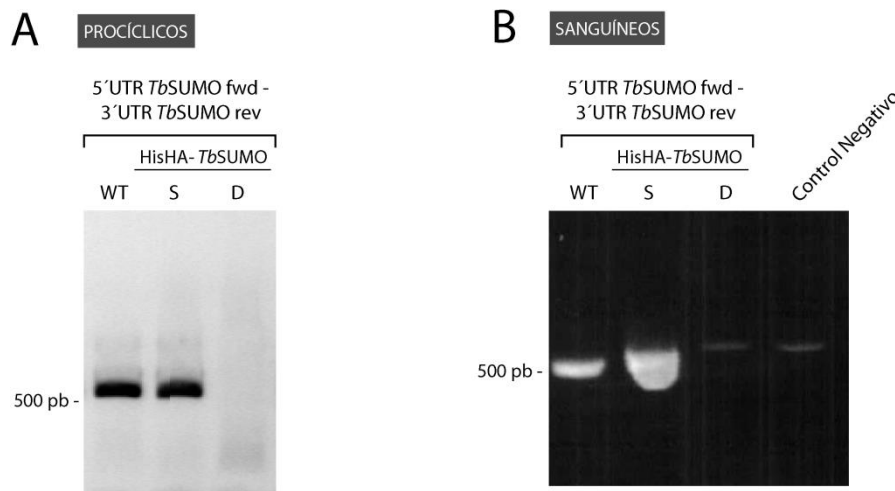


Figura 13. Confirmación de la ausencia de copias silvestres de *TbSUMO*. Productos de PCR separados por electroforesis en un gel de agarosa 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio y transiluminación UV. Los amplicones fueron obtenidos a partir de ADN genómico extraído de clones tras el reemplazo de uno (HisHA-*TbSUMO* S) o dos (HisHA-*TbSUMO* D) alelos para el estadio (A) PC y (B) BS. WT: ADN genómico extraído a partir de parásitos silvestres utilizados como control positivo. Control Negativo: mezcla de reacción sin el agregado de ADN.

1.2.2 Evaluación de las líneas celulares: análisis del patrón de SUMOilación por Western blot y de la localización subcelular de los conjugados por inmunofluorescencia indirecta

A continuación, procedimos a evaluar la expresión y conjugación de esta versión de *TbSUMO* en las líneas celulares generadas por Western blot, utilizando anticuerpos comerciales anti HA monoclonales. Para esto cosechamos por centrifugación parásitos de los distintos clones a evaluar, los resuspendimos inmediatamente en buffer de siembra Laemmli, conteniendo DTT, y hervimos los extractos resultantes para desnaturalizar las proteasas que deconjugan *TbSUMO* de sus sustratos. Como puede observarse en el análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA (**Figura 14**), la variante HisHA-*TbSUMO* es evidentemente procesada por los parásitos y conserva su capacidad de conjugación lo que se traduce en un patrón de bandas complejo, que incluye la forma libre de *TbSUMO* (aproximadamente 25 kDa) y numerosas bandas de alto peso molecular correspondientes a los aductos covalentes (sustratos SUMOilados).

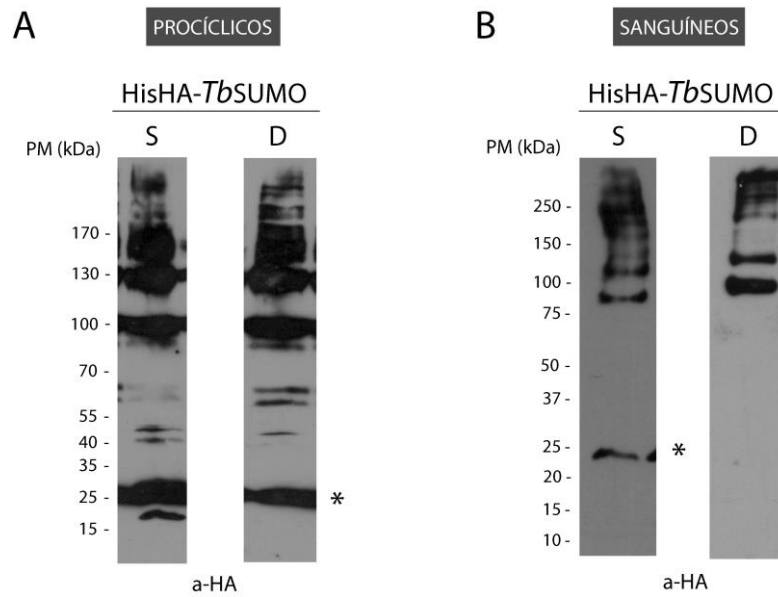


Figura 14. Expresión y conjugación de HisHA-*TbSUMO*. Análisis por Western blot de extractos de parásitos HisHA-*TbSUMO* (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti HA. HisHA-*TbSUMO* PC: $\sim 3 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición largo; HisHA-*TbSUMO* BS: $\sim 2 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición corto. Las bandas cercanas al marcador de peso molecular de 25 kDa (*) se corresponden con la forma libre de HisHA-*TbSUMO*.

Como puede visualizarse en la figura, de manera análoga a lo descrito para la proteína SUMO, libre y conjugada, en otros organismos (Matunis, Coutavas et al. 1996; Johnson, Schwienhorst et al. 1997; Kamitani, Nguyen et al. 1997; Bayer, Arndt et al. 1998; Saitoh and Hinchey 2000), la proteína HisHA-*TbSUMO* de aproximadamente 14,5 kDa, presenta una **movilidad electroforética anómala**, migrando generalmente como el marcador de peso molecular de 25 kDa.

De la misma manera, en concordancia con lo observado para parásitos silvestres (Ver Anexo - Figura A2), es posible visualizar en todos los casos, un **patrón de bandas de alto peso molecular**. En particular, se destacan en PC por lo menos dos bandas mayoritarias, con movilidad electroforética similar a la de los marcadores de peso molecular de 100 kDa y 130 kDa respectivamente. En contraposición, las bandas de SUMOilación observadas en BS presentan todas ellas intensidades similares, destacándose dos bandas con movilidad electroforética cercana a la de los marcadores de peso molecular de 75 kDa y 100 kDa respectivamente

Para evaluar de manera comparativa los niveles de expresión de los clones HisHA-*TbSUMO* S y D cosechamos parásitos PC y BS y los analizamos de manera análoga por Western blot utilizando anticuerpos anti HA. Para cada estadio se sembró nuevamente el mismo equivalente de parásitos totales pero en este caso reduciéndolo para obtener un patrón de SUMOilación visible con el menor número posible de parásitos para favorecer la comparación. Como puede observarse entonces a modo de ejemplo para PC en la Figura 15, el reemplazo de los dos alelos de *TbSUMO* por la versión modificada, en ausencia de una copia endógena del gen, permite obtener un mayor número de conjugados a HisHA-*TbSUMO*, en contraposición con la variante que presenta un sólo reemplazo del alelo que todavía compete con la versión silvestre del gen en la SUMOilación de sustratos.

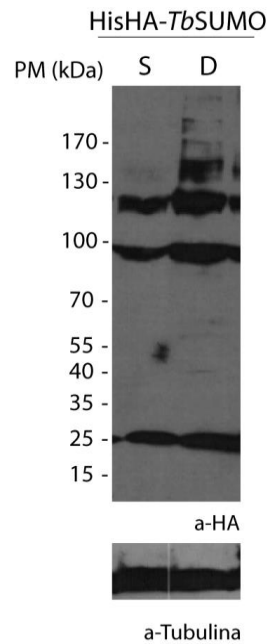
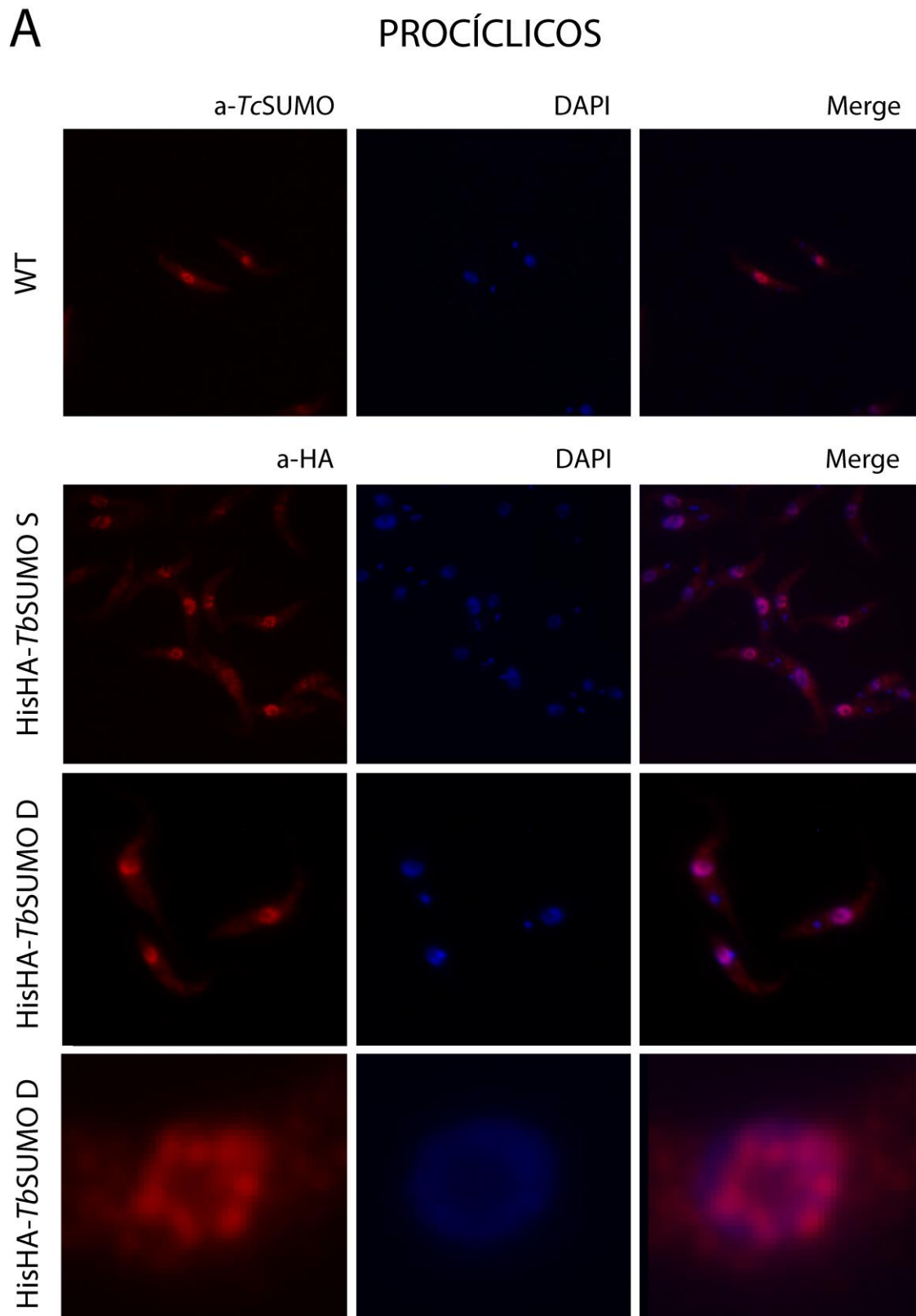


Figura 15. Expresión y conjugación comparativa de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* S y D en PC. Análisis por Western blot de extractos de parásitos PC HisHA-*TbSUMO* S y D ($\sim 2,5 \times 10^7$ parásitos) utilizando anticuerpos monoclonales anti HA. Tiempo de exposición largo. La proteína tubulina se utilizó como control de carga del gel.

Posteriormente decidimos evaluar la expresión y localización de HisHA-*TbSUMO* en los clones seleccionados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando nuevamente anticuerpos anti HA. Como fue mencionado en la Introducción, en otros organismos, incluido *T. cruzi* (Bayona, Nakayasu et al. 2011), SUMO posee un patrón de **localización nuclear**-perinuclear, que excluye el nucléolo. El análisis de las líneas celulares generadas por IFI confirmó la correcta expresión de la proteína de fusión HisHA-*TbSUMO*, con una distribución nuclear característica, equivalente a la observada en parásitos silvestres utilizando anticuerpos policlonales anti *TcSUMO* en PC (de *T. cruzi*, desarrollados en el laboratorio como parte de la Tesis de doctorado del Lic. Julio Bayona) y anticuerpos monoclonales anti *TbSUMO* en BS (de *T. brucei*, desarrollados en el laboratorio de Dr. Miguel Navarro, España). Esta distribución se observa de manera equivalente en las líneas HisHA-*TbSUMO* S y D (**Figura 16**).



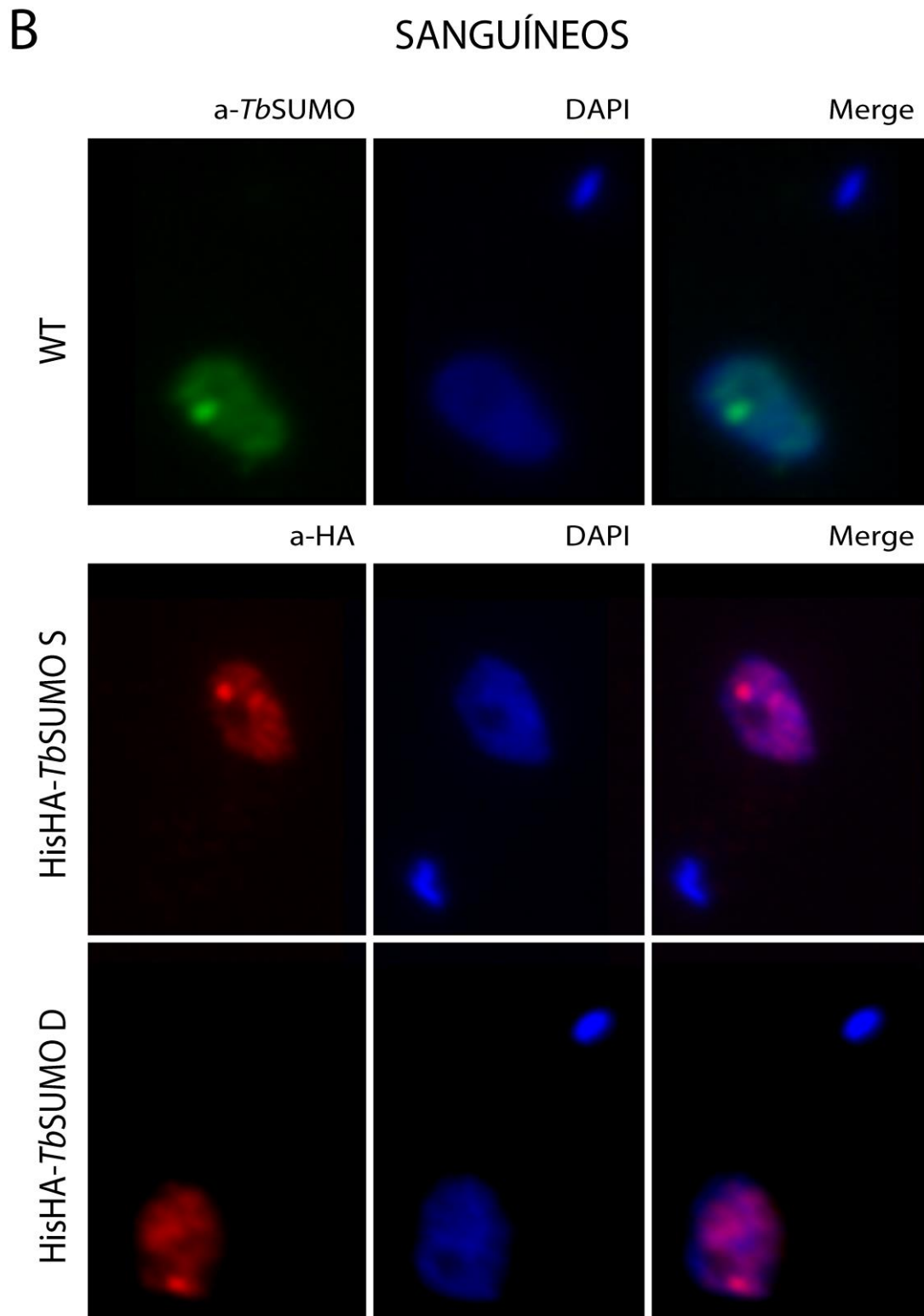


Figura 16. Expresión y localización subcelular de HisHA-TbSUMO. Inmunofluorescencias de parásitos HisHA-TbSUMO (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti HA. Parásitos silvestres (WT) se utilizaron en cada caso como control, empleando anticuerpos anti SUMO para visualizar la forma silvestre de la proteína. En todos los casos el kinetoplasto y el ADN nuclear se visualizan por tinción con DAPI (azul). Se observa también la superposición anti SUMO/HA-DAPI (Merge).

El patrón nuclear observado por IFI que excluye el nucléolo, no es uniforme sino que, por el contrario, es posible visualizar en la gran mayoría de los parásitos **focos de SUMOilación puntuales** de gran intensidad. Estos focos son numerosos (más de 5 por núcleo) en las líneas correspondientes a PC y escasos en las líneas de BS, observándose generalmente un único foco de gran intensidad en los núcleos de estos parásitos. Estudios recientes (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014) han descrito la asociación existente entre este foco de alta concentración de proteínas SUMOiladas y el sitio de expresión de la VSG activa en BS.

1.2.3 Evaluación de las líneas celulares: curvas de crecimiento

Las líneas celulares generadas, tanto en parásitos PC como en BS, fueron cultivadas de manera axénica en medio suplementado con los antibióticos correspondientes en cada caso, sin observarse alteraciones morfológicas de ningún tipo en los parásitos transfectados. El **crecimiento** de estas líneas fue evaluado comparativamente con parásitos silvestres PC y BS (WT). Como puede visualizarse en la **Figura 17** no se observan diferencias marcadas en el crecimiento de las líneas HisHA-*TbSUMO* S y D en comparación con el control WT en los dos estadios del parásito analizados.

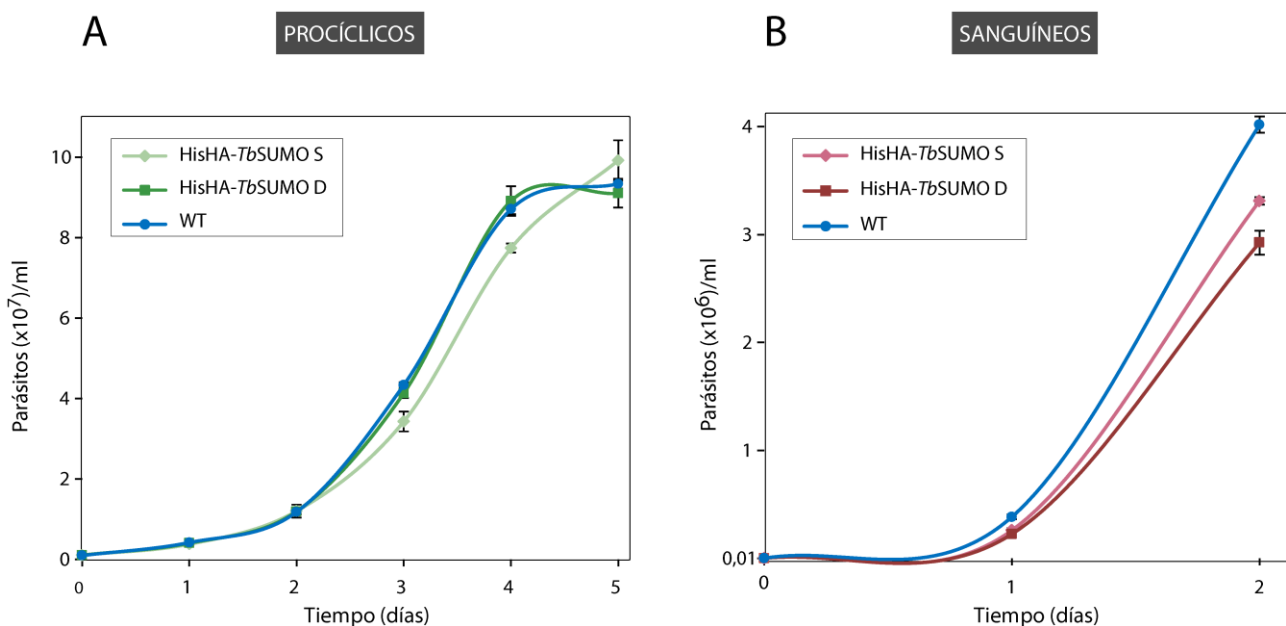


Figura 17. Crecimiento en cultivo de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*. Curvas de crecimiento de parásitos HisHA-*TbSUMO* S y D (A) PC y (B) BS, de manera comparativa con líneas silvestres (WT).

Considerando la esencialidad de *TbSUMO* en los dos estadios del parásito (Liao, Wang et al. 2010; Obado, Bot et al. 2011), la falta de alteraciones en el crecimiento de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* D que sólo poseen en su genoma la versión modificada del gen, nos está indicando que la **funcionalidad de *TbSUMO* no estaría siendo afectada por el agregado de las etiquetas**, por lo menos en lo referido a la SUMOilación de proteínas cuya modificación es esencial para la viabilidad del parásito.

1.3 Purificación de proteínas SUMOiladas

Tras el análisis descripto de las líneas celulares mencionadas procedimos al enriquecimiento de las proteínas conjugadas a HisHA-*Tb*SUMO.

Para llevar esto a cabo evaluamos inicialmente la **estabilidad de los conjugados a *Tb*SUMO** dado que, al igual que lo reportado en otros organismos (Flotho and Melchior 2013), la alta actividad de las proteasas deconjugadoras reduce drásticamente la recuperación de proteínas SUMOiladas en extractos de parásitos sin tratamiento alguno (**Figura 18**). Es por esto que evaluamos entonces el efecto de inhibidores de cisteín proteasas como N-etilmaleimida (NEM) o agentes desnaturizantes como urea en la estabilidad de los conjugados presentes en los extractos proteicos de parásitos. Como puede visualizarse entonces en la **Figura 18**, los parásitos lisados en presencia de urea (o NEM) permiten la conservación de los conjugados a *Tb*SUMO de manera reproducible. Lo mismo ocurre si los parásitos son resuspendidos rápidamente en buffer Laemmli².

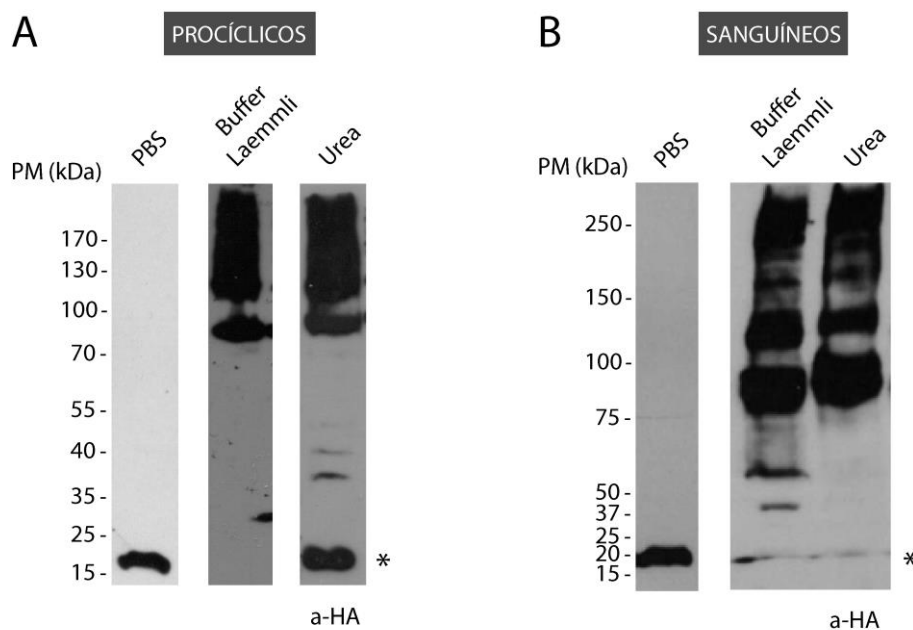


Figura 18. Estabilidad de proteínas SUMOiladas. Parásitos HisHA-*Tb*SUMO (**A**) PC y (**B**) BS fueron resuspendidos en PBS (PC: 7×10^7 ; BS: 2×10^7), buffer Laemmli y hervidos 5 min (PC: $3,5 \times 10^7$; BS: $1,5 \times 10^7$), o en un buffer conteniendo 6 M urea (PC: $3,5 \times 10^7$; BS: $1,5 \times 10^7$) e incubados por 20 min a temperatura ambiente. La estabilidad de los conjugados a HisHA-*Tb*SUMO en los extractos resultantes fue evaluada por Western blot utilizando anticuerpos anti HA. Las bandas cercanas al marcador de peso molecular de 25 kDa (*) se corresponden con la forma libre de HisHA-*Tb*SUMO.

Considerando estas observaciones y el objetivo inicial de nuestro trabajo decidimos realizar finalmente todas las **purificaciones en presencia de 6 M urea** dado que, no sólo permite la reducción de la pérdida de conjugados por desnaturización de las proteasas deconjugadoras,

² En todos los casos, los extractos de parásitos empleados en el trabajo de Tesis se han manipulado teniendo en cuenta estas consideraciones.

sino que también favorece la purificación exclusiva de proteínas unidas covalentemente a *TbSUMO* y no de interactores vía motivos SIM.

Teniendo en cuenta el bajo porcentaje de proteínas SUMOiladas resultaba relevante evaluar las diferencias existentes en el patrón de SUMOilación durante las distintas fases de crecimiento de los parásitos para poder determinar el punto metabólico óptimo para la mayor recuperación de conjugados a HisHA-*TbSUMO*. Para esto cosechamos parásitos en fase de crecimiento exponencial y estacionaria y evaluamos por Western blot, utilizando anticuerpos anti HA, el patrón de conjugación en cada caso (**Figura 19**). Este análisis se llevó a cabo exclusivamente en las líneas celulares de parásitos PC dado que el crecimiento en cultivo de parásitos BS alcanza un máximo de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ parásitos/ml y, considerando el alto número de parásitos necesario para la purificación de conjugados, no es posible trabajar de manera operativa con cultivos en densidades menores a ésta.

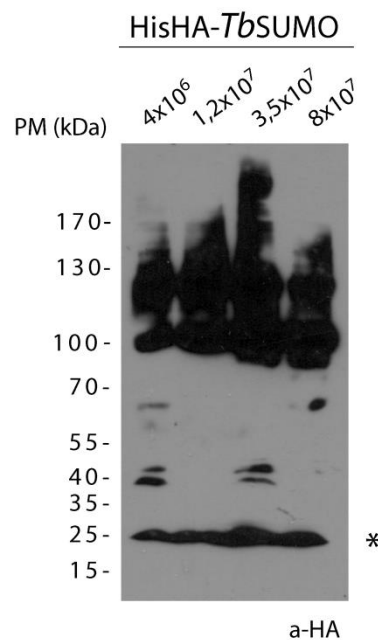


Figura 19. SUMOilación de proteínas en función del estado metabólico de parásitos PC. Parásitos HisHA-*TbSUMO* D PC (3×10^7) en distintas fases de crecimiento en cultivo (4×10^6 /ml, $1,2 \times 10^7$ /ml, $3,5 \times 10^7$ /ml y 8×10^7 /ml) fueron resuspendidos en buffer Laemmli y el patrón de conjugación a HisHA-*TbSUMO* fue evaluado por Western blot utilizando anticuerpos anti HA. Las bandas cercanas al marcador de peso molecular de 25 kDa (*) se corresponden con la forma libre de HisHA-*TbSUMO*.

Como puede visualizarse en la **Figura 19**, el patrón de bandas no difiere de manera significativa en las distintas fases de crecimiento del parásito aunque la intensidad parece ser máxima durante la fase exponencial temprana del cultivo. Teniendo en cuenta estos resultados decidimos entonces realizar la purificación de conjugados a HisHA-*TbSUMO* a partir de cultivos de $3-4 \times 10^7$ /ml para PC y $2-3 \times 10^6$ /ml para BS.

De esta manera, se colectaron aproximadamente 5×10^{10} parásitos PC y 3×10^{10} parásitos BS como punto de partida de la purificación. Estas cantidades equivalen a un volumen de cultivo aproximado de 1,5 - 2 lts para PC y de 12 lts para BS (Figura 20). Para este último estadio, considerando la densidad máxima de parásitos BS alcanzada en cultivo, se procedió en algunos casos a purificar los parásitos transgénicos a partir de sangre de ratas infectadas³. Dado que los parásitos BS, estadio replicativo en mamíferos, alcanzan altas densidades en líquidos tisulares, es posible purificar entonces a partir de 1 ml de sangre la cantidad de parásitos equivalente a la obtenida a partir de 1 lt de cultivo axénico (Figura 20).

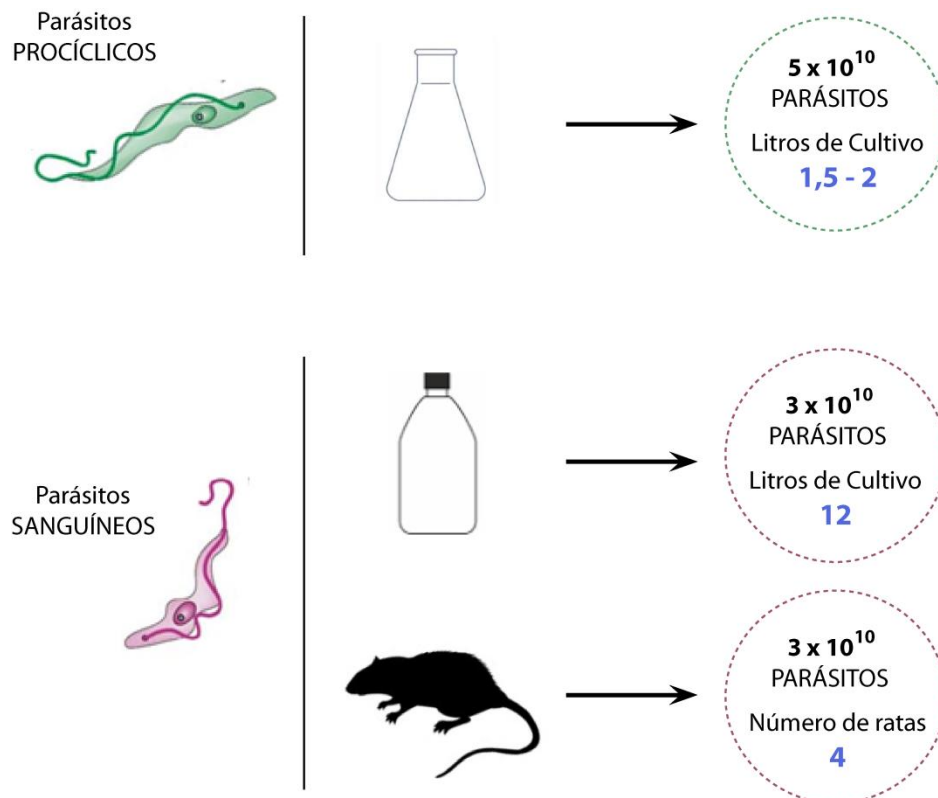


Figura 20. Obtención de parásitos para la purificación de proteínas SUMOiladas. Representación esquemática del volumen aproximado de cultivo y/o número de animales necesario para realizar las purificaciones de conjugados a HisHA-*Tb*SUMO en los dos estadios utilizados del parásito.

Considerando el desarrollo cronológico de las líneas celulares inicialmente se realizó la purificación de proteínas conjugadas a *Tb*SUMO a partir de las líneas HisHA-*Tb*SUMO S, mediante un paso cromatográfico. En todos los casos se realizaron purificaciones equivalentes a partir de parásitos silvestres como control. Brevemente, los parásitos colectados fueron resuspendidos en un buffer de lisis conteniendo 6 M urea y los extractos fueron sonicados hasta pérdida de viscosidad. El material insoluble fue separado por centrifugación, procediéndose luego a la purificación de las proteínas conjugadas a HisHA-*Tb*SUMO presentes en la fracción

³ Este protocolo se realizó en el laboratorio del Dr. Miguel Navarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Granada, España).

soluble, mediante **cromatografía de afinidad a Ni²⁺**. Esta resina permite purificar proteínas con trectos de histidinas en condiciones desnaturizantes dado que su principio de interacción se basa fundamentalmente en la estructura primaria de las mismas. La elución de los conjugados unidos a la matriz se realizó empleando el mismo buffer 6 M urea conteniendo 500 mM imidazol. La presencia de conjugados en los eluidos de las purificaciones fue confirmada por Western blot utilizando anticuerpos anti HA (**Figura 21**) observándose en todos los casos un patrón continuo de bandas que puede atribuirse al enriquecimiento de proteínas normalmente SUMOiladas en muy baja proporción.

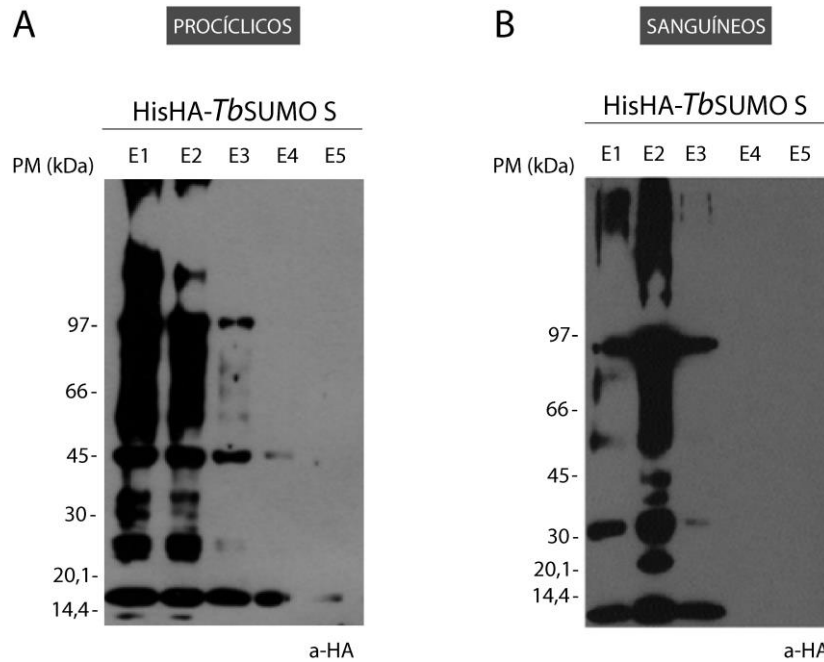


Figura 21. Purificación de proteínas SUMOiladas por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO S*. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de los eluidos (E1-E5) resultantes de la purificación por resina de Ni²⁺ a partir de las líneas HisHA-*TbSUMO S* de (A) PC y (B) BS. PC: volumen de elución equivalente a 1,4x10⁹ parásitos; BS: volumen de elución equivalente a 1,8x10⁹ parásitos.

De manera simultánea, la complejidad proteica de las muestras resultantes fue evaluada, en comparación a la purificación control, mediante SDS-PAGE seguida de tinción con plata (Ver Anexo - **Figura A3**). Pese a que no se observaron bandas diferenciales en los eluidos de la purificación a partir de las líneas celulares respecto del control, en todos los casos el segundo eluido con 500 mM imidazol (E2) y sus equivalentes en las muestras control, fueron elegidos para su posterior análisis por espectrometría de masas (Ver 1.4. Análisis proteómico: Proteómica PC1 y BS1).

Considerando los primeros resultados obtenidos, con el objetivo de optimizar la purificación de proteínas SUMOiladas decidimos emplear dos pasos cromatográficos de afinidad sucesivos. Estas purificaciones se realizaron inicialmente a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO S* de PC y posteriormente empleando las líneas HisHA-*TbSUMO D*, que carecen de la versión silvestre del gen que codifica para *TbSUMO*. De manera equivalente a lo ya descrito, las

proteínas conjugadas a HisHA-*TbSUMO* fueron purificadas inicialmente por **cromatografía de afinidad a Ni²⁺** en condiciones desnaturalizantes y los eluidos resultantes fueron luego diluidos en un buffer adecuado para reducir la concentración de urea presente en las muestras. De esta manera, los conjugados a esta versión de *TbSUMO* eluidos de la resina de Ni²⁺, fueron luego purificados empleando anticuerpos anti HA unidos covalentemente a una matriz de agarosa. La presencia de proteínas SUMOiladas en los eluidos de la purificación fue nuevamente confirmada por Western blot utilizando anticuerpos anti HA (HisHA-*TbSUMO* S PC– Ver Anexo - **Figura A4**; HisHA-*TbSUMO* D – **Figura 22**). Cabe destacar que en algunos casos, tras el análisis de la muestras por SDS-PAGE y tinción por plata, pudieron visualizarse algunas bandas diferenciales tras el segundo paso de purificación, que no se observan en los eluidos resultantes de la purificación control a partir de parásitos silvestres (Ver Anexo – **Figura A5**). Sin embargo, no fue posible obtener cantidades suficientes para su identificación por espectrometría de masas, tras la digestión en el gel de estas proteínas y la extracción de los péptidos resultantes. En todos los casos, los eluidos del segundo paso de purificación (Eluido a-HA) fueron procesados para su análisis por espectrometría de masas [Ver 1.4. Análisis proteómico: Proteómica PC2 (HisHA-*TbSUMO* S), Proteómica PC3 (HisHA-*TbSUMO* D) y Proteómica BS2 (HisHA-*TbSUMO* D)].

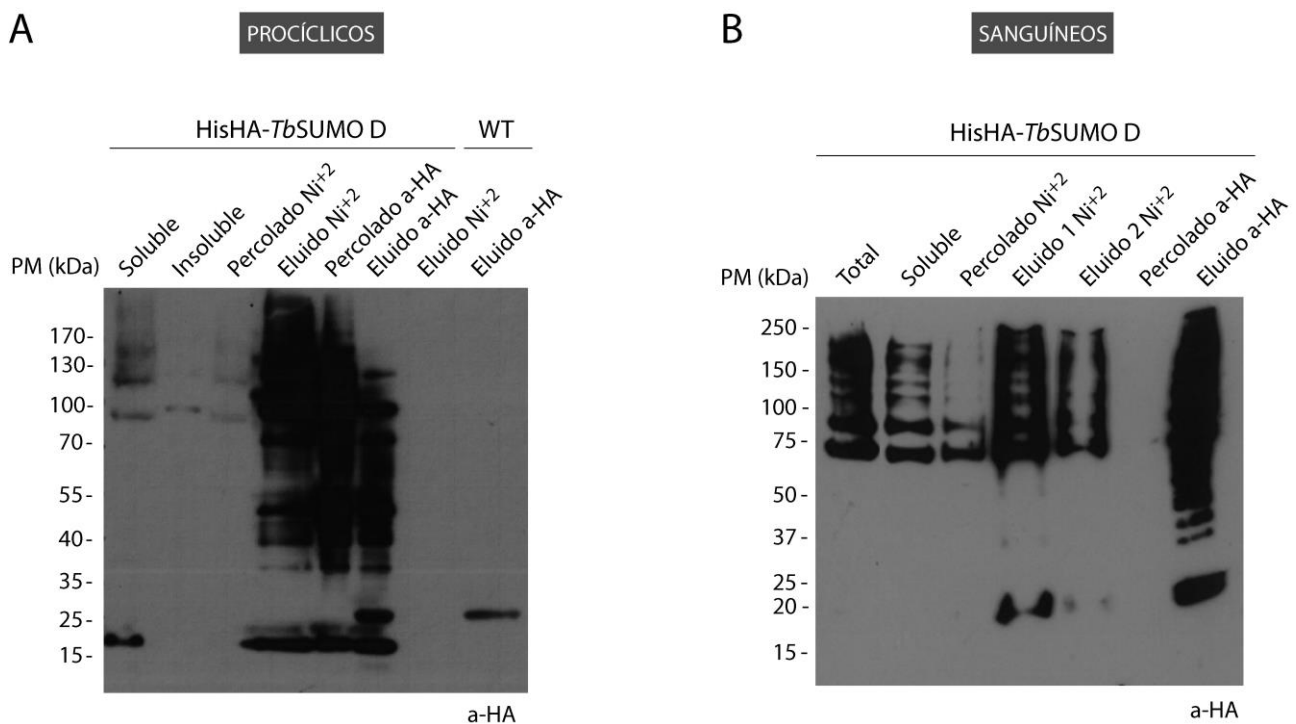


Figura 22. Purificación de proteínas SUMOiladas por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ e inmunoafinidad a anti HA a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO* D. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de la purificación en dos pasos realizada a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO* D (A) PC y (B) BS. HisHA-*TbSUMO* D PC: Soluble: fracción soluble tras lisis en presencia de urea (3×10^7 parásitos); Insoluble: fracción insoluble tras lisis en presencia de urea (3×10^7 parásitos); Percolado Ni²⁺: fracción no retenida por la resina de Ni²⁺ (3×10^8 parásitos); Eluido Ni²⁺: muestra eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni²⁺ (3×10^8 parásitos); Percolado a-HA: fracción no retenida por la resina anti HA (3×10^9 parásitos); Eluido a-HA: muestra eluida con 1% SDS de la resina anti HA (3×10^9 parásitos). WT (parásitos silvestres): Eluido Ni²⁺: muestra eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni²⁺ (3×10^8 parásitos); Eluido a-HA: muestra eluida con 1% SDS de la resina anti HA (3×10^9 parásitos). Se observa en este caso una banda reactiva de aproximadamente 25 kDa producto del anticuerpo anti HA empleado. BS: Total: parásitos totales tras lisis en

presencia de urea (4×10^7 parásitos); Soluble (4×10^7 parásitos); Percolado Ni^{+2} (4×10^7 parásitos); Eluido Ni^{+2} (5×10^8 parásitos); Percolado a-HA (4×10^7 parásitos); Eluido a-HA (3×10^9 parásitos).

La **Figura 23** resume de manera esquemática las distintas aproximaciones implementadas para las líneas celulares de PC y BS, así como los análisis proteómicos generados.

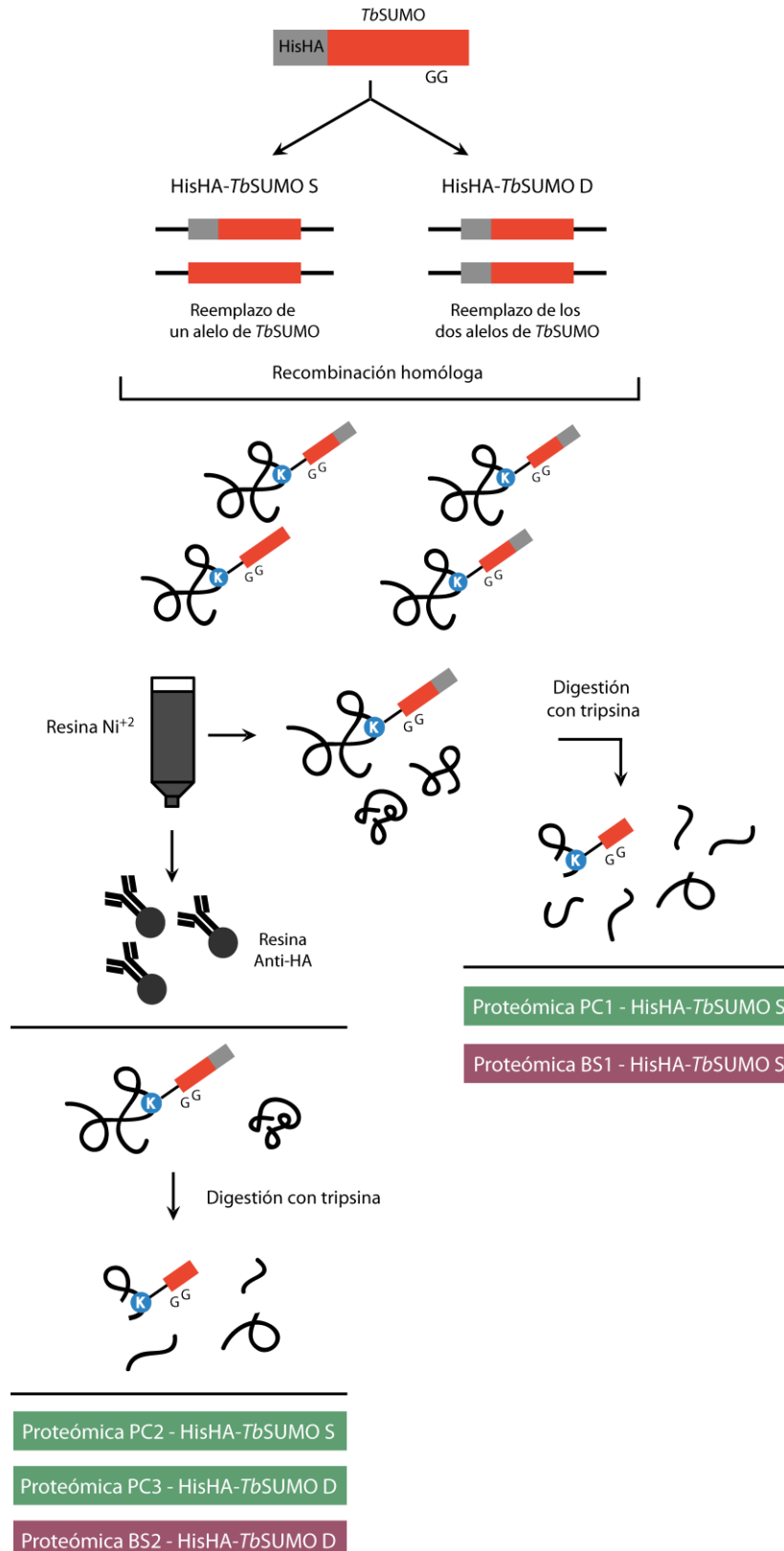


Figura 23. Purificación de proteínas SUMOiladas y análisis proteómico a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO*. Representación esquemática de las distintas estrategias de purificación implementadas a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* de PC y BS, con las distintas proteómicas generadas en cada caso.

1.4 Análisis proteómico: HisHA-*Tb*SUMO S / HisHA-*Tb*SUMO D

Las muestras enriquecidas en conjugados fueron precipitadas con acetona 80% y procesadas para su análisis proteómico realizado por el Dr. Igor Almeida (University of Texas at El Paso (UTEP), Dept. of Biological Sciences, The Border Biomedical Research Center), por ITSI-Biosciences (Pennsylvania, Estados Unidos) o por el Dr. Enrique Calvo (Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, España), según el caso (Ver Anexo – **Tabla A1**). El análisis proteómico de mezclas complejas como las aquí analizadas, involucra en todos los casos la digestión inicial de las proteínas presentes en la muestra (con una o varias proteasas específicas) y la **separación cromatográfica de los péptidos generados en dos dimensiones**: primero mediante una cromatografía de intercambio catiónico y luego por cromatografía en fase reversa que finalmente se acopla a un **espectrómetro de masas (2D LC-MS/MS)**. La **Figura 24** resume de manera esquemática a modo de ejemplo el proceso general, detallado en Materiales y Métodos.

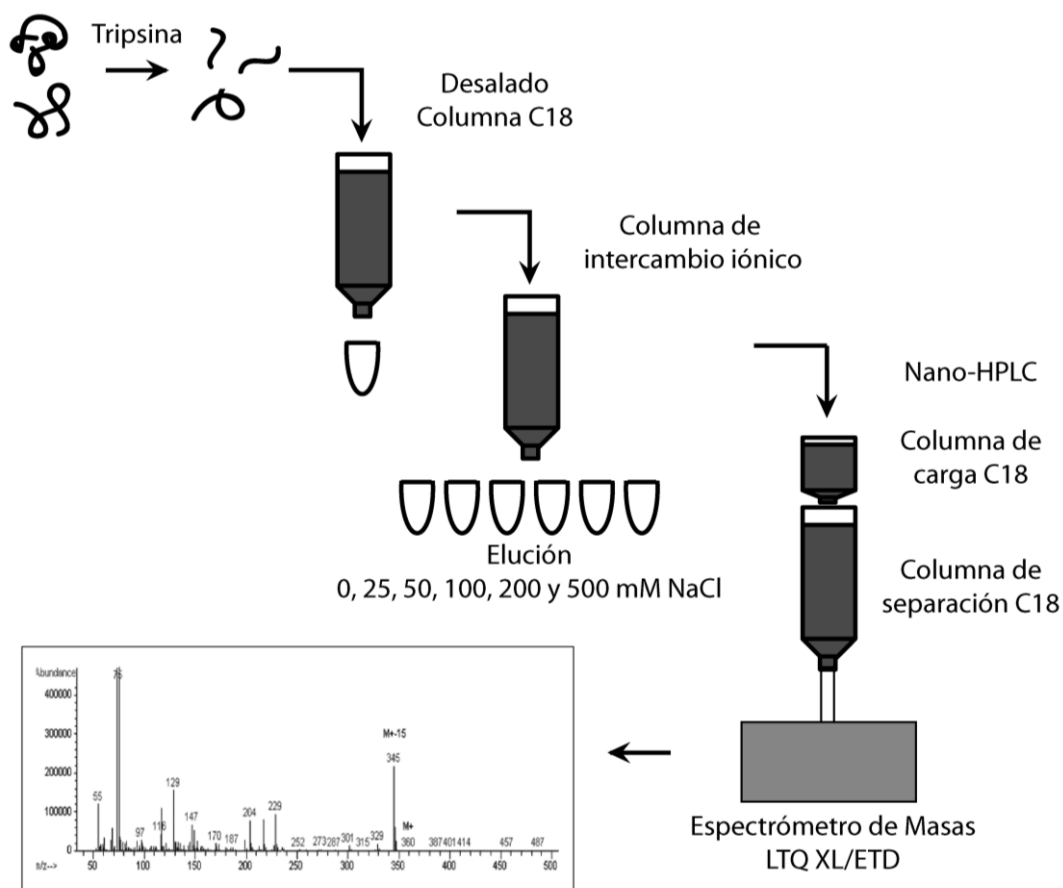


Figura 24. Identificación de proteínas por espectrometría de masas. Representación esquemática del método de identificación de proteínas 2D-LC MS/MS. Brevemente, las muestras precipitadas fueron resuspendidas en un buffer conteniendo urea, los grupos tioles presentes en las proteínas fueron reducidos y alquilados y finalmente se realizó la digestión total de las muestras con la enzima tripsina (peptidasa que hidroliza enlaces peptídicos de manera específica en el extremo C-terminal de residuos de arginina y lisina). La mezcla de péptidos resultante fue desalada por cromatografía de fase reversa C18 (100 mg, 1 ml, Supelco) y llevada a sequedad total por centrifugación al vacío. Las muestras fueron luego resuspendidas en un pequeño volumen y los péptidos fueron separados primeramente mediante un columna de intercambio iónico fuerte (SCX 5 μ l, Optimized Technologies). Las seis fracciones colectadas

tras la elución con distintas concentraciones salinas (0, 25, 50, 100, 200 y 500 mM NaCl) fueron luego procesadas de manera individual y cargadas en una columna de capilaridad de fase reversa C18 (1 cm, 75 μ m, Phenomenex Luna C18, 5 μ m), acoplada a una segunda columna de separación de capilaridad en fase reversa C18 (20 cm, 75 μ m, Phenomex Luna C18, 5 μ m), en un sistema de nano-HPLC (NanoLC-1DPlus, Eksigent). Los péptidos fueron eluidos empleando un gradiente de 5-40% de acetonitrilo (ACN) y analizados en línea con un espectrómetro de masas (LTQ XL/ETD, Thermo Fisher Scientific).

Los espectros MS/MS generados fueron comparados contra una base de datos obtenida a partir de la digestión trípica teórica de las proteínas codificadas en el genoma de *Trypanosoma brucei* Lister 427, *Trypanosoma brucei* Lister 927, *Bos taurus*, keratina humana y tripsina bovina. A partir de los datos obtenidos se generaron tablas de archivos excell, con la información derivada del análisis proteómico.

Para las muestras provenientes de las líneas HisHA-*TbSUMO* S tras un paso de purificación por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} fue posible identificar un total de 72 proteínas significativamente diferenciales respecto del control en PC (Proteómica PC1 – Ver Anexo – Tabla A1 y A2) y 39 en BS (Proteómica BS1 – Ver Anexo – Tabla A1 y A3). Como puede visualizarse en la Figura 25, las proteínas identificadas anotadas funcionalmente, por evidencia experimental o por homología de secuencias, son mayoritariamente de localización citoplasmática y muy pocas se encuentran asociadas a los procesos nucleares esperados en función de los resultados obtenidos por IFI (Ver Figura 16). En este grupo encontramos una DEAD/H ARN helicasa HEL64 y una proteína de unión a ARN nucleolar en la muestra de PC y una metilasa de ADN en la muestra de BS. La proteína NUP-1, componente del complejo de poro nuclear de aproximadamente 400 kDa, fue identificada en las muestras provenientes de los dos estadios del parásito.

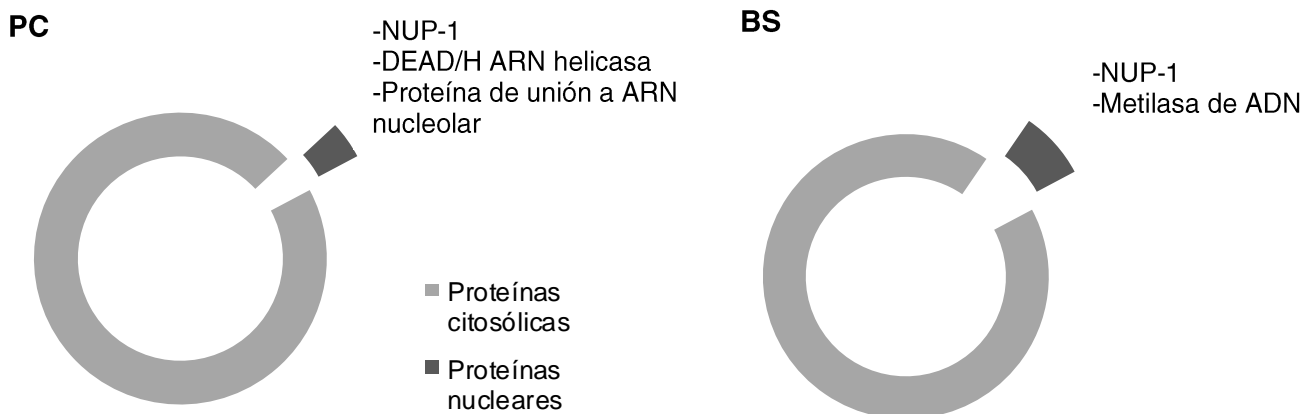


Figura 25. Identificación de proteínas por espectrometría de masas: Proteómicas PC1 y BS1. Representación gráfica de las proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* S de PC y BS tras un paso de purificación de conjugados por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} (Proteómicas PC1 y BS1; Ver Anexo-Tablas A2 y A3). En gris claro se representan las proteínas asociadas a procesos mayoritariamente citosólicos (95,83 % en PC y 92,31% en BS) mientras que en gris oscuro se visualizan proteínas vinculadas a procesos nucleares (4,17% en PC y 7,69% en BS). En cada caso se destacan algunas de las proteínas nucleares identificadas.

A partir de las muestras obtenidas tras dos pasos de purificación de sustratos de SUMOilación de las líneas celulares HisHA-*Tb*SUMO S de PC, fue posible identificar un total de 77 proteínas diferenciales en relación al control (**Proteómica PC2** – Ver Anexo – **Tabla A1 y A4**), siendo estas mayoritariamente de localización citoplasmática (**Figura 26**). Entre las pocas proteínas nucleares identificadas podemos destacar: una proteína nucleolar, una DEAD/H ARN helicasa (distinta a la identificada en la **Proteómica PC1**) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa I. Como fue descrito anteriormente (Introducción), la subunidad mayor de la ARN polimerasa I y no la aquí identificada, ha sido reportada como SUMOilada en BS (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

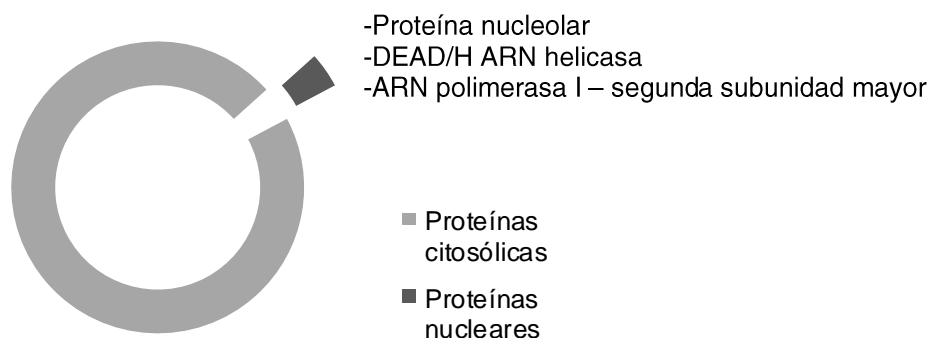


Figura 26. Identificación de proteínas por espectrometría de masas: Proteómica PC2. Representación gráfica de las proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de la línea celular HisHA-*Tb*SUMO S de PC tras dos pasos de purificación de conjugados por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y resina anti HA (Proteómica PC2; Ver Anexo-Tabla A4; resultados totales de ambas fracciones). En gris claro se representan las proteínas asociadas a procesos mayoritariamente citosólicos (96,10%) mientras que en gris oscuro se visualizan proteínas vinculadas a procesos nucleares (3,90%), destacándose algunas de estas.

Resultados equivalentes fueron generados tras el análisis de las muestras obtenidas luego de dos pasos de purificación a partir de las líneas HisHA-*Tb*SUMO D, tanto en PC como en BS (**Figura 27**). En la muestra correspondiente al estadio PC se identificaron 488 proteínas mayoritariamente de localización citosólica (**Proteómica PC3** – Ver Anexo – **Tabla A1 y A5**). Podemos destacar, sin embargo, algunas relacionadas con procesos nucleares: ARN helicasas, una subunidad de la ARN polimerasa II, la proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas 4 (SMC4), las ADN topoisomerasas IA, II y III, proteínas del complejo MCM (minichromosome maintenance), NUP-1 y la histona H2A. En las muestras correspondientes al estadio BS, las proteínas identificadas de manera diferencial en relación al control fueron 228 (**Proteómica BS2** – Ver Anexo – **Tabla A1 y A6**). Nuevamente, las proteínas identificadas fueron mayoritariamente citosólicas, destacándose entre las asociadas a procesos nucleares: el activador de la transcripción TAF1, ARN helicasas, una proteína de unión a la cromatina, NUP-1, una proteína reguladora de la condensación de los cromosomas y proteínas asociadas a procesos de reparación del ADN como MSH2, MLH1 y MKT1.

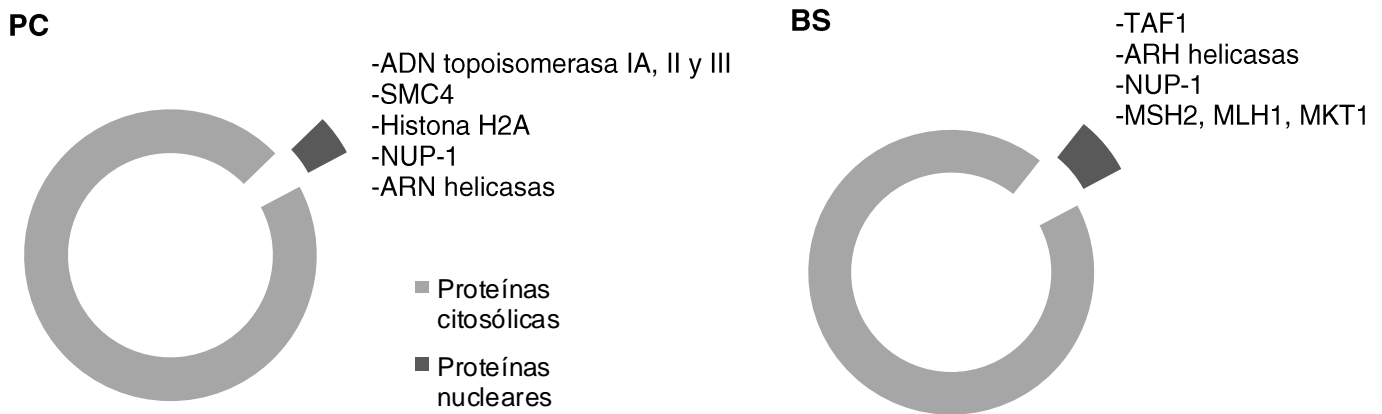


Figura 27. Identificación de proteínas por espectrometría de masas: Proteómicas PC3 y BS2. Representación gráfica de las proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO D* de PC y BS tras dos pasos de purificación de conjugados por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} y resina anti HA (Proteómicas PC3 y BS2; Ver Anexo-Tablas A5 y A6). En gris claro se representan las proteínas asociadas a procesos mayoritariamente citosólicos (95,50 % en PC y 93,42% en BS) mientras que en gris oscuro se visualizan proteínas vinculadas a procesos nucleares (4,50% en PC y 6,58% en BS), destacándose algunas de estas.

1.5 Validación *in vivo* de potenciales blancos de SUMOilación

A continuación, a partir de los primeros resultados obtenidos, decidimos evaluar un subconjunto de las proteínas identificadas por espectrometría de masas para confirmar o descartar su SUMOilación *in vivo* y validar de este modo los resultados. La selección de 16 proteínas a validar (Tabla 1) se realizó, en función del desarrollo cronológico de las líneas celulares y las consecuentes purificaciones, a partir de los potenciales sustratos identificados en la Proteómica PC1 (Tabla A2). Las proteínas seleccionadas se relacionan con procesos de síntesis proteica, ubiquitinación, unión a ARN, entre otros.

PROTEÍNA IDENTIFICADA	
1	Proteína ribosomal 60S L10a
2	Proteína ribosomal 60S L18
3	Proteína ribosomal 60S L34
4	Proteína ribosomal 40S S8
5	Proteína de unión a ARN nucleolar
6	Uracil fosforibosil-transferasa
7	Proteína ribosomal 40S S6
8	Subunidad regulatoria ATPasa de proteasa
9	Proteína 39 con dominio zinc finger CCCH
10	Proteína ribosomal 60S L13a
11	Guanilato kinasa
12	Subunidad 7-like del factor de inicio de la traducción eucariota 3

13	Mevalonato kinasa
14	Proteína no caracterizada con dominio ubiquitin-like
15	Adenosina 5'-monofosforamidasasa
16	Proteína pequeña de unión a GTP

Tabla 1. Potenciales sustratos de SUMOilación seleccionados para su validación *in vivo*. Las proteínas listadas fueron seleccionadas a partir de aquellas identificadas en base a la purificación de sustratos de SUMOilación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ en parásitos HisHA-*Tb*SUMO S PC.

Para la validación empleamos una estrategia de sobre-expresión inducible por tetraciclina de las diferentes proteínas a evaluar fusionadas a una etiqueta de Flag repetida tres veces (3xFlag). Para esto utilizamos el vector pRP (cedido por el Dr. David Horn del College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, Escocia) modificado para permitir fusiones al N- o al C-terminal de las proteínas a evaluar (Figura 28; Ver Materiales y Métodos). Brevemente, utilizando dos pares de enzimas de restricción que reconocen secuencias diferentes pero liberan los mismos extremos cohesivos (*Bam*HI/*Bg*II y *Avr*II/*Xba*I) fue posible etiquetar, empleando un mismo par de oligonucleótidos específico para cada potencial sustrato con el sitio de corte para una de las enzimas del par, la proteína de interés en su extremo N o C-terminal en función de cómo se digiera el vector.

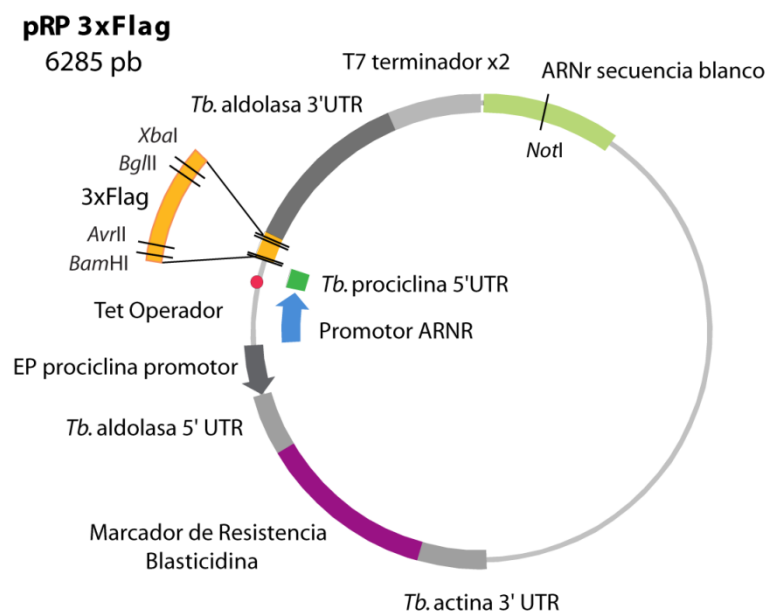


Figura 28. Etiquetado de potenciales sustratos de SUMOilación para su validación *in vivo*. Representación esquemática de la construcción pRP 3xFlag utilizada para realizar la validación *in vivo* de las proteínas blanco seleccionadas. Esta estrategia permite la expresión de la proteína a evaluar modificada en el extremo N o C-terminal con el epitope 3xFlag.

Estas construcciones se utilizaron para transfectar **parásitos PC HisHA-TbSUMO S**, conteniendo además el vector pLew13 (T7 ARN Polimerasa y represor Tet), que permite el funcionamiento del sistema.

Las proteínas seleccionadas fueron expresadas correctamente con la etiqueta 3xFlag en su extremo C-terminal siendo esto evaluado por IFI y Western blot utilizando anticuerpos monoclonales anti Flag comerciales.

Dado que en ningún caso fue posible visualizar por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag, bandas de menor movilidad electroforética compatibles con bandas de SUMOilación en extractos de parásitos totales, decidimos aplicar distintas estrategias de enriquecimiento, normalmente empleadas en la visualización *in vivo* de este tipo de modificaciones normalmente presentes en baja proporción.

De esta manera, purificamos mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ en condiciones desnaturalizantes, proteínas unidas covalentemente a HisHA-TbSUMO y evaluamos por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag, la presencia de bandas de menor movilidad electroforética producto de la SUMOilación de la proteína en estudio, en el eluido con 500 mM de imidazol.

En paralelo, realizamos en cada caso una purificación por afinidad utilizando anticuerpos anti Flag conjugados a agarosa, para enriquecer la muestra en la proteína en estudio en todas sus eventuales variantes modificadas post-traduccionalmente; esto se realizó en todos los casos en presencia de inhibidores de proteasas para contrarrestar la deconjugación de sustratos de SUMOilación. Los eluidos resultantes fueron analizados por Western blot empleando anticuerpos anti Flag, para visualizar la proteína en estudio y eventuales bandas de menor movilidad electroforética enriquecidas en la muestra, y anti HA para evaluar si estas bandas eventualmente observadas son producto de la modificación de la proteína en estudio por HisHA-TbSUMO.

La **Figura 29 A** muestra el esquema general de trabajo y los perfiles teóricos esperados para una proteína verdaderamente SUMOilada.

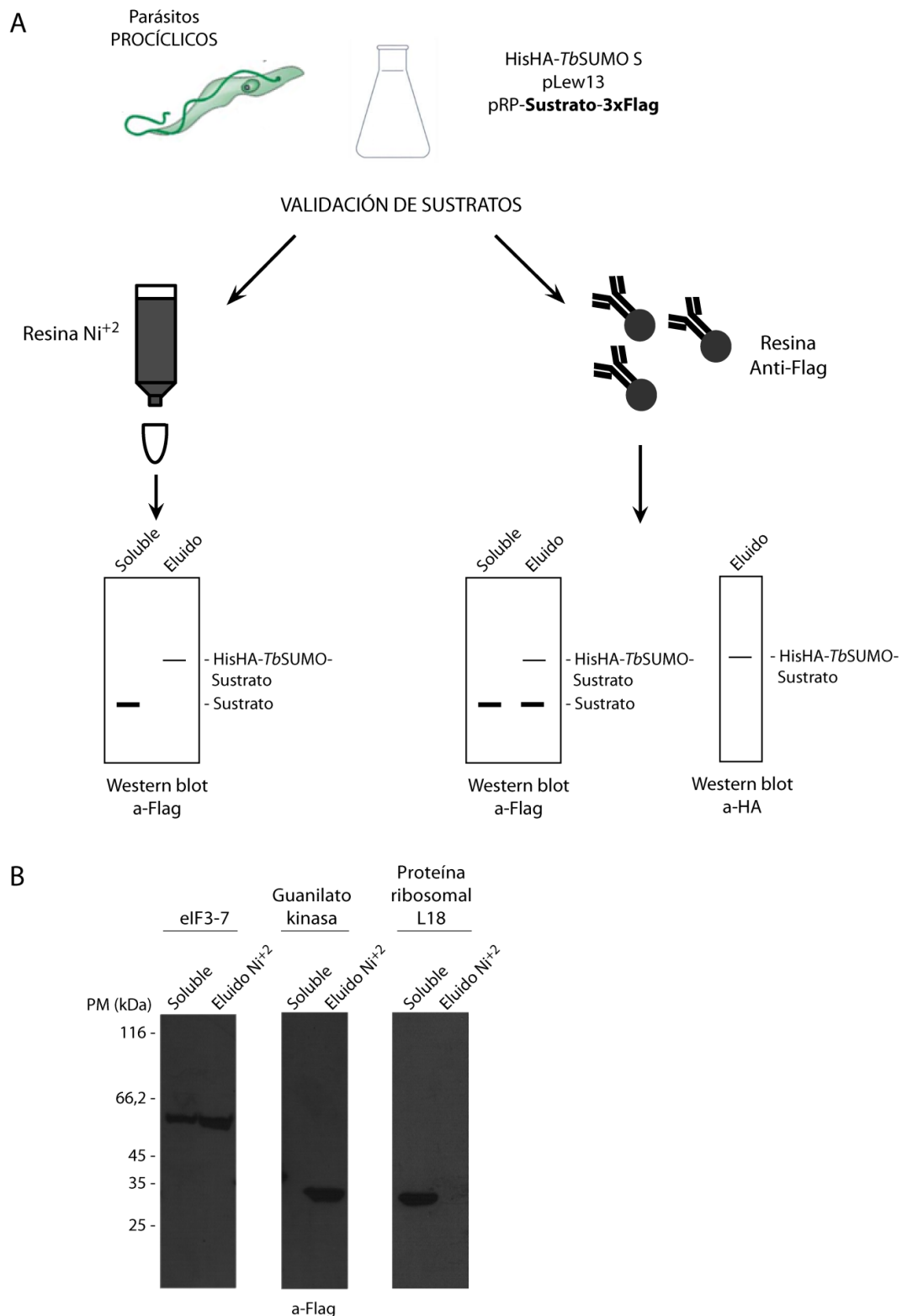


Figura 29. Validación de potenciales sustratos de SUMOilación *in vivo*. (A) Representación esquemática de las estrategias empleadas para el análisis de SUMOilación de potenciales sustratos en parásitos PC HisHA-TbSUMO S - pLew13 expresando la proteína a evaluar fusionada a la etiqueta 3xFlag (Tabla 1). (B) Análisis por Western blot empleando anticuerpos anti Flag de la purificación de proteínas SUMOiladas a partir de las líneas mencionadas en (A) por cromatografía de afinidad a Ni²⁺. En todos los casos se confirmó previamente la purificación exitosa de conjugados por Western blot utilizando anticuerpos anti HA. Soluble: fracción soluble tras lisis en presencia de urea (3x10⁷ parásitos); Eluido: muestra retenida y luego eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni²⁺ (2x10⁹ parásitos).

De manera general, para ninguna de las proteínas evaluadas se observaron bandas de menor movilidad electroforética compatibles con bandas de SUMOilación, ni en muestras enriquecidas en proteínas SUMOiladas por unión a resina de Ni²⁺ y posterior elución en un menor volumen, ni en muestras donde la proteína a evaluar fue concentrada por inmunoafinidad utilizando resina anti Flag.

Como puede visualizarse a modo de ejemplo en la **Figura 29 B**, se observaron proteínas aparentemente no SUMOiladas como la L18 ribosomal, que no fueron enriquecidas significativamente en el eluido tras la purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y otras, como la guanilato kinasa o la subunidad 7 del factor de iniciación de la traducción 3 (eIF3-7), en las que vemos enriquecimiento en el eluido aunque sin el aumento de peso molecular esperado tras la unión covalente de HisHA-*TbSUMO*.

El análisis de los resultados obtenidos a partir de estos ensayos nos estaría indicando *a priori* que las proteínas evaluadas son **contaminantes de la purificación** de conjugados y no verdaderos blancos de SUMOilación.

1.6 Conclusiones parciales

Considerando de manera global los resultados obtenidos a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* S y D es posible concluir que la mayor parte de las proteínas identificadas por MS tras realizar uno o dos pasos de purificación de conjugados, no poseen en principio localización nuclear ni participan en procesos celulares asociados a SUMOilación en otros organismos, constituyendo mayoritariamente **contaminantes del proceso de purificación**.

Sin embargo, estas líneas celulares han sido útiles para evaluar la **funcionalidad** de las proteínas de fusión generadas HisHA-*TbSUMO*, comportándose estas variantes de manera equivalente a su versión silvestre. El **doble reemplazo** de los alelos silvestres por esta versión modificada permite además maximizar la cantidad de proteínas SUMOiladas disponibles, siendo esta la **condición óptima** para su posterior purificación e identificación por MS, de manera independiente de la estrategia empleada.

CAPÍTULO II

Identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en *Trypanosoma brucei*: estrategia para la reducción de contaminantes e identificación de sitios de SUMOilación

2.1 Generación de líneas celulares que expresan una versión modificada de *TbSUMO*

Considerando los resultados obtenidos a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* decidimos implementar una nueva estrategia descrita por Matic *et al.* (Matic, Schimmel et al. 2010), para reducir el número de proteínas contaminantes que co-purifican con las proteínas SUMOiladas de interés por cromatografía de afinidad a Ni²⁺.

La construcción empleada presenta, al igual que la descrita inicialmente (**Figura 8**), un tracto de His y el epítopo HA tras los primeros tres aminoácidos del extremo N-terminal de *TbSUMO* y contiene, además, mutaciones en su secuencia codificante que permiten **reemplazar los 8 residuos de lisina** presentes naturalmente en *TbSUMO* por **argininas** (**Figura 30**). Este cambio permite mantener la estructura global de la proteína, al estar ambos residuos cargados positivamente, y la hace resistente a la acción de la **enzima Lys-C** (endoproteasa que cliva proteínas al C-terminal de residuos de lisinas). De esta manera, el tratamiento previo de las muestras ricas en conjugados a esta variante con la proteasa mencionada produce la digestión de las proteínas blanco SUMOiladas y contaminantes pero no de esta versión de *TbSUMO*. La subsiguiente purificación de conjugados por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ a partir de las etiquetas inalteradas de esta variante de *TbSUMO*, permite en este caso la purificación de péptidos SUMOilados unidos covalentemente al modificador. Esta estrategia permite **disminuir la cantidad de proteínas contaminantes** que co-purifican de manera inespecífica **al reducirlas a péptidos** que presentan menor capacidad de unión a la resina empleada.

En paralelo, además de las etiquetas y mutaciones mencionadas, introdujimos una modificación adicional para favorecer la **identificación de los residuos de lisina SUMOilados en las proteínas blanco**. Esta estrategia, descrita en 2005 por Galisson *et al.* (Galisson, Mahrouche et al. 2011), involucra el reemplazo del residuo de treonina en posición 106 (previo al motivo diglicina de *TbSUMO*) por una arginina (**T106R**), generando un nuevo sitio de corte por tripsina en esta versión de *TbSUMO*: HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} (**Figura 30**).

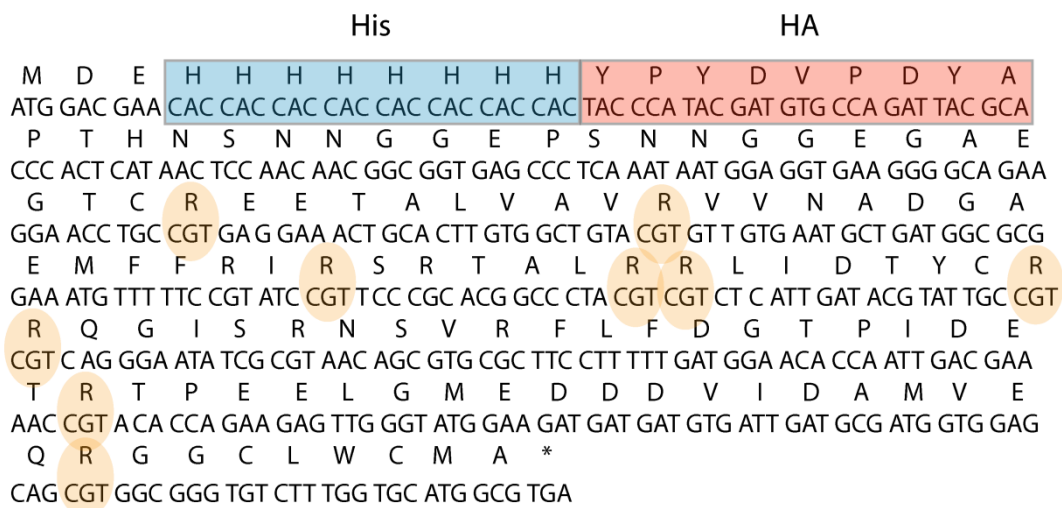


Figura 30. Esquema de la variante HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}. Secuencia aminoacídica y nucleotídica de *TbSUMO* con el agregado de His y HA tras los primeros tres aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína. Se resaltan los residuos de lisina y la treonina 106 (previa al motivo diglicina) reemplazadas por argininas (naranja).

Como se mencionó anteriormente en el Capítulo I, las muestras proteicas conteniendo conjugados para análisis por MS son inicialmente tratadas con una o varias proteasas y luego estos péptidos son identificados. Empleando una variante de *TbSUMO* silvestre (o HisHA-*TbSUMO*), tras el tratamiento enzimático con tripsina (que corta en el extremo C-terminal de residuos de lisina y arginina) un péptido SUMOilado presenta unido covalentemente a la lisina modificada un fragmento de *TbSUMO* de aproximadamente 2300 Da (22 aminoácidos), que al fragmentarse durante el análisis por MS genera una mezcla compleja de péptidos que dificulta el análisis e interpretación de los resultados (Matic, Schimmel et al. 2010) (Figura 31 A). Por el contrario, el empleo de la versión HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} con un nuevo sitio de corte por tripsina previo al motivo diglicina de *TbSUMO*, permite que, tras la digestión mencionada, el fragmento de *TbSUMO* unido covalentemente a las lisinas modificadas en los péptidos blanco se reduzca a 114,1 Da (el motivo diglicina). Estos “péptidos firma” pequeños, en forma de T, pueden ser predichos y detectados por MS, permitiendo así la identificación no solo de las proteínas que están siendo SUMOiladas sino también de el/los residuo/s de lisina que están siendo modificados en los distintos blancos (Figura 31 B).

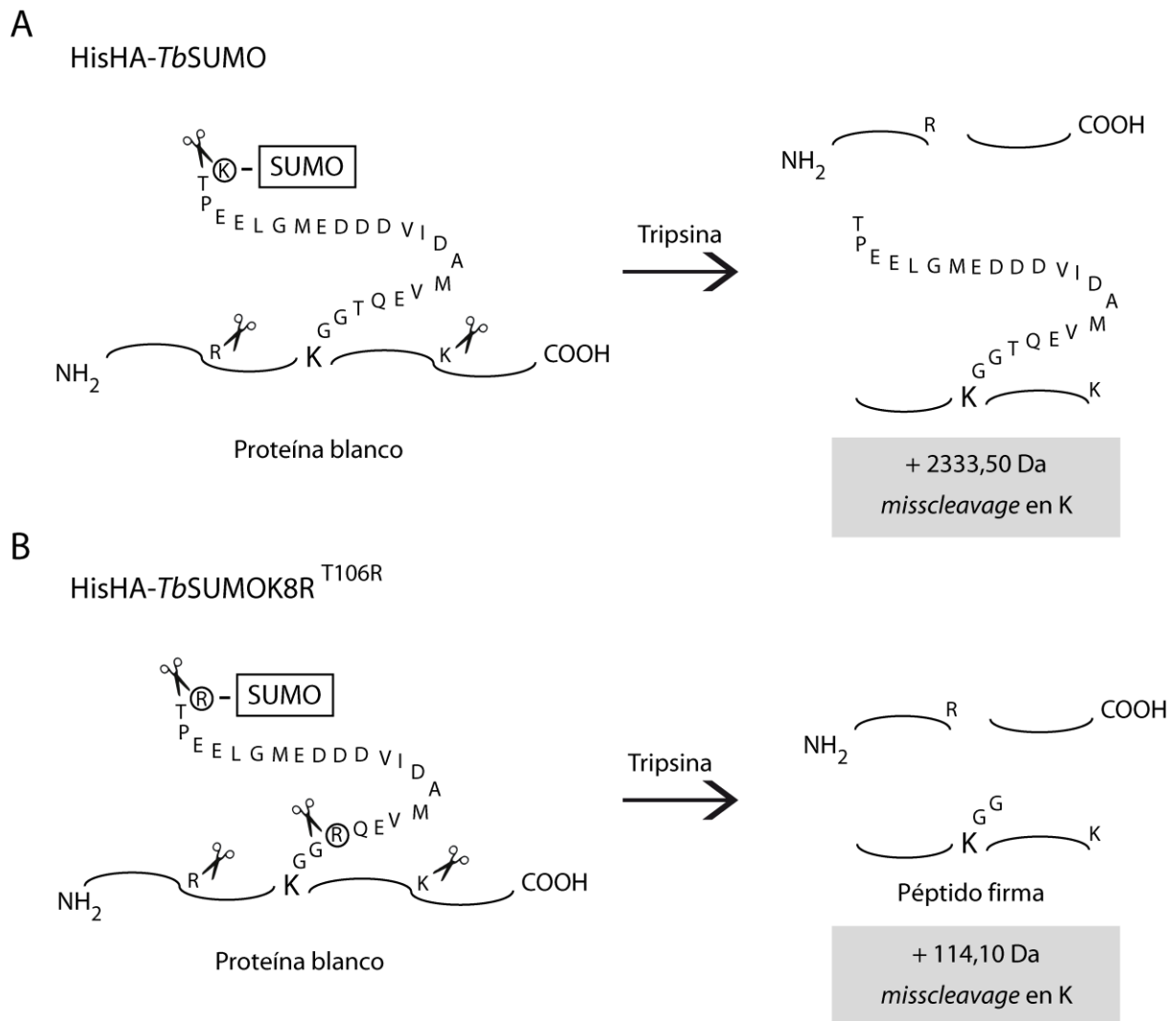


Figura 31. Generación de “péptidos firma”. (A) Proteínas conjugadas a *Tb*SUMO tras la digestión con tripsina. El fragmento de *Tb*SUMO unido covalentemente al péptido resultante tras la digestión es difícilmente identificable por espectrometría de masas. (B) La mutación T106R introduce un nuevo sitio de clivaje para tripsina, generando un “péptido firma” más pequeño. Esta modificación puede ser detectada más fácilmente por espectrometría de masas permitiendo así la identificación de las lisinas SUMOiladas.

Es importante destacar que las modificaciones introducidas en esta versión HisHA-*Tb*SUMOK8R^{T106R} eliminan su eventual capacidad de conjugación a otro monómero equivalente de *Tb*SUMO, formando cadenas, al carecer de lisinas conjugables. Esta nueva variante es entonces una versión no SUMOilable: conserva la capacidad de SUMOilar diversas proteínas (al conservar el motivo diglicina intacto) pero **no puede ser SUMOilada por otras moléculas de *Tb*SUMO** (formando cadenas de dos o más monómeros) al carecer de lisinas internas.

Para la generación de esta construcción, las secuencias nucleotídicas correspondientes al 5'UTR de *Tb*SUMO, al ORF de HisHA-*Tb*SUMOK8R^{T106R} (Figura 30) y al 3'UTR de *Tb*SUMO, fueron sintetizadas químicamente (GenScript) y clonadas nuevamente en el vector de reemplazo pEnT6P (con marcador de resistencia a puromicina) y pEnT6H (con marcador de resistencia a higromicina) (Kelly, Reed et al. 2007) (Figura 32).

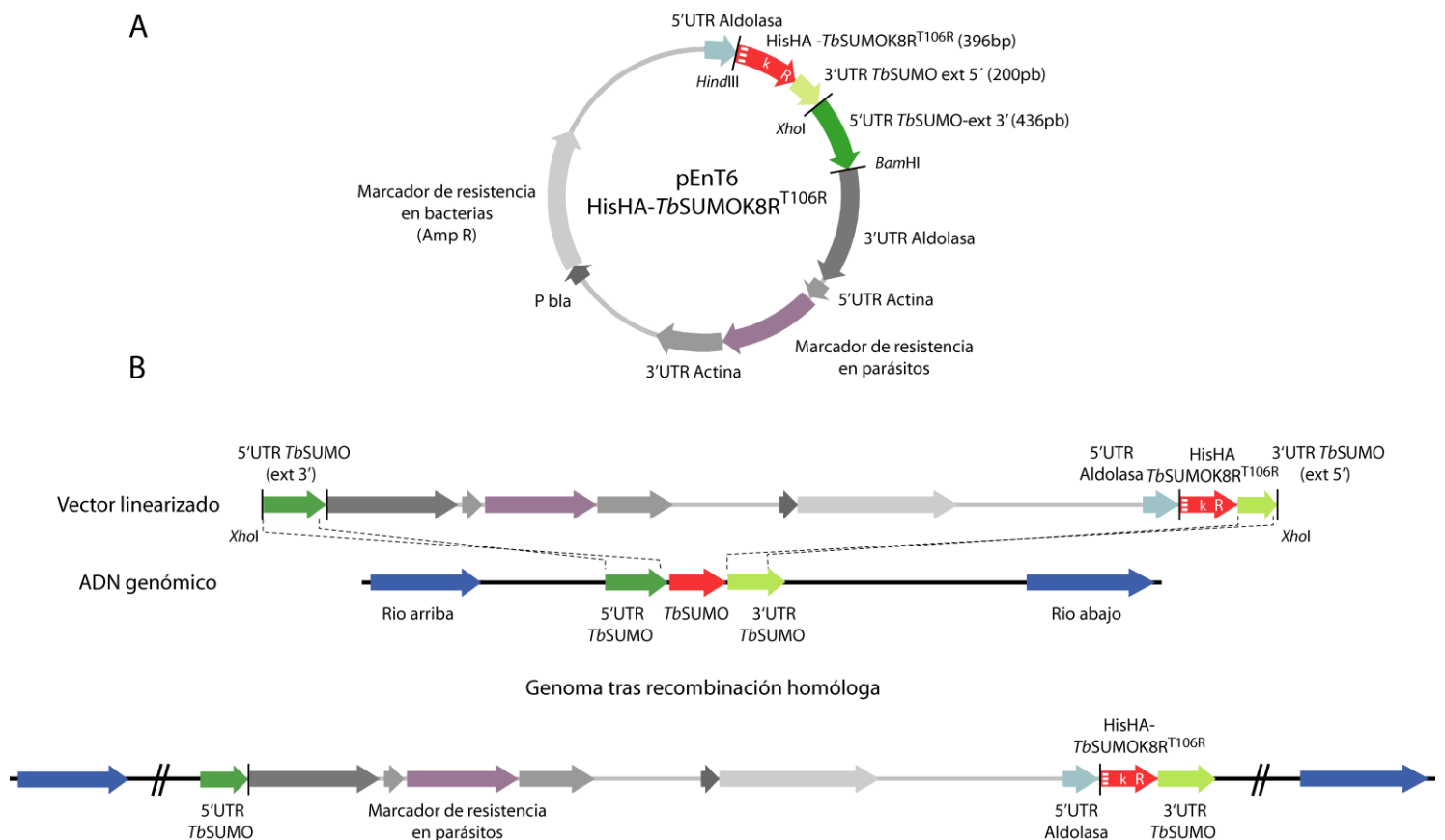


Figura 32. Reemplazo del gen endógeno de *TbSUMO* por la variante HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}. (A) Representación esquemática de la construcción HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} en el vector pEnT6. En rojo se observa el ORF del gen que codifica para *TbSUMO* con el agregado de etiquetas de His y HA (líneas blancas) y las mutaciones esquematizadas en la Figura 31. En verde se observa el extremo 3' del 5'UTR y el extremo 5' del 3'UTR del gen, necesarios para la recombinação. La enzima de restricción *XhoI* fue utilizada en todos los casos para linealizar el vector. (B) Representación esquemática de la recombinação teórica y la inserción de la construcción HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} en el genoma del parásito.

Estas construcciones fueron empleadas para transfectar de manera secuencial por electroporación parásitos PC y BS. Los parásitos seleccionados con puomicina e higromicina fueron clonados por dilución límite de manera equivalente a lo descrito para las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* D (Figura 10).

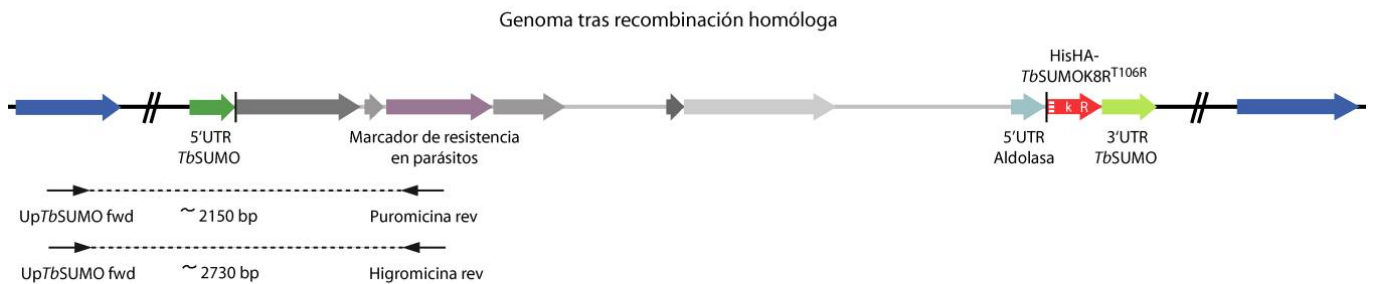
Las líneas celulares empleadas en los dos estadios replicativos del parásito son aquellas que poseen un doble reemplazo del gen silvestre por la variante HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}, expresando de manera exclusiva esta versión bajo el control del 3'UTR endógeno.

2.2 Confirmación del reemplazo y análisis de la proteína de fusión generada

2.2.1 Evaluación de las líneas celulares: análisis del reemplazo de los alelos de *TbSUMO*

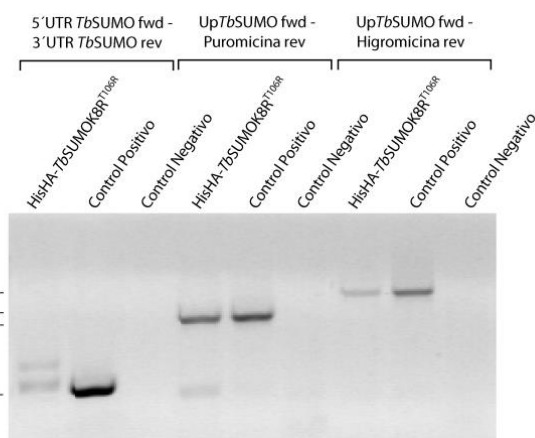
De manera equivalente a lo desarrollado en el Capítulo I para las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*, primeramente se procedió a confirmar el reemplazo de los alelos de *TbSUMO* por la variante HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} en los diferentes clones de PC y BS. Para esto, se realizó la extracción de ADN genómico de los distintos clones a evaluar y se analizó el producto de amplificación obtenido por PCR empleando oligonucleótidos específicos que hibridan sobre el marcador de resistencia presente y sobre el gen río arriba de *TbSUMO* en el ADN genómico (Figura 33 A). La presencia de los fragmentos esperados que confirman la correcta recombinación de los vectores puede visualizarse en la Figura 33 B y C.

A



B

PROCÍCLICOS



C

SANGUÍNEOS

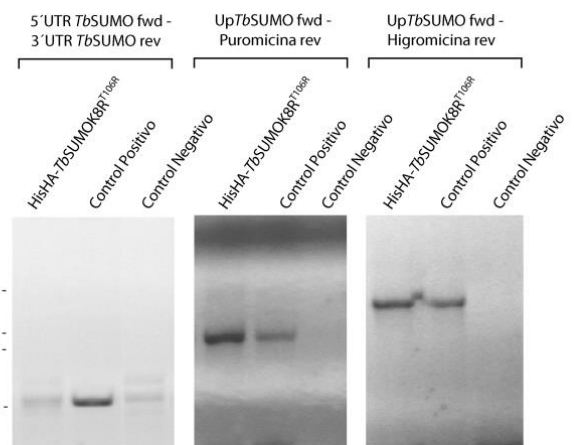


Figura 33. Confirmación de la recombinación de la construcción HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} en el genoma del parásito. (A) Representación teórica del genoma del parásito tras la recombinación. Las flechas señalan los oligonucleótidos empleados en la confirmación de la localización del reemplazo y los productos de amplificación esperados. Productos de PCR separados por electroforesis en un gel de agarosa 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio y transiluminación UV. Los amplicones fueron obtenidos a partir de ADN genómico extraído de las líneas celulares de (B) PC y (C) BS. HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}: ADN genómico extraído a partir de parásitos con el reemplazo de los dos alelos de *TbSUMO* por HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}; Control positivo: ADN genómico extraído a partir del conjunto de parásitos PC tras el reemplazo de los dos alelos de *TbSUMO* por HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} (sin

clonar) (B) o a partir de parásitos BS HisHA-*TbSUMO* D (clon) (C); Control Negativo: mezcla de reacción sin el agregado de ADN.

La **ausencia de la variante silvestre del gen** tras el segundo reemplazo exitoso fue confirmada por PCR empleando oligonucleótidos que hibridan sobre el 5'UTR y el 3'UTR de *TbSUMO*. Estos oligonucleótidos permiten la amplificación de un producto de aproximadamente 500 pb si persiste en el genoma una copia silvestre del gen de *TbSUMO* (**Figura 33 B y C**). De manera equivalente a lo observado para las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* D, aproximadamente 1 de cada 5 clones analizados en los dos estadios del parásito en estudio no presentaban amplificación de este fragmento, observándose en los restantes el alelo silvestre aún tras un doble reemplazo exitoso (Ver Anexo – **Figura A1**).

La identidad del alelo reemplazado y la recombinación adecuada conservando la fase en el extremo 3' del gen, fue confirmada por **secuenciación** de los productos de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos complementarios a las etiquetas His-HA y al 3'UTR conservado del gen.

Con el objetivo de optimizar la obtención de conjugados a HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} en todos los casos se continuó el estudio con las **líneas celulares** que poseen un **doble reemplazo exitoso** y que **carecen de la versión silvestre del gen**.

2.2.2 Evaluación de las líneas celulares: análisis del patrón de SUMOilación por Western blot y de la localización subcelular de los conjugados por inmunofluorescencia indirecta

Posteriormente, evaluamos por Western blot utilizando anticuerpos anti HA la capacidad de conjugación de esta variante a las distintas proteínas blanco. Como puede visualizarse en la **Figura 34**, HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} conserva su **capacidad de conjugación intacta**, observándose un **patrón de bandas de alto peso molecular**, y destacándose dos bandas principales con migración electroforética similar a la de los marcadores de peso molecular de 100 kDa y 130 kDa. Dado que el patrón de bandas observado en cada caso es complejo resulta difícil identificar con certeza bandas diferenciales en los patrones analizados por Western blot de las líneas HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}, HisHA-*TbSUMO* (**Figura 14**) y parásitos silvestres (**Figura A2**).

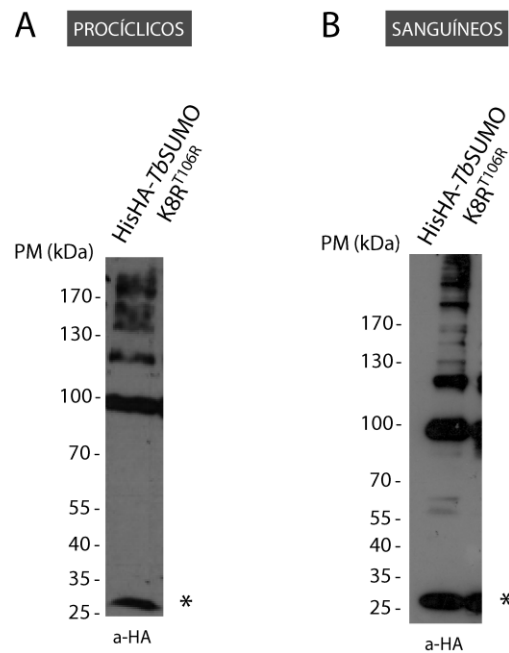


Figura 34. Expresión y conjugación de HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}. Análisis por Western blot de extractos de parásitos HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti HA. HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} PC: $\sim 3,5 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición corto; HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} BS: $\sim 1,5 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición largo. Las bandas cercanas al marcador de peso molecular de 25 kDa (*) se corresponden con la forma libre de HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}.

La expresión y localización subcelular de HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} fue evaluada por IFI utilizando anticuerpos anti HA. Como puede observarse en la **Figura 35**, las líneas celulares analizadas presentan una distribución nuclear característica, equivalente a la visualizada en las líneas silvestre con anticuerpos anti SUMO (**Figura 16**). De manera equivalente a lo descrito anteriormente para las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*, se observan numerosos **focos de SUMOilación definidos** en los **núcleos** de parásitos PC y solamente uno en las líneas celulares de BS. Como fue mencionado anteriormente, esta observación ha sido asociada a la expresión de la VSG activa en BS (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

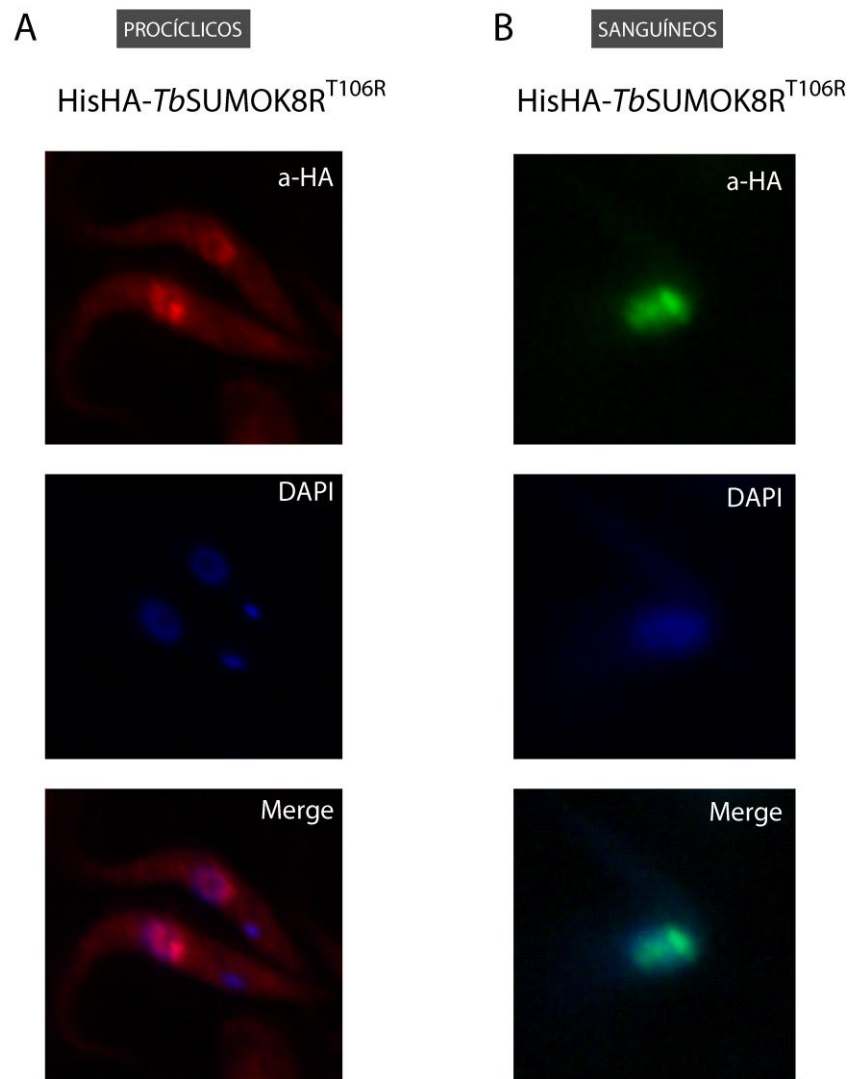


Figura 35. Expresión y sublocalización celular de HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}. Inmunofluorescencias de parásitos HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti HA. En todos los casos el kinetoplasto y el ADN nuclear se visualizan por tinción con DAPI (azul). Se observa también la superposición anti HA-DAPI (Merge).

2.2.3 Evaluación de las líneas celulares: curvas de crecimiento

Las líneas celulares generadas fueron mantenidas en cultivo de manera axénica en presencia de puromicina e higromicina. El **crecimiento** en cultivo de estos parásitos fue evaluado de manera comparativa con parásitos silvestres, sin observarse diferencias marcadas (Figura 36) ni alteraciones morfológicas relevantes.

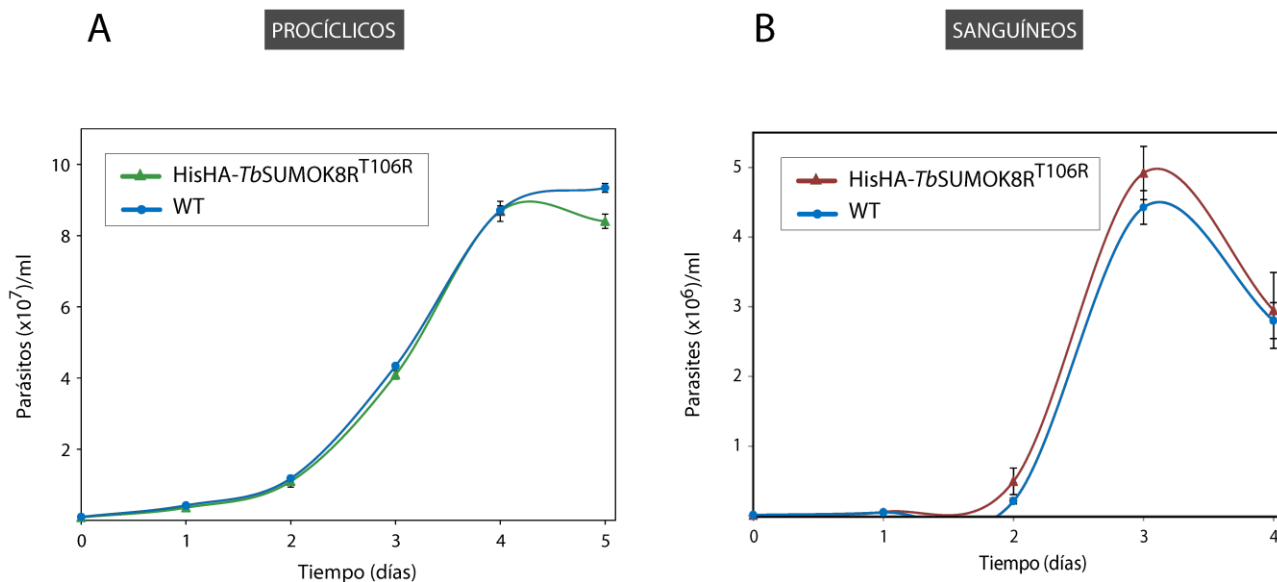


Figura 36. Crecimiento en cultivo de las líneas celulares HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}. Curvas de crecimiento de parásitos HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} (A) PC y (B) BS, de manera comparativa con líneas silvestres (WT).

Considerando la esencialidad de SUMO en *T. brucei* (Liao, Wang et al. 2010; Obado, Bot et al. 2011) y las características de las líneas evaluadas, que expresan únicamente una versión de *TbSUMO* carente de lisinas, estos resultados estarían indicando que la **formación de cadenas de *TbSUMO***, de ocurrir *in vivo*, no sería un proceso esencial para la viabilidad del parásito. Observaciones similares han sido reportadas en levaduras (Bylebyl, Belichenko et al. 2003).

2.3 Purificación de proteínas SUMOiladas

Tras la evaluación de las líneas celulares HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} de BS y PC procedimos a la purificación de conjugados para la identificación de proteínas SUMOiladas y sus sitios de SUMOilación por MS.

De esta manera, cultivamos de manera axénica 2,5x10⁹ parásitos PC y 1,7x10⁹ parásitos BS (equivalente a 150 ml y 1 litro de cultivo respectivamente) como material de partida para la purificación⁴. En todos los casos, teniendo en cuenta lo analizado para las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*, consideramos las mejores condiciones de expresión y conjugación de esta

⁴ El número de parásitos colectados en este caso es menor al empleado para realizar las purificaciones a partir de las líneas HisHA-*TbSUMO* dada la cantidad limitante de Lys-C disponible.

variante de *TbSUMO* en función del estado metabólico del parásito y el rendimiento de la purificación (Figura 19), y procesamos las muestras de manera equivalente a lo descrito anteriormente para preservar los conjugados de la acción de proteasas deconjugadoras en base a las condiciones óptimas de estabilidad ya mencionadas (Figura 18).

Los parásitos cosechados por centrifugación fueron resuspendidos en un buffer de lisis conteniendo 6 M urea, para desnaturalizar las proteasas deconjugadoras de *TbSUMO* presentes en la muestra y permitir la purificación exclusiva de proteínas unidas covalentemente a HisHA-*TbSUMOK8R^{T106R}*. Las muestras resultantes fueron sonicadas hasta pérdida de viscosidad, clarificadas por centrifugación y enriquecidas en conjugados a HisHA-*TbSUMOK8R^{T106R}* por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} en condiciones desnaturalizantes, para reducir la cantidad de proteína a ser digerida posteriormente por Lys-C. Los eluidos resultantes fueron desalados mediante una cromatografía de exclusión molecular comercial PD-10, para remover la urea y el imidazol presentes en las muestras. Posteriormente las proteínas fueron reducidas a péptidos por incubación con la endoproteasa Lys-C y finalmente recromatografiadas como fue descrito inicialmente para favorecer la purificación de péptidos unidos covalentemente a HisHA-*TbSUMOK8R^{T106R}*. El trabajo en condiciones desnaturalizantes no fue necesario en este último paso de cromatografía de afinidad a Ni^{+2} , ya que los problemas relacionados con la presencia de proteasas deconjugadoras y la co-purificación de interactores no covalentes de *TbSUMO* habían sido ya superados tras el primer paso de purificación en presencia de urea (Figura 37).

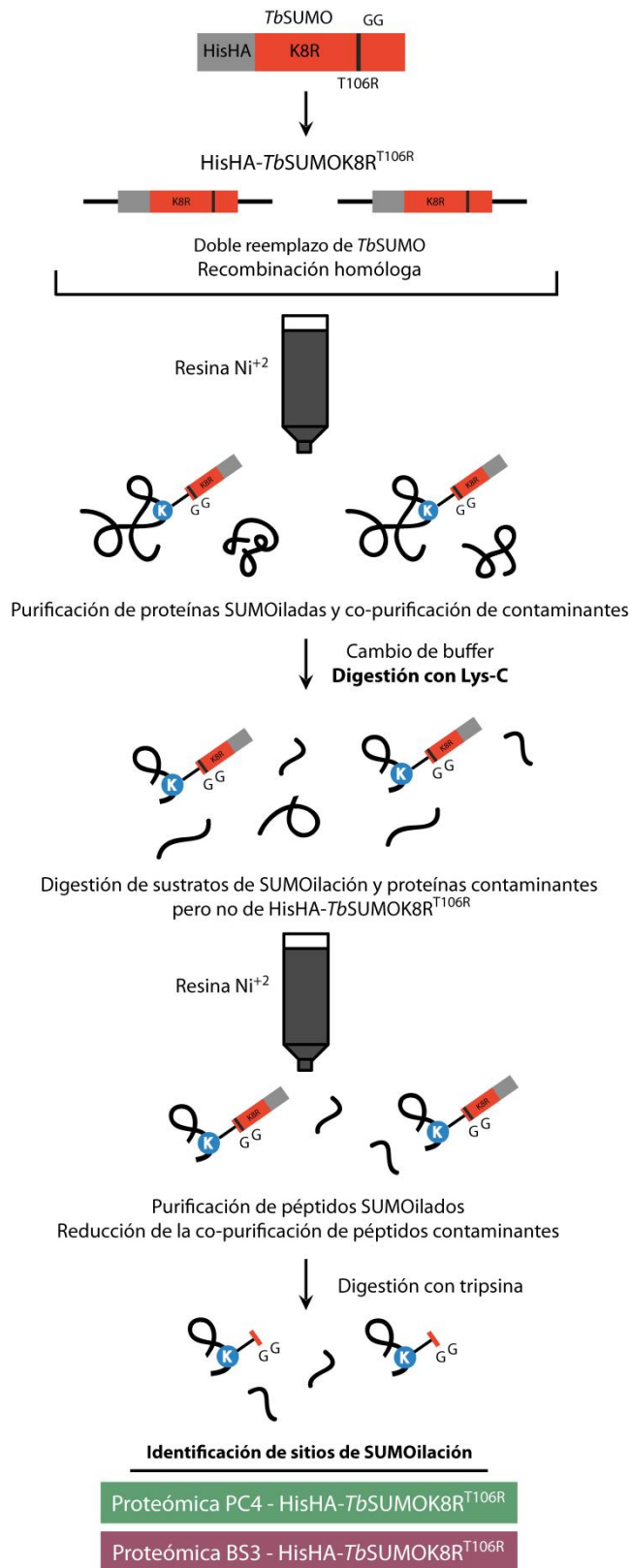


Figura 37. Purificación de proteínas SUMOiladas y análisis proteómico a partir de parásitos HisHA-TbSUMOK8R^{T106R}. Representación esquemática de la estrategia de purificación implementada a partir de las líneas celulares HisHA-TbSUMOK8R^{T106R} de PC y BS, con las distintas proteómicas generadas en cada caso.

La presencia de sustratos de SUMOilación en los eluidos tras el primer paso de purificación y de péptidos modificados tras el segundo paso cromatográfico fue confirmada por Western blot empleando anticuerpos anti HA (Figura 38). Los eluidos tras el primer paso de purificación presentan un patrón de bandas continuo producto del enriquecimiento de proteínas SUMOiladas que se encuentran normalmente en muy baja proporción. Los péptidos unidos a HisHA-TbSUMOK8R^{T106R} obtenidos tras la digestión de conjugados con Lys-C y purificados por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ no pueden diferenciarse en su migración electroforética, por lo que se visualizan como una única banda de aproximadamente 25 kDa. Este patrón característico confirma la digestión completa de los conjugados presentes en la muestra tras el primer paso de purificación.

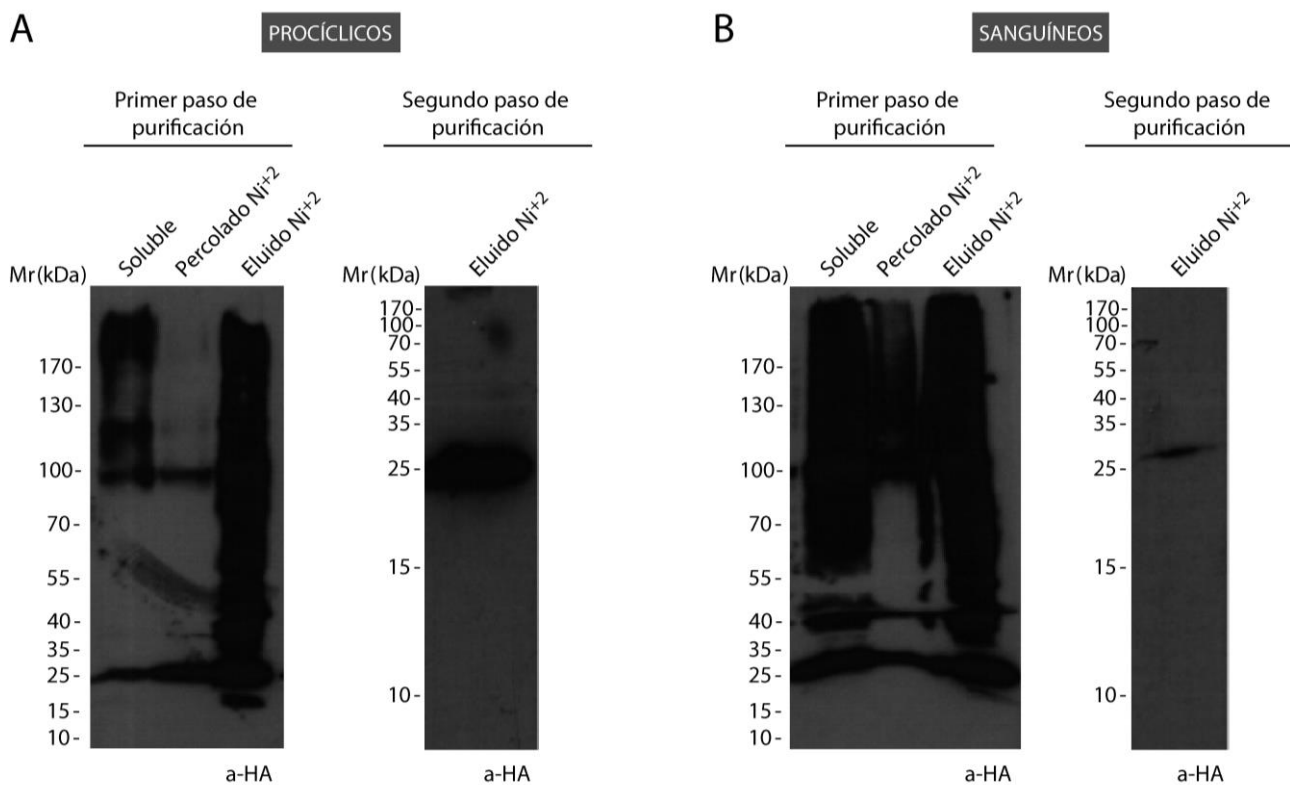


Figura 38. Purificación de proteínas SUMOiladas por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y digestión con Lys-C a partir de parásitos HisHA-TbSUMOK8R^{T106R}. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de la purificación en dos pasos realizada a partir de parásitos HisHA-TbSUMOK8R^{T106R} (A) PC y (B) BS. PC: Soluble: fracción soluble tras lisis en presencia de urea (5x10⁷ parásitos); Percolado Ni²⁺: fracción no retenida por la resina de Ni²⁺ (5x10⁷ parásitos); Eluido Ni²⁺ - primer y segundo paso de purificación: muestra retenida y luego eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni²⁺ (2x10⁸ parásitos). BS: Soluble: fracción soluble tras lisis en presencia de urea (5x10⁷ parásitos); Percolado Ni²⁺: fracción no retenida por la resina de Ni²⁺ (5x10⁷ parásitos); Eluido Ni²⁺ - primer y segundo paso de purificación: muestra retenida y luego eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni²⁺ (2x10⁸ parásitos).

Como la identificación de sustratos de SUMOilación, teniendo en cuenta la estrategia implementada, se basa en la detección de péptidos firma característicos (motivo diglicina unido a la lisina modificada), no es necesario comparar estos resultados con aquellos obtenidos a partir de parásitos salvajes.

2.4 Análisis proteómico: HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}

Los péptidos presentes en el eluido resultante del segundo paso de purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ fueron precipitados con acetona 80% y procesados de manera similar a lo descrito anteriormente (**Figura 24**) para su análisis proteómico realizado por ITSI-Biosciences (Pennsylvania, Estados Unidos) (Ver Anexo-**Tabla A1**). Los espectros MS/MS generados fueron comparados contra una base de datos obtenida a partir de la digestión trípica teórica de las proteínas codificadas en el genoma de *Trypanosoma brucei* Lister 427, *Trypanosoma brucei* Lister 927, *Bos taurus*, keratina humana y tripsina bovina, con el agregado teórico de 114,1 Da para simular la presencia del motivo diglicina esperado.

A partir de la muestra proveniente de la línea celular HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} de PC se identificaron **26 proteínas** de las cuales sólo **6** presentaban el **péptido firma** característico. En el caso de BS, este número fue mayor, detectándose **19 péptidos firma** sobre un total de **66 proteínas** identificadas en la muestra. Considerando los primeros resultados obtenidos a partir del estudio de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* solamente consideramos como posibles sustratos de SUMOilación aquellas proteínas con péptido firma identificado.

En este sentido, las proteínas identificadas en el estadio PC fueron 2 glicoproteínas variables de superficie (VSG) y 4 proteínas hipotéticas (no caracterizadas, sin anotación funcional y/o dominios/motivos distintivos que permitan inferir su función) (**Tabla 2**).

Identificación	Descripción	Péptido modificado
Tb927.9.4750	Glicoproteína variable de superficie 1547, parcial	SGTKITTGDGGAADTFKAAADNK
Tb927.5.4060	Proteína hipotética	QLPYSPITTVLDDLKSTIVK
Tb927.3.2680	Proteína hipotética; Chaperona de tubulina	VPSSMSVGLKALVR
Tb927.11.13160	Proteína hipotética	WTNSLIFTNSAVESGSFFSK
Tb927.8.1480	Proteína hipotética; Repeticiones WD40	SLTKPAASPSTPGSDRK
Tb927.11.17680	Glicoproteína variable de superficie 727	SCKWDGETCKDSTLPSIR

Tabla 2. Proteínas con “péptido firma” identificado por espectrometría de masas a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} de PC. Se detalla el código de identificación en GeneDB. La lisina potencialmente SUMOilada se resalta en negrita en la secuencia del péptido modificado.

En el estadio BS, de las 19 proteínas con péptido firma identificado (**Tabla 3**), 7 corresponden a VSG, 5 son hipotéticas y sólo 7 se encuentran anotadas funcionalmente, ya sea por homología de secuencias con otros organismos o por estudios funcionales propiamente dichos. Entre estas proteínas se destacan: una Ras GTPasa, una hidrolasa de ubiquitina, el precursor de proteína de membrana de vesículas COP, erv25, y la ciclina de tipo CYC-2, de localización nuclear.

Identificación	Descripción	Péptido modificado
Tb927.10.3220	Glicoproteína variable de superficie 3565, parcial	TSIATTSKPDCAAITQPDQCRSK
Tb927.11.15120	Proteína hipotética	LKAKSRGDMSDSSGGR
Tb927.1.1200	Proteína hipotética	YGSKSKTPDLKTSFTK
Tb927.8.8140	Proteína rab pequeña de unión a GTP; Ras GTPasa	ADVALMTKNVLEPLPATTPTVGTDFR
Tb927.6.4490	Proteína hipotética	NWSYGYSTNSVEKCHER
Tb927.11.16100	Ubiquitin- hidrolasa carboxilo-terminal	GGLSYGHYTAARFSKATK
Tb927.10.6640	Precursor de proteína de membrana de vesículas COP, erv25	TTVISKTEVPMLKR
Tb11.v5.0872	Glicoproteína variable de superficie	NVAKAKLQSILSEADKAATQYPK
AGH58914.1	Glicoproteína variable de superficie 2183, parcial	TEHLTETGLTYDDANKCVKPKQK
Tb927.11.820	Proteína hipotética; dominio glicosiltransferasa	SARLLTVCQK
Tb10.v4.0107	Glicoproteína variable de superficie 2058, parcial	HGTISGVKYAFLAAIAASSREAVQTK
AGH59753.1	Glicoproteína variable de superficie 3731, parcial	QSSDTIPK
Tb927.3.930	Dineína, cadena pesada	LMFKAILTSTTRSLNLLK
Tb927.9.660	Proteína ESAG (expression site-associated gene)	TGESTKYLSVSSAMGDQR
Tb927.11.16230	Proteína hipotética; factor de procesamiento del pre-ARNm en 3'	FATGKVAAPVQEVSTRIIDEK
Tb11.1490	Glicoproteína variable de superficie 400	TSSSKCDGTAGSKQCINYPK
Tb927.10.11440	Ciclina CYC2-like	CNAMTAVGEKTNKTSPAGSAVQYR
Tb927.2.5220	Proteína hipotética	KLGNVCGGLSSASDK
AGH58756.1	Glicoproteína variable de superficie 2016, parcial	ATDSDSGASTK

Tabla 3. Proteínas con “péptido firma” identificado por espectrometría de masas a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} de BS. Se detalla el código de identificación en GeneDB o excepcionalmente en GenBank. La lisina potencialmente SUMOilada se resalta en negrita en la secuencia del péptido modificado.

En ambos estadios, las lisinas identificadas como potencialmente SUMOiladas en estas proteínas (conjugadas a un motivo diglicina) no forman parte del sitio de SUMOilación característico de otros organismos: Ψ KXE/D (Ver Introducción).

2.5 Conclusiones parciales

Las líneas celulares HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} generadas, expresando de manera exclusiva una versión de *TbSUMO* deficiente en lisinas, permiten evaluar la importancia de la **formación de cadenas** en el parásito, siendo este proceso **no esencial** de ocurrir *in vivo*.

En cuanto a la identificación de sustratos de SUMOilación, analizando de manera global los resultados obtenidos, podemos concluir que la nueva estrategia implementada permitiría **reducir de manera general la co-purificación inespecífica de proteínas contaminantes** por cromatografía de afinidad a Ni⁺². De manera adicional, la introducción de la **mutación T106R** constituye una herramienta fundamental para la identificación de **sitios de SUMOilación**, agregando confianza a la identificación de potenciales sustratos.

Considerando entonces estos resultados, resulta fundamental la implementación de nuevas estrategias que permitan **optimizar la purificación e identificación de péptidos firma**, en base a principios de enriquecimiento diferenciales de mayor especificidad.

CAPÍTULO III

Identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en *Trypanosoma brucei*: estrategia para optimizar la identificación de sitios de SUMOilación

3.1 Generación de líneas celulares que expresan una versión modificada de *TbSUMO*

Teniendo en cuenta los resultados previos decidimos implementar a continuación una nueva estrategia para optimizar el enriquecimiento de péptidos firma utilizando principios de alta afinidad. Esta nueva aproximación, descrita recientemente por Tammsalu *et al.* (Tammsalu, Matic *et al.* 2014) en células de mamífero, involucra la expresión de una versión procesada de *TbSUMO* etiquetada en su extremo N-terminal con His-HA y modificada en su extremo C-terminal por reemplazo de la treonina en posición 106 (previa al motivo diglicina) por un residuo de lisina (Figura 39).

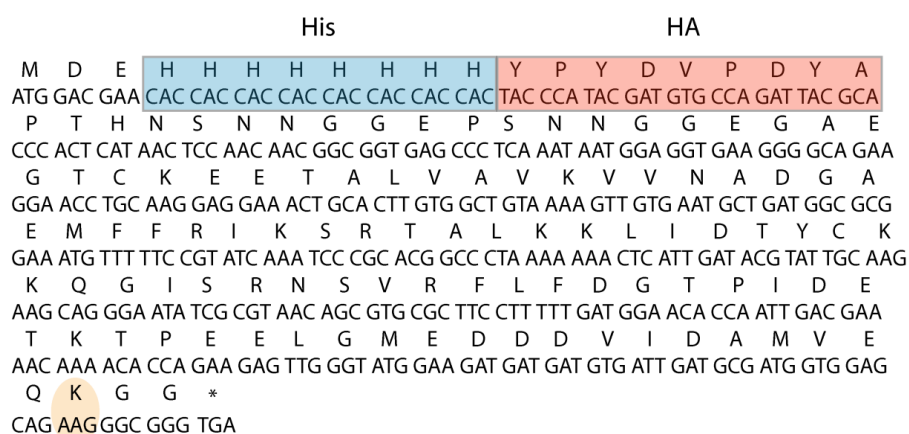


Figura 39. Esquema de la variante HisHA-*TbSUMO*^{T106K}. Secuencia aminoacídica y nucleotídica de *TbSUMO* procesada con el agregado de His y HA tras los primeros tres aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína. Se resalta la treonina 106 (previa al motivo diglicina) reemplazadas por lisina (naranja).

Esta versión de *TbSUMO* puede ser empleada para purificar conjugados por cromatografía de afinidad a Ni²⁺, de manera equivalente a lo descrito en las otras estrategias. De manera particular, al ser estos conjugados digeridos con la endoproteasa Lys-C (que cliva de manera específica en el extremo C-terminal de residuos de lisina) se generan péptidos firma específicos, en forma de T, con el agregado de un motivo diglicina propio de *TbSUMO* en la lisina modificada. Estos péptidos pueden ser finalmente purificados de manera específica empleando anticuerpos comerciales anti K-ε-GG que reconocen con alta afinidad el motivo diglicina unido al ε-amino de las lisinas modificadas. Las muestras enriquecidas en péptidos

firma podrán luego ser procesadas para la identificación de sustratos y sitios de SUMOilación por MS.

Cabe destacar, que el cambio de una arginina (presente en la variante HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}) por una **lisina en posición 106** en esta nueva variante, tiene efectos directos en la interpretación de resultados, reduciendo posibles falsos positivos.

La proteína ubiquitina y otras proteínas Ubl, como NEDD8, presentan naturalmente en su secuencia aminoacídica una arginina previa al motivo diglicina conjugable. La mutación T106R descrita originalmente simula esta estructura, asemejando la nueva molécula a aquellas ya caracterizadas, pero introduciendo ambigüedad en la identificación final de péptidos firma (Figura 40).

Ubiquitina	GRTLADYNIQKESTLHLVLR L RGGW-----
SUMO	TKTPEELGMEDDDVIDAMVEQ T GGCLWCMA
SUMOT106R	TKTPEELGMEDDDVIDAMVEQ R GGCLWCMA
SUMOT106K	TKTPEELGMEDDDVIDAMVEQ K GGCLWCMA

Figura 40. Comparación del extremo C-terminal de las secuencias de *TbSUMO* y *TbUbiquitina*. Alineamiento utilizando el programa Clustal Omega de los extremos C-terminales de las secuencias aminoacídicas de *TbUbiquitina* (Tb927.11.9920) y *TbSUMO* (Tb927.5.3210) en su variante silvestre (SUMO) y con el reemplazo de la treonina en posición 106 por arginina (SUMOT106R) o lisina (SUMOT106K).

Los péptidos firma generados a partir de las variantes con la mutación T106R, pese a que provienen de una purificación diferencial de proteínas SUMOiladas por cromatografía de afinidad a Ni⁺², no pueden considerarse productos de SUMOilación de manera concluyente ya que no pueden diferenciarse de aquellos conjugados a otros modificadores, como los mencionados, que hayan co-purificado de manera inespecífica o modifiquen simultáneamente el mismo sustrato. Es por esto que las proteínas identificadas a partir de estos péptidos deben validarse diferencialmente con ubiquitina y otros modificadores Ubl. Dado que no se observan lisinas previas al motivo diglicina en ubiquitina u otras proteínas con homología a esta, la digestión con Lys-C en la variante HisHA-*TbSUMO*^{T106K} es la que confiere la especificidad de corte necesaria para garantizar que los péptidos firma identificados sean producto exclusivo de la modificación por esta variante de *TbSUMO*. La mutación T106K, junto a la digestión con Lys-C, permiten entonces la **identificación de sitios de SUMOilación sin ambigüedades**, de manera inequívoca (Figura 41).

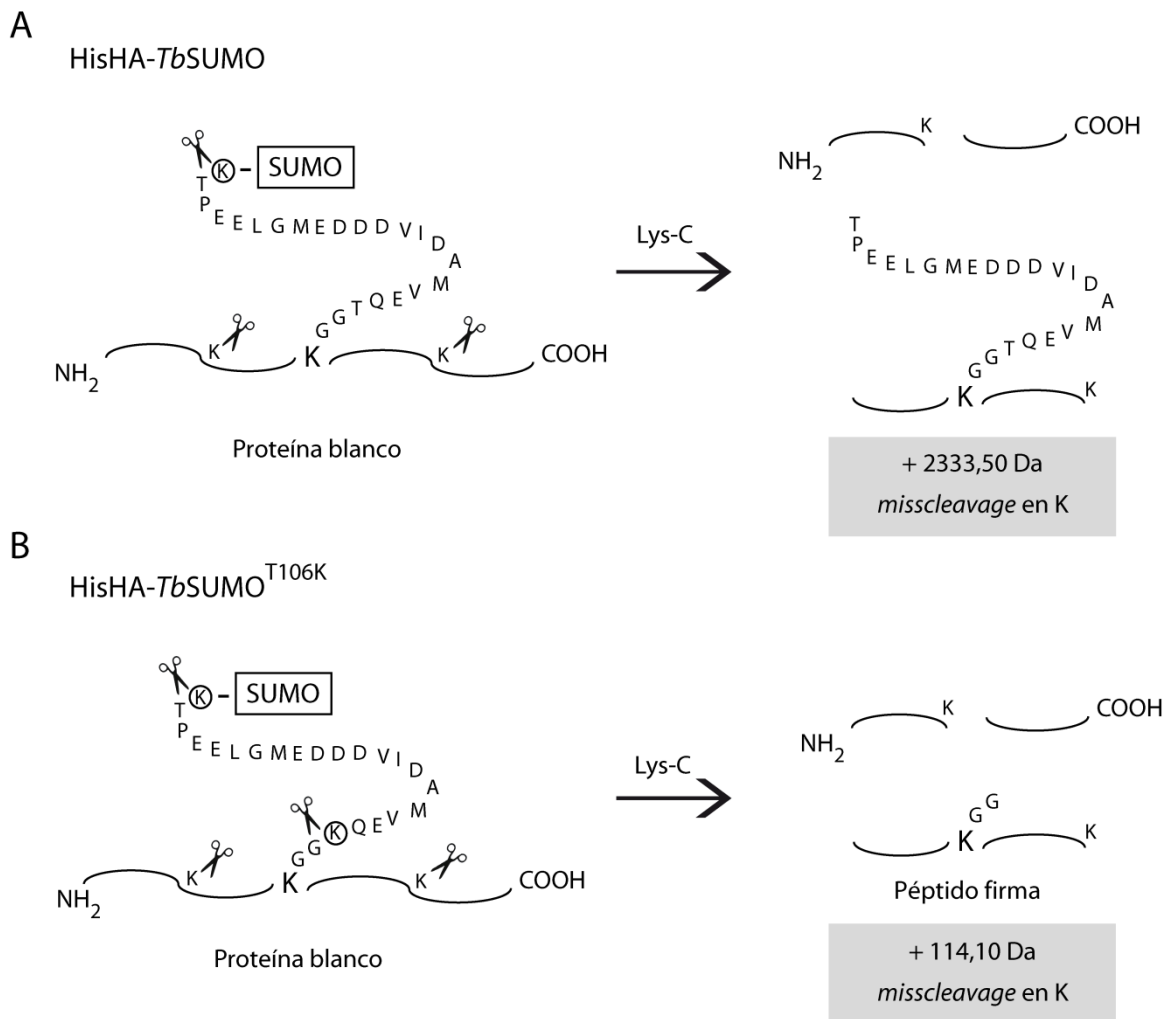


Figura 41. Generación de “péptidos firma”. (A) Proteínas conjugadas a *TbSUMO* tras la digestión con Lys-C. El fragmento de *TbSUMO* unido covalentemente al péptido resultante tras la digestión es difícilmente identificable por espectrometría de masas. (B) La mutación T106K introduce un nuevo sitio de clivaje por Lys-C, generando un “péptido firma” más pequeño. Esta modificación puede ser detectada más fácilmente, de manera inequívoca, por espectrometría de masas permitiendo así la identificación de las lisinas SUMOiladas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la implementación de esta estrategia permite **identificar de manera confiable sustratos de SUMOilación, excluyendo** la necesidad de realizar laboriosas **validaciones posteriores**, dada la identificación confirmatoria de un fragmento exclusivo de *TbSUMO* en cada blanco detectado (Tammsalu, Matic et al. 2014). El desarrollo general de la estrategia no involucró, sin embargo, el reemplazo de alelos sino la sobre-expresión ectópica de esta variante HisHA-*TbSUMO*^{T106K}. Esta decisión se fundamentó en los siguientes hechos: (i) reportes exitosos, incluyendo el trabajo original, empleando esta estrategia de sobreexpresión (Hendriks, D'Souza et al. 2014; Impens, Radoshevich et al. 2014; Tammsalu, Matic et al. 2014); (ii) antecedentes del laboratorio en trabajos con *T. cruzi* sobre-expresando distintas variantes de *TcSUMO* de manera exitosa (Bayona, Nakayasu et al. 2011); (iii) la experiencia previa en la generación de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106R} (no desarrollada en este trabajo de Tesis), en la que la recombinación necesaria para el reemplazo exitoso de los

alelos con la incorporación de la mutación T106R fue poco frecuente⁵. De esta manera, decidimos inicialmente evaluar esta estrategia en nuestro modelo de estudio sobre-expresando HisHA-*TbSUMO*^{T106K} de manera rápida y sencilla. Para esto, la secuencia codificante de esta variante ya procesada (Figura 39) fue clonada en el vector inducible por tetraciclina pLew100v5, conteniendo un gen que confiere resistencia a fleomicina. Este vector, que se integra en el locus ribosomal, fue utilizado para transfectar parásitos *T. brucei brucei* PC 29:13 y BS 90:13 (T7RNAPol NEO TetR HYG), ambos conteniendo la maquinaria necesaria para la regulación de la expresión del transgen de interés. La población de parásitos PC y los clones de parásitos BS obtenidos en cada caso fueron seleccionados con fleomicina.

3.2 Evaluación de las líneas celulares y análisis de la proteína de fusión generada

3.2.1 Evaluación de las líneas celulares: análisis del patrón de SUMOilación por Western blot y de la localización subcelular de los conjugados por inmunofluorescencia indirecta

Primeramente analizamos la expresión y conjugación de esta variante por Western blot empleando anticuerpos anti HA (Figura 42).

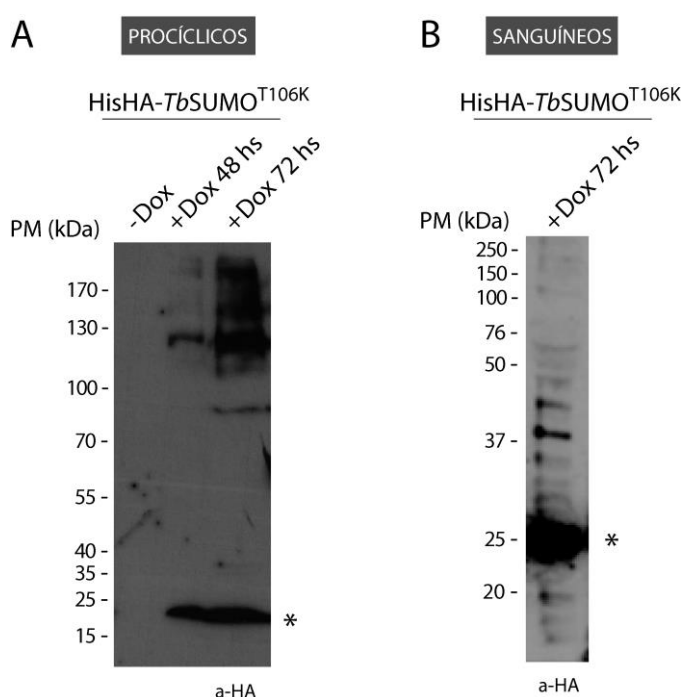


Figura 42. Expresión y conjugación de HisHA-*TbSUMO*^{T106K}. Análisis por Western blot de extractos de parásitos HisHA-*TbSUMO*^{T106K} (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti HA en ausencia (- Dox) o presencia (+ Dox) del inductor doxiciclina a distintos tiempos. HisHA-*TbSUMO*^{T106K} PC: $\sim 5 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición corto; HisHA-*TbSUMO*^{T106K} BS: $\sim 1,5 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición largo. Las bandas cercanas al marcador de peso molecular de 25 kDa (*) se corresponden con la forma libre de HisHA-*TbSUMO*^{T106K}. La membrana observada en (B) fue obtenida por Andreu Saura (laboratorio del Dr. Miguel Navarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Granada, España), separando los extractos proteicos empleando geles de acrilamida comerciales de gradiente continuo 4-20% (BioRad).

⁵ La recombinación evaluada por secuenciación en estas líneas celulares HisHA-*TbSUMO*^{T106R} ocurrió a través del 5'UTR y de la secuencia codificante del modificador (equivalente a la silvestre) previa a la mutación T106R a introducir. Estos clones resultaban entonces equivalentes a los originalmente descritos HisHA-*TbSUMO*, sin la incorporación de la mutación T106R. Este hecho permite destacar la importancia de secuencias cortas de homología como brazos de recombinación en el diseño de estrategias de reemplazo.

Como puede visualizarse en la **Figura 42 A**, la conjugación de HisHA-*TbSUMO*^{T106K} a sus sustratos aumenta tras 72 hs de inducción con doxiciclina. Esto puede explicarse considerando que en estas líneas celulares persiste *TbSUMO* silvestre, que compite en su conjugación con la variante modificada. Una vez realizada la inducción de HisHA-*TbSUMO* es necesario considerar el recambio natural en la SUMOilación de cada sustrato en particular para que esta nueva versión de *TbSUMO* pueda conjugarse a los distintos blancos, en competencia con la versión silvestre. Un comportamiento equivalente fue observado en el caso de HisHA-*TbSUMO*^{T106K} en BS, por lo que se utilizaron en todos los casos parásitos tras 72 hs de inducción con doxiciclina (**Figura 42 B**). El **patrón de bandas de alto peso molecular** observado es similar al descrito anteriormente en parásitos silvestres (Ver Anexo – **Figura A2**). La cantidad de HisHA-*TbSUMO*^{T106K} libre observada (con su característica movilidad electroforética anómala) es mayor en estas líneas celulares que sobre-expresan de manera inducible la proteína. Este hecho, sumado a la menor recuperación de conjugados por parásito, puede atribuirse en parte a la competencia existente en este caso con la versión silvestre de la proteína (dos alelos endógenos intactos), como fue mencionado anteriormente.

De manera complementaria, la expresión y localización subcelular de esta variante de *TbSUMO* fue evaluada por IFI utilizando anticuerpos anti HA, tras 72 hs de inducción con doxiciclina. De manera equivalente a lo observado en las líneas celulares descritas anteriormente y en parásitos silvestres, en todos los casos se visualiza nuevamente un **patrón nuclear** con múltiples **focos definidos** en el caso de PC y uno sólo en el caso de BS (**Figura 43**).

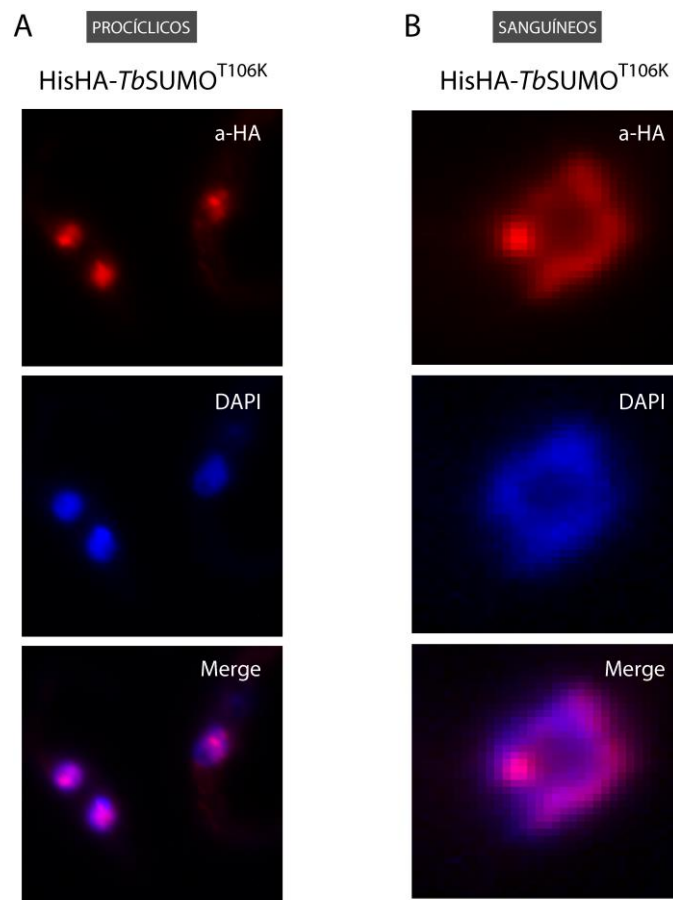


Figura 43. Expresión y sublocalización celular de HisHA-*TbSUMO*^{T106K}. Inmunofluorescencias de parásitos HisHA-*TbSUMO*^{T106K} (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti HA (rojo). En todos los casos el kinetoplasto y el ADN nuclear se visualizan por tinción con DAPI (azul). Se observa también la superposición anti HA-DAPI (Merge).

3.2.2 Evaluación de las líneas celulares: curvas de crecimiento

Los parásitos seleccionados fueron mantenidos en cultivo de manera axénica y su **crecimiento** fue evaluado en presencia o ausencia del inductor de la expresión de HisHA-*TbSUMO*^{T106K}, doxiciclina (antibiótico del grupo de las tetraciclinas) (Figura 44).

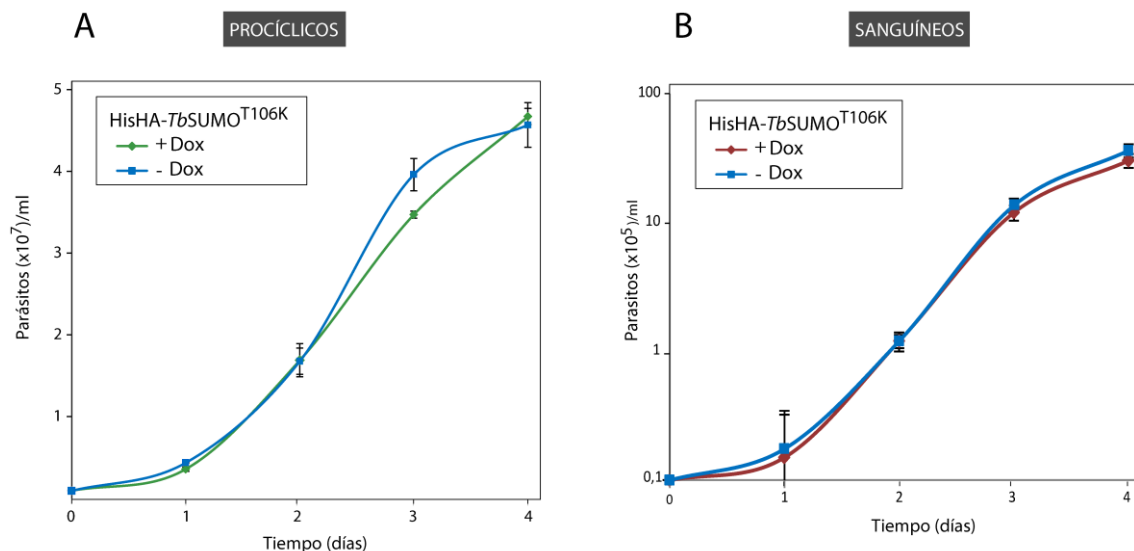


Figura 44. Crecimiento en cultivo de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*^{T106K}. Curvas de crecimiento de parásitos HisHA-*TbSUMO*^{T106K} (A) PC y (B) BS, en presencia (+ Dox) o ausencia (- Dox) del inductor doxiciclina.

La ausencia de diferencias fenotípicas marcadas y de crecimiento en las líneas con y sin inductor estaría indicando que la sobre-expresión de esta variante de *TbSUMO* no afectaría la viabilidad de los parásitos.

3.3 Purificación de proteínas SUMOiladas

Los parásitos PC y BS HisHA-*TbSUMO*^{T106K} a partir de los cuales se realizó la purificación de conjugados, fueron cosechados en todos los casos teniendo en cuenta las condiciones metabólicas de cultivo evaluadas anteriormente (Figura 19) para optimizar el rendimiento en la obtención de proteínas SUMOiladas. De la misma manera, las muestras fueron procesadas en todos los casos considerando las condiciones que favorecen la estabilidad de las proteínas conjugadas, por inhibición y/o desnaturalización de las proteasas deconjugadoras (Figura 18).

Aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ parásitos PC y $1,5 \times 10^{10}$ parásitos BS de la línea HisHA-*TbSUMO*^{T106K}, fueron cosechados por centrifugación y resuspendidos en un buffer conteniendo urea. Este agente permite desnaturalizar las proteasas deconjugadoras de *TbSUMO* e impide la co-purificación de interactores no covalentes del modificador. Las muestras fueron luego sonicadas hasta pérdida de viscosidad y clarificadas por centrifugación. Las proteínas unidas covalentemente a HisHA-*TbSUMO*^{T106K} presentes en el sobrenadante fueron purificadas por

cromatografía de afinidad a Ni^{+2} en condiciones desnaturalizantes como fue descrito previamente. La presencia de conjugados en los eluidos de la purificación fue confirmada por Western blot utilizando anticuerpos anti HA (Figura 45).

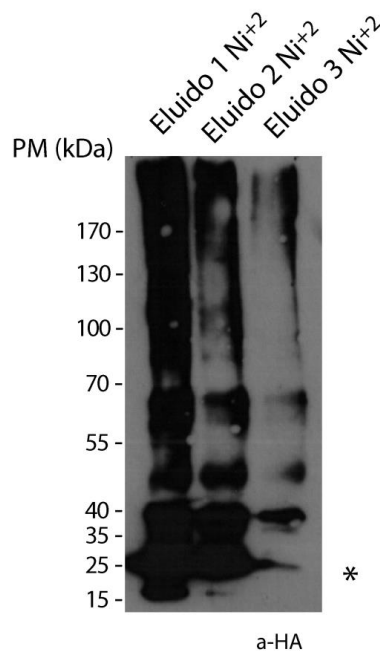


Figura 45. Purificación de proteínas SUMOiladas por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO*^{T106K} PC. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de la purificación por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} realizada a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO*^{T106K} PC. Eluido 1/2/3 Ni^{+2} : muestra retenida y luego eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni^{+2} (5×10^8 parásitos). El asterisco (*) señala las bandas correspondientes a HisHA-*TbSUMO*^{T106K} libre.

Las muestras provenientes de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} de BS fueron procesadas de manera equivalente, visualizándose muy pocas bandas compatibles con proteínas conjugadas a esta versión de *TbSUMO* en los eluidos de la purificación analizados por Western blot con anticuerpos anti HA.

A pesar de esto, las proteínas presentes en los eluidos provenientes de las purificaciones de conjugados a partir de los dos estadios del parásito fueron digeridas con la proteasa Lys-C. Los péptidos firma generados fueron inmunoprecipitados empleando anticuerpos comerciales anti ϵ -K-GG conjugados a proteína A.

La estrategia de purificación de conjugados empleada se resume de manera esquemática en la Figura 46.

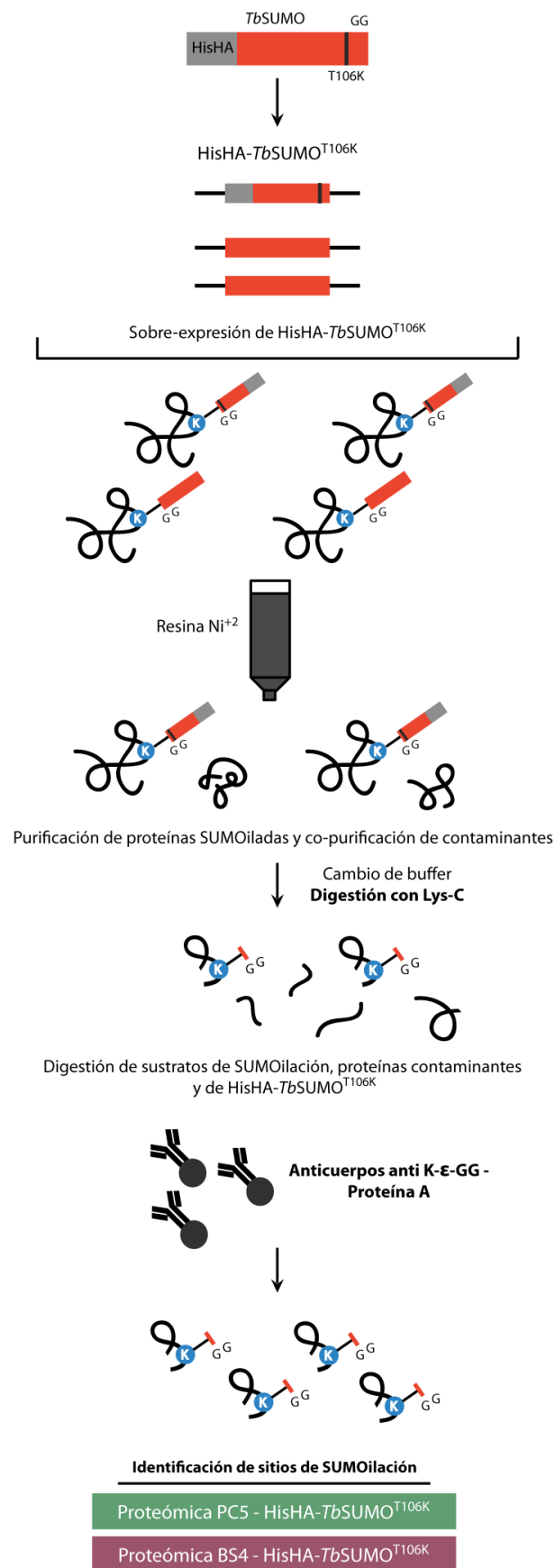


Figura 46. Purificación de proteínas SUMOiladas y análisis proteómico a partir de parásitos HisHA-TbSUMO^{T106K}. Representación esquemática de la estrategia de purificación implementada a partir de las líneas celulares HisHA-TbSUMO^{T106K} de PC y BS, con las proteómicas generadas en cada caso.

3.4 Análisis proteómico: HisHA-*Tb*SUMO^{T106K}

Las muestras conteniendo los péptidos firma de interés fueron procesadas para su análisis proteómico (de manera similar a lo descrito en la **Figura 24**), realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Ron Hay (Centre for Gene Regulation and Expression, Universidad de Dundee, Reino Unido) (Ver Anexo – **Tabla A1**).

Para el caso de PC fueron procesadas tres muestras independientes mientras que para el caso de BS dos purificaciones independientes fueron analizadas.

Para las muestras pertenecientes a la línea de PC la implementación de esta estrategia permitió incrementar considerablemente la cantidad de lisinasceptoras identificadas, reportándose un total de **52 sitios de SUMOilación en 44 proteínas (Tabla 4)**.

Identificación	Descripción	Lisina SUMOilada	Péptido SUMOilado
Tb927.7.2830	Histona H2A	K(5)	MATPKQAVKKASKGGSSRSV
		K(9)	MATPKQAVKKASKGGSSRSVKAGL
		K(10)	MATPKQAVKKASKGGSSRSVKAGLI
		K(129)	LNKALAKKQKSGKHAKATPSV
Tb927.10.10460	Histona H2B	K(5)	MATPKSTPAKTRKEAKKTRR
Tb927.1.2430	Histona H3	K(24)	RTKKTITSKKSCKASKGSDAASGVKTAQRRW
Tb927.10.15350	Histona H3V (h3vaR)	K(32)	VASRPIQAVARAPVKKVENTPPQKRHHRWRP
Tb927.5.4170	Histona H4	K(11)	MAKGKKSGEAKGSQKRQKKVLRNVR
		K(6)	MAKGKKSGEAKGSQKRQKKVLRNVR
Tb927.4.1330	ADN topoisomerasa IB, subunidad mayor	K(13)	MUKAQKPKSGEGKGGKVAVKDEEVNGKR
		K(20)	QKPKSGEGKGGKVAVKDEEVNGKRVVVKED
		K(47)	KKEDMTEEKIKKVIKEEENELEMVAAGMGP
		K(75)	MGPAKGAVKREGDENKAAMLANEEGGNDGE
Tb927.9.5190	Antígeno de proliferación nuclear (PCNA)	K(201)	HAPTVDPKSKGESDVKTEDEEADACSVRTHS
Tb927.2.4390	Endo/exonucleasa Mre11 (MRE11)	K(685)	SHPNVSTVKGGGKAVKSETSAPKPARGRKPK
Tb927.4.1270	RuvB-like ADN helicasa	K(5)	MSGIKIEEVISTTKKERVAA
Tb927.10.740	Proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas 4 (SMC4)	K(1302)	ERKRKRTGSTGDVQIKVEDEVACNNEAADIL
Tb927.8.3680	Proteína del cinetocoro del kinetoplasto 4 (KKT4)	K(356)	ISETDEYVKKGSPVVKELNSPTAEAAQTCL
Tb927.1.1170	Subunidad RBP12 de la ARN polimerasa-ADN dependiente	K(7)	MLSYTVKEEVKDEKLPGANNFA
Tb927.4.1630	Proteína de procesamiento del ARN ribosomal 6 (RRP6)	K(552)	IGSADSLKDGANGDVKPKPLPNVGVALRYMG

		K(691)	GEGMAGPCLQEGLEVKDEVEEIDVPTQKPLE
Tb927.5.1200	Componente del exosoma CSL4 (CSL4)	K(6)	MAVIVKTGKCVSPGDVLYATD
Tb927.11.16600	Proteína asociada a exosoma 2 (EAP2)	K(292)	KINGSKNSVTDPHPLKEG
Tb927.11.370	Proteína represora de la activación 1 (RAP1)	K(292)	EPKSAKVDTDSVSLVKNEVDESDDSIKDEFS
Tb927.9.11070	<i>Tb</i> SIZ1 (<i>Tb</i> SUMO E3 ligasa)	K(199)	FFASRKDAGGGATQVKDAHSATPPPPPTV
Tb927.3.3590	Ribonucleoproteína U3 nucleolar pequeña MPP10	K(355)	WDDPSAVFSGKDAALKGEGEGWYDGEDDILA
Tb927.10.14330	Proteína hipotética/Proteína 14 asociada a ARN, nucleolar pequeña U3	K(703)	TFUKEDKEDGGKTTVKVMENIQLKRRRGIDA
Tb927.5.2880	Chaperona de ADNj	K(4)	MGSKEDQVEEIRLLRFSS
Tb927.11.13090	Factor de elongación 1 gamma	K(352)	TFGPVKAKKAEQQAPKAEKAPKPAPKDDDDDD
Tb927.9.7590	Proteína ribosomal 60S L11	K(5)	MAEAKVSAEKKAANPMREIV
Tb927.10.13720	Proteína de unión a ARN 29 (RBP29)	K(313)	GGEDTEPEKSATLPMKTESDSVSCPMEVNCN
Tb927.11.6350	AAA ATPasa	K(1125)	EEKDRRKTENMEVEVKTMVEEEMVEVDGAPV
Tb10.v4.0062	Glicoproteína variable de superficie	K(365)	CKQAKPTCEWKGSEAKEGNHFKLNTAHVEQA
Tb927.9.340	Glicoproteína variable de superficie	K(175)	KTAEQEARSGAKEAVKELEEAIGPSKDRAD
Tb927.4.2740	Proteína hipotética/P25-alpha	K(97)	VAEILTKASPASNSTKAEAVKFHDDKNLYTG
Tb927.3.2350	Proteína hipotética	K(35)	SRINQALELATKVTVKEEPDTENGGGKAAII
Tb927.11.11840	Proteína hipotética	K(69)	YCSRAPTEEKWAQVKEEDGRGTGSSSRRI
Tb927.8.6130	Proteína hipotética	K(236)	VCVKQEPSLTTAGVVKSEYGAHAGVNTDDED
Tb927.10.11200	Proteína hipotética	K(19)	IFSNVRTHEEVPEVKDKVEPITYVPAPESA
Tb927.11.2100	Proteína hipotética	K(146)	TPPSLLTPFAEGEVKASGEFEDFAVSRSRW
Tb927.9.10680	Proteína hipotética	K(171)	AEPKHEAEFSVEGDVVPVAETGNDGIAFLK
Tb927.3.5370	Proteína hipotética	K(132)	RALYTSNAETSTPDQKAKGGKGLKTTPKKS
Tb927.7.2640	Proteína hipotética	K(40)	SRLVSLREGASTGVAKDEAESDALGGLAGGD
Tb927.3.4140	Proteína hipotética	K(455)	ASIRQQMKNKNAEIKVEEIEDVAVDDGAAA
Tb927.11.4880	Proteína hipotética	K(178)	DRADFGKVPKYLKEVKADIEERHALVERLKA
Tb927.11.5200	Proteína hipotética	K(163)	EDINEKDATAVEFGNKKRRCVKSNAKLPK
Tb927.6.1070	Proteína hipotética	K(107)	DDWEADTTYEGAEVKAEEAEKLLTAQRE
Tb927.8.2830	Proteína hipotética	K(192)	YNDGRNGMIHLKDVKKLCESVDLDEVEFRAR
Tb927.11.5230	Proteína hipotética	K(24)	AAIYARAEAAQNAPVKLQVPAPAFELYKAARE
Tb927.9.1410	Proteína hipotética	K(228)	APEPLQCETEAVGNIKEELCKLQDSTAEVRL
Tb927.9.13320	Proteína hipotética	K(498)	KKTDEEGEAEAEVAVKPEPVSLDG
Tb927.10.14520	Proteína hipotética	K(371)	VPAKDPGTAPSAVAVKSEKEEPSAAKTPRPT

Tabla 4. Proteínas con “péptido firma” identificado por espectrometría de masas a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} de PC. Se detalla el código de identificación en GeneDB. La lisina SUMOilada se resalta en negrita en la secuencia del péptido modificado.

La mayor parte de los péptidos firma identificados corresponden a proteínas diferentes (Flotho and Melchior 2013), con excepción de las proteínas H4 y RRP6, para las que se identificaron dos sitios de SUMOilación, y Topo IB y H2A con cuatro lisinas modificadas detectadas en cada caso.

De los 52 sitios de SUMOilación identificados 23 se encuentran dentro de la **secuencia consenso** Ψ KXE/D, donde Ψ es un aminoácido hidrofóbico, K es la lisina modificada por SUMO, X es un aminoácido cualquiera y E/D pueden ser, alternativamente, el ácido glutámico o el aspártico. De los sitios restantes 5 contienen E o D en posición +2 y 6 se encuentran formando parte de un motivo invertido (E/DXK Ψ) (Figura 47).

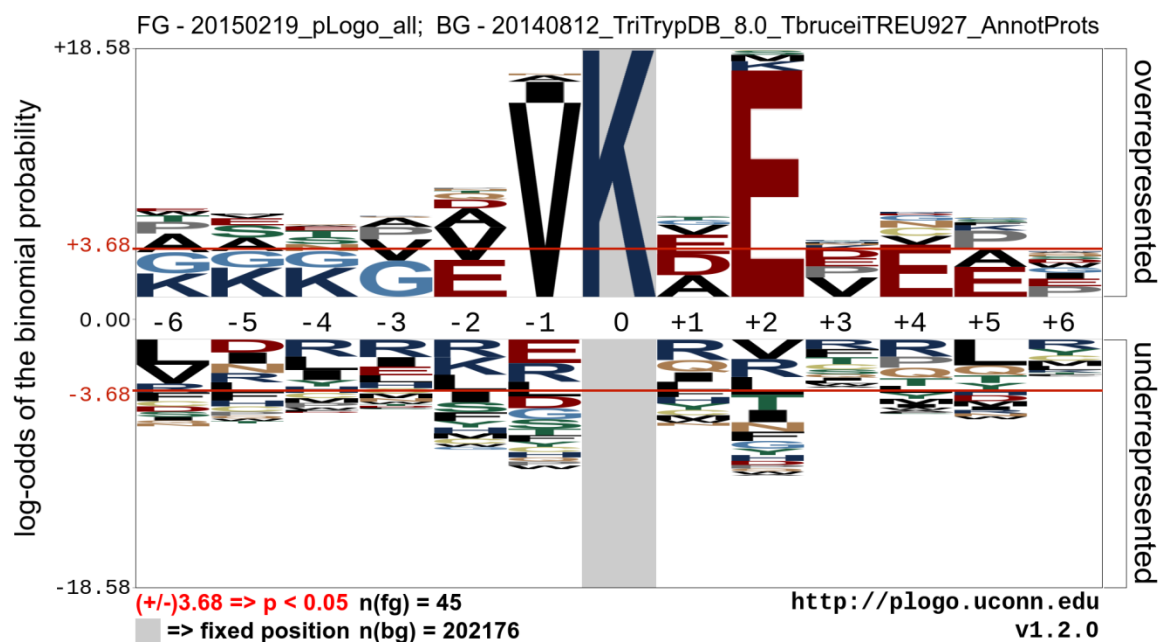


Figura 47. Análisis de la secuencia de los péptidos firma obtenidos a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} de PC. Gráfico Logo reflejando los aminoácidos conservados en torno a la lisina SUMOilada identificada por espectrometría de masas en los 52 péptidos firma. En el eje y se grafica el logaritmo de la probabilidad binomial (P). El umbral establecido (3,68; P<0,05) se encuentra definido por las líneas rojas horizontales.

De las **44 proteínas identificadas** a partir de las muestras de PC, 18 son hipotéticas mientras que las 26 restantes poseen anotación funcional en base a evidencia experimental o predicción por homología de secuencias. Estas proteínas presentan **mayoritariamente localización nuclear**, en concordancia con lo observado por IFI en las distintas líneas celulares analizadas. De la misma manera, muchas de las proteínas identificadas han sido **reportadas como SUMOiladas en otros organismos** o forman parte de procesos celulares modulados por este modificador.

En contraposición con los resultados obtenidos para la línea de PC, en las muestras provenientes de la línea celular de BS solamente se identificaron 7 péptidos firma en 6 proteínas (Tabla 5). De estas sólo una no posee anotación funcional (hipotética) mientras que las 5 restantes participan en procesos diversos como la síntesis proteica, el metabolismo de lípidos, etc.

Identificación	Descripción	Lisina SUMOilada	Péptido SUMOilado
Tb927.9.1560	Proteína conteniendo dominio ADNj	K(407) K(416)	KAPTTSGSAKK KAPTTSGSAKK
Tb927.11.13003	Ubiquitina-Proteína ribosomal 60S L40	K(48)	EGIPPDQQLIFAGKQLEEGRTLADYNIQK
Tb927.10.6720	Transportador de colina de membrana plasmática	K(16)	DPAAKPPAEGKPTSASGEK
Tb927.9.9400	Ceramida fosforiletanolamina sintasa	K(342)	DGVPVAIVIKNEE
Tb11.v5.0851	Ribonucleasa HII	K(350)	EDVASGQSVHQQKGMPTNIDPF
Tb927.3.5370	Proteína hipotética	K(11)	YFVITKPEVDDDDLPLAK

Tabla 5. Proteínas con “péptido firma” identificado por espectrometría de masas a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} de BS. Se detalla el código de identificación en GeneDB. La lisina SUMOilada se resalta en negrita en la secuencia del péptido modificado.

Considerando de manera comparativa los resultados obtenidos para ambos estadios, el bajo número de sitios identificados en BS puede relacionarse de manera directa con los bajos niveles de conjugados purificados.

Dado que la obtención de parásitos HisHA-*TbSUMO*^{T106K} en el estadio BS a partir de cultivo axénico presenta un bajo rendimiento, este protocolo de purificación de conjugados se está repitiendo actualmente a partir de un mayor número de parásitos obtenidos de sangre de ratas infectadas con esta línea, en colaboración con el laboratorio del Dr. Miguel Navarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada, España).

Estos resultados en conjunto se analizan en profundidad en la sección Discusión.

3.5 Conclusiones parciales

Los resultados hasta aquí obtenidos han permitido **optimizar la identificación de péptidos firma en el caso de PC**, identificándose de manera inequívoca **52 sitios de SUMOilación en 44 proteínas**. Teniendo en cuenta los principios teóricos en los que se basa esta estrategia es posible afirmar que las proteínas de este modo identificadas constituyen **genuinos sustratos de SUMOilación**, en las condiciones de cultivo ensayadas.

Para el estudio posterior del efecto de la SUMOilación en estos sustratos es necesario desarrollar aproximaciones que permitan la expresión *in vivo* de las proteínas de interés y mutantes no SUMOilables.

De manera complementaria, el desarrollo de un sistema de SUMOilación específico para *T. brucei*, constituye una herramienta fundamental para el estudio de estos y otros potenciales sustratos, facilitando su análisis y permitiendo el desarrollo de estudios empleando variantes recombinantes modificadas que permitan dilucidar de manera sencilla el potencial efecto de la modificación por *TbSUMO* en los distintos sustratos de interés.

DISCUSIÓN

Identificación global de proteínas SUMOiladas

Las dificultades asociadas a la identificación por espectrometría de masas de proteínas con modificaciones post-traduccionales, y en nuestro caso específico de proteínas SUMOiladas, han sido ampliamente reportadas en muchos organismos. En este sentido, *Trypanosoma brucei* no constituye una excepción, presentando muchas de las desventajas inherentes al estudio de la SUMOilación, como la baja proporción de proteínas modificadas por *TbSUMO* en condiciones normales de cultivo y la alta actividad de las proteasas deconjugadoras.

En la identificación global de proteínas SUMOiladas estas características fueron determinantes, conllevando la necesidad de adoptar distintas metodologías durante el desarrollo del trabajo.

La **implementación de las distintas aproximaciones** para la optimización de la purificación de conjugados e identificación de proteínas SUMOiladas por espectrometría de masas se realizó **en paralelo al desarrollo de distintas estrategias superadoras en mamíferos y levaduras**. La aplicación secuencial de las distintas aproximaciones reportadas permitió superar muchas de las dificultades presentadas, permitiendo de este modo optimizar en cada caso los resultados precedentes.

Las líneas celulares desarrolladas han sido utilizadas como punto de partida de distintas estrategias para la identificación proteómica de proteínas SUMOiladas en los dos estadios cultivables del parásito, previa purificación de sustratos de SUMOilación.

Considerando la baja abundancia de proteínas SUMOiladas en distintos organismos es frecuente realizar la purificación de conjugados a partir de células bajo **condiciones que incrementen la SUMOilación general**. Esto suele realizarse mediante tratamientos de estrés térmico (por ejemplo, incubando las células 30 min a 43°C) (Tammsalu, Matic et al. 2014). Este tipo de estrés, sin embargo, no produce el efecto deseado en *T. brucei*, dado que no se observan aumentos significativos en la SUMOilación general de proteínas incubando los parásitos a distintas temperaturas (Klein, Droll et al. 2013). Sí hemos observado un aumento general en la SUMOilación de proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, en concordancia con lo previamente reportado (Klein, Droll et al. 2013). La implementación de este tipo de estrategias para incrementar los niveles de SUMOilación permite la identificación de sustratos modificados bajo condiciones de estrés específicas y no necesariamente las proteínas de este modo identificadas se encuentren SUMOiladas en ausencia de la alteración. Teniendo en cuenta estas consideraciones es que decidimos entonces realizar todas las purificaciones de conjugados mencionadas a partir de parásitos crecidos bajo **condiciones de cultivo convencionales**, para poder identificar de esta manera aquellas proteínas cuya SUMOilación es importante para la fisiología normal del parásito. De modo complementario, como fue mencionado anteriormente, se trabajó en todos los casos en **condiciones desnaturalizantes**, para reducir la pérdida de conjugados por inactivación de las proteasas deconjugadoras y reducir la complejidad de las muestras al evitar la purificación directa de proteínas que interaccionan de manera no covalente con *TbSUMO*.

Las distintas proteómicas obtenidas han permitido identificar con distinto grado de confianza sustratos de SUMOilación en los distintos estadios del parásito.

Las **proteómicas** obtenidas a partir de las líneas celulares **HisHA-TbSUMO**, pese a que en términos generales han permitido identificar el mayor número de proteínas, deben ser analizadas prudentemente. Pese a que es posible destacar en ellas algunas pocas **proteínas asociadas a procesos nucleares** (ARN helicasas, metilasa de ADN, proteínas nucleolares, TAF1, SMC4, etc.) y/o descritas como SUMOiladas en otros organismos (histona H2A, ADN topoisomerasas), estas representan en todos los casos **menos del 10% de las proteínas totales** identificadas. En particular, la proteína NUP-1, parte del complejo de poro nuclear, fue identificada de manera consistente en cuatro de las cinco proteómicas obtenidas a partir de estas líneas, constituyendo un buen candidato a evaluar. Vale la pena destacar que la purificación de conjugados a partir de las líneas celulares HisHA-TbSUMO D, que no expresan TbSUMO silvestre, permitió la identificación de un mayor número de proteínas en términos absolutos pero las proteínas nucleares identificadas representaron el mismo porcentaje reportado para las líneas precedentes con un reemplazo simple del alelo. De manera general, la gran **mayoría** de las proteínas identificadas constituyen **falsos positivos**, producto de la co-purificación inespecífica por cromatografía de afinidad a Ni²⁺. Este hecho queda demostrado por los resultados obtenidos a partir de la validación *in vivo* de 16 potenciales sustratos seleccionados a partir de la Proteómica PC1. Estas proteínas participan en procesos básicamente citosólicos, no asociados a SUMO en otros organismos, contrariamente a lo esperado en función de la localización subcelular de la proteína observada por IFI. Estos resultados estarían indicando que la co-purificación de contaminantes a partir del principio de purificación empleado constituye la principal dificultad de la estrategia. Considerando estos resultados, las proteínas identificadas en estos casos (**Proteómicas PC1, PC2, PC3, BS1 y BS2**) deben ser evaluadas de manera individual y su SUMOilación debe ser confirmada *in vivo* y/o *in vitro*.

La implementación de estrategias para reducir la co-purificación de contaminantes e identificar con mayor confianza sustratos de SUMOilación desembocó en la generación de nuevas **proteómicas** a partir de las líneas celulares **HisHA-TbSUMOK8R^{T106R}**. La reducción en la co-purificación de contaminantes implementada en esta estrategia (**Figura 37**) se vio potenciada por la identificación de **péptidos firma** característicos, generando una lista más reducida y confiable de potenciales sustratos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de las primeras proteómicas decidimos considerar como posibles sustratos de SUMOilación aquellas proteínas con péptido firma identificado. Los sustratos que cumplen con estos requisitos poseen al menos una lisina modificada, unida al motivo diglicina remanente de TbSUMO y/o de otro modificador relacionado como ubiquitina, dadas las características propias de la variante de TbSUMO empleada (**Figura 40**). Es por esto que, pese a que las proteínas con péptido firma identificado a partir de una purificación específica de proteínas SUMOiladas pueden considerarse sustratos de SUMOilación con un mayor nivel de confianza, es necesario realizar una validación diferencial con ubiquitina y otras Ubl, específica para cada blanco, para confirmar esto. Este hecho puede explicar entonces la identificación de péptidos firma en glicoproteínas variables de superficie: proteínas de superficie abundantes en *T. brucei* cuya ubiquitinación ha sido reportada (Leung, Riley et al. 2011).

Las lisinas modificadas en los dos estadios del parásito no forman parte, en términos generales, de un sitio de SUMOilación canónico, aunque son pocos los péptidos firma identificados en cada caso. De las proteínas identificadas por esta proteómica la mayoría constituyen proteínas hipotéticas, sin anotación funcional, y, en menor medida, proteínas que participan en procesos

fundamentalmente citosólicos. Es posible destacar, sin embargo, como potencial sustrato de SUMOilación a validar, a la ciclina CYC2, involucrada en la progresión del ciclo celular a través de G1 en los dos estadios del parásito y en el mantenimiento de la morfología celular en PC (Hamarton, Engstler et al. 2004). De manera general, aunque esta estrategia ha demostrado ser satisfactoria para mapear lisinas modificadas en proteínas blanco de SUMO2 en células HeLa (Matic, Schimmel et al. 2010; Hendriks, D'Souza et al. 2014), en nuestra experiencia el **rendimiento no ha sido óptimo**, identificándose pocos péptidos firma en *T. brucei*.

Para mejorar estos resultados decidimos emplear una nueva estrategia basada en la **línea celular HisHA-TbSUMO^{T106K}**, **enriqueciendo** las muestras en **péptidos firma** de manera específica empleando anticuerpos anti K- ϵ -GG. Las lisinas de este modo identificadas constituyen auténticos sitios de SUMOilación, dado que la enzima utilizada para la generación de los péptidos firma (Lys-C) solamente actúa sobre HisHA-TbSUMO^{T106K} y no sobre ubiquitina u otras Ubl (con una arginina previa al motivo diglicina, no reconocida por la proteasa empleada). De esta manera, los péptidos firma identificados son producto exclusivo de proteínas SUMOiladas y las proteínas a partir de ellos identificadas no requieren validación posterior (Tammsalu, Matic et al. 2014). Esta estrategia mostró un **alto grado de reproducibilidad** (cercano al 50%) entre experimentos independientes en *T. brucei* PC, de forma similar a lo reportado para el método original utilizando un lisado de células HEK293 (Tammsalu, Matic et al. 2014). El número de péptidos firma identificados mediante esta estrategia se incrementó de 6 (a partir de la línea HisHA-TbSUMOK8R^{T106R}) a 52 en las muestras de PC, de manera equivalente a lo reportado originalmente (Tammsalu, Matic et al. 2014). Aproximadamente el 65% de las lisinas identificadas forman parte del **sitio de SUMOilación consenso** (Ψ KXE/D; 44,2%), invertido (E/DXK Ψ ; 9,6%) o poseen un ácido glutámico o aspártico en posición +2 (11,5%). A diferencia de las proteómicas ya descritas, en este caso, una **gran proporción** de los sustratos identificados presenta **localización nuclear** (en concordancia con lo observado por IFI) y han sido **reportados como SUMOilados en otros organismos**. Entre ellas encontramos proteínas involucradas en procesos como replicación y reparación del ADN, transcripción, biogénesis de ARNr, procesamiento y degradación del ARN, remodelación de la cromatina, etc., lo que sugiere que la señalización por TbSUMO podría estar mediada por varias proteínas dentro de grupos de proteínas. Uno de los principales hallazgos del estudio proteómico fue la identificación de proteínas implicadas en la regulación epigenética de la expresión génica, como las histonas H2A, H2B, H3, H3v, H4 y la proteína RAP1. Esto es particularmente interesante en estos organismos dada la regulación transcripcional inusual de tripanosomátidos, que carecen, por ejemplo, de promotores para la ARN pol II. Cabe destacar, sin embargo, que ninguno de los componentes de la maquinaria de SUMOilación (incluyendo TbSUMO) fue identificado como sustrato.

Las características fundamentales de los sustratos de SUMOilación más relevantes identificados en *T. brucei* PC se detallan brevemente a continuación.

Histonas: H2A, H2B, H3, H3v, H4

Las **histonas** son proteínas básicas, pequeñas, de unión al ADN, y los nucleosomas formados por ellas constituyen las unidades básicas de la cromatina. Curiosamente todas las histonas que forman parte de la médula o “core” del nucleosoma fueron identificadas como SUMOiladas por proteómica en *T. brucei*, no así la histona “linker” H1. Pese a que son generalmente proteínas evolutivamente conservadas, los extremos o colas de estas histonas en el parásito difieren significativamente de aquellas reportadas en mamíferos y levaduras (Mandava, Fernandez et al. 2007).

Justamente, las **lisinas** identificadas como **SUMOiladas** en cada una de ellas se encuentran mayoritariamente en estos **extremos o colas** (extremo N-terminal de H2B, H3 y H4; extremo C-terminal de H2A) y no forman parte de sitios consenso de SUMOilación, de manera similar a lo observado para las histonas H2A y H2B en levaduras y humanos (Nathan, Ingvarsdottir et al. 2006; Hendriks, D'Souza et al. 2014; Tammsalu, Matic et al. 2014).

Vale la pena mencionar además, que seis de las nueve lisinas identificadas como SUMOiladas (K5 y K129 de H2A; K5 de H2B; K24 de H3; K6 y K11 de H4) han sido previamente **reportadas como acetiladas** en *T. brucei* (Mandava, Fernandez et al. 2007), lo que sugiere un rol competitivo de estas dos modificaciones con posibles consecuencias diferentes. Aunque la SUMOilación de histonas ha sido asociada a la represión de la transcripción en otros organismos (Nathan, Ingvarsdottir et al. 2006), es prematuro asumir, sin embargo, que la modificación por *TbSUMO* tendrá el mismo efecto en el parásito.

La histona H3v, que encontramos SUMOilada en su K32, ha sido caracterizada en *T. brucei*, localizándose fundamentalmente en regiones repetitivas de telómeros (Lowell and Cross 2004). Se ha propuesto que la histona H3v, de manera conjunta con la histona H4v, se encontraría enriquecida en probables sitios de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II (Siegel, Hekstra et al. 2009).

De manera general se cree que la modificación post-traducciona de histonas genera plataformas de interacción para factores regulatorios (Millar and Grunstein 2006), por lo que las consecuencias de la SUMOilación de estas proteínas dependerían directamente de aquellas reclutadas por este modificador (Cubenas-Potts and Matunis 2013).

Topoisomerasa IB- Subunidad mayor

Las ADN topoisomerasas son enzimas que resuelven el superenrollamiento generado en el proceso de replicación, transcripción, recombinación y reparación del daño al material genético, mediante corte y religado del ADN. Existen dos familias: topoisomerasas de tipo I (Topo I), monómeros que clivan una sola hebra de ADN de manera independiente de ATP, y topoisomerasas de tipo II (Topo II), multímeros que clivan ambas hebras de manera dependiente de ATP. Dentro de la familia de topoisomerasas tipo I, encontramos a las topoisomerasas IA y las IB. Estas dos clases se diferencian en su mecanismo catalítico y especificidad de sustrato. Las **ADN topoisomerasas IB** clivan una hebra de ADN y resuelven el superenrollamiento positivo y negativo, formando un intermediario covalente proteína-ADN. Estas enzimas poseen un dominio N-terminal de unión al ADN y un extremo C-terminal conservado, que contiene la tirosina catalítica.

A diferencia de otros organismos, en los kinetoplástidos, la topoisomerasa IB (Topo IB) se encuentra formando un dímero, cuyas subunidades son codificadas por genes distintos localizados en cromosomas diferentes (Bodley, Chakraborty et al. 2003; Vlachakis, Pavlopoulou et al. 2014). La subunidad mayor identificada como SUMOilada en nuestros experimentos de proteómica, de 90 kDa, posee el dominio de unión al ADN mientras que la menor, de 36 kDa, es responsable de la actividad catalítica. Experimentos de ARNi han demostrado además que estas dos subunidades son esenciales para *T. brucei* (Bakshi and Shapiro 2004).

Las **lisinas** identificadas como **SUMOiladas** por proteómica en la Topo IB son **cuatro** (K13, K20, K47 y K75) y todas ellas se encuentran en el extremo hidrofílico no conservado del extremo N-terminal de la proteína (previo al dominio de unión al ADN).

En humanos y levaduras, la SUMOilación de la Topo II es necesaria para su acumulación en los centrómeros, donde participa en la correcta segregación de cromosomas (Lee and Bachant 2009).

La SUMOilación de la Topo I en estos organismos ha sido también descrita en respuesta al tratamiento con camptothecin (inhibidor específico de Topo I) (Mao, Sun et al. 2000). Aunque todavía no se sabe con seguridad cual es la función que cumple la SUMOilación en esta proteína, se especula que estaría relacionada con la resolución del intermediario covalente entre la Topo I y el ADN (Steinacher, Osman et al. 2013).

Antígeno de proliferación nuclear

El **antígeno de proliferación nuclear** (PCNA) es una proteína asociada a múltiples procesos celulares. Fundamentalmente funciona como co-factor de la ADN polimerasa (ADN pol) al unirse al complejo pre-replicative [Origin recognition complex (Orc1-6), Cdc6, replication factor Cdt1 y mini-chromosome maintenance proteins (Mcm2-7)].

La proteína PCNA forma un homotrímero en forma de anillo, que se une al ADN a través de la formación de un complejo con RFC (Replication Factor C). Esta proteína rodea la doble hebra (puede moverse en las dos direcciones) y mantiene a la ADN pol unida al ADN. De esta manera confiere **alta procesividad a la polimerasa**, funcionando también como **plataforma de interacción** con otros factores involucrados incluso en procesos como reparación del ADN, control del ciclo celular, metilación de citosinas en islas CpG asociada al silenciamiento de genes, unión de metiltransferasas, acetiltransferasa y deacetiltransferasa de histonas, cohesión de cromátidas hermanas e inducción de apoptosis, entre otros. Estos interactores poseen un motivo PIP (PCNA-Interacting Protein) y generalmente se unen a una misma región de PCNA, siendo entonces estas interacciones mutuamente excluyentes. De todos modos, se especula que su disposición como **homotrímero** permitiría la unión diferencial de distintos interactores simultáneamente (Moldovan, Pfander et al. 2007).

En levaduras se ha reportado que ScPCNA participa en el mecanismo de reanudación de la replicación cuando la polimerasa se detiene (bypass replication). Esta proteína puede ser ubiquitinada en su K164: cuando se encuentra monoubiquitinada promueve la reparación con incorporación de error (error-prone pathway), mientras que cuando se encuentra poliubiquitinada (cadena de ubiquitina en K164 a través de la K63 de la ubiquitina) promueve la reparación sin incorporar bases incorrectas (error-free mode) (Hoegge, Pfander et al. 2002).

En *T. brucei* BS, *TbPCNA* se observa claramente en focos nucleares puntuales durante la fase S y luego, a diferencia de *T. cruzi* y *Leishmania*, desaparece en G2 (Kaufmann, Gassen et al. 2012; Valenciano, Ramsey et al. 2015).

Aunque no existen reportes previos de SUMOilación de *TbPCNA* se sabe que normalmente una pequeña fracción de la proteína se encuentra modificada por SUMO en fase S en *S. cerevisiae*, *Xenopus* y pollos, incluso en ausencia de daño al ADN (Hoegel, Pfander et al. 2002; Leach and Michael 2005; Arakawa, Moldovan et al. 2006).

Se cree que la SUMOilación de esta proteína **evitaría la recombinación de cromátidas hermanas** que puede darse como vía de escape ante la detención de la replicación, a través del reclutamiento de la helicasa Srs2 (mediante un motivo SIM) (Dieckman, Freudenthal et al. 2012).

De manera general se especula que la SUMOilación de PCNA **impediría la unión de interactores con motivos PIP**, funcionando como un “botón de reseteo” de todas la interacciones de PCNA (Moldovan, Cell, 2007-Review).

En humanos la proteína PCNA puede ser SUMOilada en varias lisinas, por ejemplo la K254 y la K164 (Gali, Juhasz et al. 2012). En *S. cerevisiae* existen por lo menos 3 lisinas SUMOilables aunque sólo dos de ellas han sido identificadas. La K127 se encuentra dentro de un motivo consenso de SUMOilación, que permite la unión directa de Ubc9 (E2) mientras que, por el contrario, la SUMOilación de la K164 (lisina conservada en humanos) requeriría la intervención de una E3 ligasa al no formar parte de un sitio canónico de SUMOilación (Windecker and Ulrich 2008).

En *T. brucei* solamente la K164 (y no la K127 de *S. cerevisiae*) se encuentra conservada, aunque no fue encontrada SUMOilada en nuestro experimento de proteómica. Por el contrario, la K201 identificada en el estadio PC del parásito se encuentra conservada en levaduras, humanos, *Arabidopsis* y *Drosophila* (Kaufmann, Gassen et al. 2012), pero no existen reportes de su SUMOilación en estos organismos.

Endo/exonuclease Mre11

La endo/exonucleasa Mre11 (MRE11) es una proteína de 70-90 kDa (82,2 kDa en *T. brucei*), conservada en levaduras y mamíferos, con un dominio fosfoesterasa en su extremo N-terminal dependiente de Mn^{+2}/Mg^{+2} , y dos dominios diferentes de unión al ADN en su extremo C-terminal. Esta proteína forma dímeros estables que pueden unirse al material genético y poseen actividad exo y endonucleasa sobre ADN simple y doble cadena. MRE11 carece de actividad exonucleasa 5'-3', necesaria para generar extremos 3' protruyentes para recombinación homóloga; por este motivo se cree que se asocia con otras exonucleasas para llevar a cabo esta función (Lamarche, Orazio et al. 2010).

La proteína MRE11, conjuntamente con la exonucleasa 1 (EXO1), es necesaria para la **reparación de rupturas de doble cadena** por recombinación homóloga (degradación del extremo 5' para generar un extremo 3' protruyente). La actividad endonucleasa de MRE11 es fundamental cuando las rupturas de doble cadena están bloqueadas por unión de proteínas, como la topoisomerasa II o la nucleasa de meiosis Spo11. La actividad exonucleasa de MRE11 es necesaria también para la remoción de Spo11 del extremo 5' del ADN. Otras proteínas como Sae2, Dna2 o la helicasa Sgs1 participan en este proceso (Garcia, Phelps et al. 2011).

La forma dimérica de MRE11 se asocia con dos moléculas de Rad50 formando luego un complejo MRE11₂Rad50₂Nbs1 con Nbs1 (**complejo MRN**). Rad50 (miembro de la familia de proteínas SMC - structural maintenance of chromosomes) aumenta la afinidad de MRE11 por el ADN y estimula al mismo tiempo su actividad de nucleasa. La unión de Nbs1 (entre otras funciones) aumenta esto aún más y permite la localización nuclear del complejo. Rad50 posee también otras funciones inherentes a su estructura.

El complejo MRN es fundamental para la detección de rupturas de doble cadena (DSB, Double-Strand Breaks) en el ADN y activación de cascadas de señalización, determinación del mecanismo de reparación (recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos), reparación del daño y estabilización de los telómeros (al facilitar el reclutamiento de la telomerasa). Este complejo también está implicado en la respuesta celular ante la entrada de ADN exógeno, ya que interactúa con el ADN foráneo (por ejemplo, virus) al reconocerlo como DSB (Lamarche, Orazio et al. 2010).

Las proteínas MRE11 y Nbs1 han sido **reportadas como SUMOiladas** (se cree que en más de una lisina) en células de mamíferos infectadas con adenovirus (Sohn and Hearing 2012). De hecho, varias proteínas involucradas en la reparación del daño al ADN ante rupturas de doble hebra se encuentran SUMOiladas: las ya mencionadas MRE11, Nbs1b (o su ortólogo en levaduras Xrs2) y Rad50; la nucleasa Sae2, la helicasa Sgs1, y 2 subunidades de RPA (replication protein A complex). La SUMOilación de estas proteínas aumenta ante el daño en el ADN. La depleción de MRE11 disminuye la SUMOilación de Rad52, Rad59 y las dos subunidades de RPA-Rfa1 y Rfa2 (Cremona, Sarangi et al. 2012).

Recientemente se ha reportado que SLX4 (coordinator of multiple DNA structure-specific Endonucleases) interactúa con MRN y otros factores (como RPA-que se sabe está SUMOilado en dos subunidades- y TRF2-involucrado en el mantenimiento de telómeros) vía SIM. Resta dilucidar, sin embargo, si intervienen indirectamente otras proteínas SUMOiladas (Ouyang, Garner et al. 2015).

Se ha visto también que MRE11, y no Nbs1, interacciona con SUMO en ensayo de doble híbrido (Cheng, Chuang et al. 2013).

Esta proteína no ha sido estudiada hasta la fecha en *T. brucei* y su lisina SUMOilada en el parásito (K685) no se encuentra formando parte de ningún dominio caracterizado.

RuvB-like ADN helicasa

Las proteínas RuvA, RuvB y RuvC están involucradas en el **procesamiento de la unión Holliday** (Holliday junction) durante la recombinación homóloga.

RuvB es una ADN helicasa ATP-dependiente perteneciente a la familia AAA+ (ATPase associated with various cellular activities). Posee un "arginine finger" de unión a ATP.

RuvB es un hexámero que rodea la doble hebra de ADN y puede moverse en ambas direcciones. Esta proteína necesita de RuvA (entre otros factores) para manifestar su actividad de **helicasa** (Caruthers and McKay 2002). En este complejo RuvA se ubica entre dos hexámeros de RuvB. Se especula que dada la similitud de RuvB con algunas chaperonas descritas, podría inducir un cambio conformacional en RuvA favoreciendo su función.

Esta proteína no ha sido estudiada hasta la fecha en *T. brucei*. La K5, identificada como SUMOilada en el parásito, se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, sin dominio característico asociado.

Proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas 4

En eucariotas la proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas 4 (SMC4) o chromosome-associated polypeptide C (CAP-C) forma junto con SMC2 el heterodímero central de la **condensina I y II** (asociado a otras proteínas no SMC: CAP-H, CAP-G y CAP-D2 en la condensina I y a CAP-H2, CAP-G2 and CAP-D3 en la condensina II). Estos complejos están involucrados en la **condensación de cromosomas** (Barysz, Kim et al. 2015). La proteína CAP-D2 (Ycs4 en levaduras) ha sido reportada como SUMOilada de manera dependiente de Cdc14 en *S. cerevisiae* (D'Amours, Stegmeier et al. 2004).

La proteína SMC4 presenta un dominio N-terminal característico de SMC y actividad ATPasa. La K1302 SUMOilada en *T. brucei* se encuentra en el extremo C-terminal (sin dominio característico asociado).

En *S. cerevisiae* la proteína SMC5 (que, en complejo con SMC6 participa en procesos relacionados al mantenimiento de telómeros) ha sido descrita como SUMOilada (Chavez, George et al. 2010).

De la misma manera, la cohesina *TbSMC3* estaría SUMOilada de manera independiente de la E3 ligasa *TbSIZ1* en *T. brucei* (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014), al igual que su ortólogo en *T. cruzi* que también ha sido identificado como potencial sustrato de SUMOilación en experimentos de proteómica (Bayona, Nakayasu et al. 2011).

Proteína del cinetocoro del kinetoplasto 4

El complejo del cinetocoro, involucrado en la **segregación de cromosomas** durante la división celular, está formado por un conjunto de 19 proteínas (KKT1-19) en *T. brucei*. Estas proteínas se unen a regiones centroméricas ricas en AT, tanto en los cromosomas grandes como en los minicromosomas, de manera más difusa.

La proteína del cinetocoro del kinetoplasto 4 (**KKT4**) de expresión constitutiva lo largo del ciclo celular en PC, posee un dominio BRCA1 C-terminal (BRCT). Este dominio se encuentra en proteínas de control del ciclo celular asociadas al daño en el ADN. Se especula que esta proteína podría unirse directamente al ADN (al igual que KKT2 y KKT3) (Akiyoshi and Gull 2014). La K356 SUMOilada en *T. brucei* PC no se encuentra dentro de este dominio.

En metafase KKT4 se localiza en la placa metafásica, aunque luego migra a los polos durante la anafase. Se ha observado también una asociación de esta proteína con la nucleoporina Mlp2 en trypanosomátidos (Morelle, Sterkers et al. 2015).

Poco se sabe de la SUMOilación de componentes de este complejo. Algunos reportes indican, sin embargo, que aunque la SUMOilación no pareciera afectar drásticamente el ensamblado de los componentes del cinetocoro en *C. elegans*, su adecuada regulación es necesaria para la correcta condensación de cromosomas y la progresión del ciclo celular (Pelisch, Sonnevill et al.

2014). En mamíferos, en cambio, la depleción de SUMO1 altera la unión del complejo del cinetocoro a los microtúbulos en metafase y la localización de la γ -tubulina (Yuan, Zhai et al. 2014). Se especula que esto podría estar relacionado con la SUMOilación de RANGAP1, ya que esta modificación es esencial para su localización en el uso mitótico y su unión al cinetocoro (Joseph, Liu et al. 2004).

Subunidad RPB12 de la ARN polimerasa ADN-dependiente

RPB12 es uno de los 5 **polipéptidos comunes a las tres polimerasas** (junto con RPB5, RPB6, RPB8 y RPB10), aunque existen parálogos para RPB5 y RPB6 que forman parte diferencialmente de la ARN pol I y de la ARN pol II (Devaux, Kelly et al. 2007).

En *T. brucei* su ortólogo fue identificado a partir de la purificación del complejo ARN pol II vía su subunidad específica RPB4. Aunque presenta sólo un 10% y un 6,8% de identidad con su ortólogo de levaduras y humanos respectivamente, esta proteína pequeña de 9,1 kDa presenta un extremo C-terminal cargado positivamente y un motivo de unión a zinc (CX2CX10-15CX2C) altamente conservados (Das, Li et al. 2006).

Aunque en otros organismos se ha reportado la SUMOilación de varias subunidades de las ARN polimerasas y proteínas asociadas (Albuquerque, Wang et al. 2013), en *T. brucei* solo se ha descrito la SUMOilación de la subunidad mayor de la ARN pol I, *TbRPA1*, de manera dependiente de la E3 ligasa *TbSIZ1* (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

Proteínas relacionadas con el exosoma: RRP6, CSL4 y EAP2

El exosoma es un complejo proteico presente en el núcleo y en el citoplasma de las células, involucrado en el procesamiento y degradación del ARN. En particular favorece la degradación de ARNm con 3'UTR ricos en U (UREs), gracias a su actividad exoribonucleasa 3'-5', y se encuentra involucrado en el procesamiento del ARNr 5.8S.

El complejo de *T. brucei* es estructuralmente similar al de levaduras y humanos y posee un centro en forma de anillo formado por 6 subunidades ARNasa PH (*TbEAP1*, ***TbEAP2***, *TbEAP4*, *TbRRP41A*, *TbRRP41B*, *TbRRP45*) y 3 subunidades con dominio S1 (*TbRRP40*, *TbRRP4*, ***TbCSL4***) ubicadas sobre el anillo. Además interactúa con el heterodímero ***TbRRP6-TbEAP3***. (Estevez, Kempf et al. 2001; Haile, Cristodero et al. 2007; Barbosa, Legrand et al. 2014).

La proteína ***TbCSL14*** fue identificada inicialmente a partir de la purificación del complejo via TAP-*TbRRP4* (Estevez, Kempf et al. 2001). Su dominio N-terminal no se encuentra conservado pero sí presenta el motivo S1 de unión a ARN característico. A diferencia de lo que ocurre en levaduras, no es una subunidad esencial aunque la reducción de su expresión (evaluada por ARNi) produce un retraso en el crecimiento en PC y BS sin alterar el procesamiento del ARNr 5.8S en BS (Haile, Estevez et al. 2003). La K6 identificada como SUMOilada en nuestro experimento de proteómica no forma parte de ningún dominio característico.

La proteína ***TbRRP6***, también identificada, posee un dominio EXO (exonucleasa, sitio catalítico D271) y un dominio HRDC (función helicasa y ARNasa D) al C-terminal, con un puente disulfuro dispensable para su actividad *in vitro*. Su extremo C-terminal es el que permite la interacción con

el exosoma y su dominio N-terminal estaría involucrado en la unión al cofactor *TbEAP3*. Curiosamente, RRP44, interactor en levaduras y humanos con RRP6, no presenta ortólogo en *T. brucei*, y *TbEAP3* carece de sus dominios característicos (Sas10/C1D y región rica en lisinas de interacción con ARN). *TbRRP6* y su heterodímero *TbRRP6-TbEAP3* (1:1) degradan *in vitro* ARN simple y doble cadena sin la necesidad de extremos 3' protruyentes. Esta última característica no se observa en sus ortólogos de levadura y humanos. La enzima sólo es activa en presencia de metales divalentes (preferentemente Mn^{+2} y posiblemente Zn^{+2}) (Barbosa, Legrand et al. 2014). A diferencia de lo que ocurre en levaduras, *TbRRP6* es una subunidad esencial en *T. brucei* PC. Su presencia fue demostrada en estos parásitos tanto en el exosoma citosólico (patrón punteado con algunos focos en flagelo) como en el nuclear, pese a ser una subunidad exclusivamente nuclear en levaduras y mayoritariamente nuclear en humanos. Su depleción por ARNi reduce la expresión de *TbRRP4* y *TbRRP45*. Sin embargo, en PC es estable incluso en ausencia de otras subunidades del complejo. En conjunto estos datos sugieren un rol activo de esta proteína en el ensamblado y/o estabilidad del exosoma (Haile, Cristodero et al. 2007). Las lisinas identificadas como SUMOiladas en nuestro estudio (K552 y K691) se encuentran en el extremo C-terminal sin dominio característico asociado, responsable de su interacción con el exosoma.

La tercera proteína identificada, *TbEAP2*, es esencial para la integridad del exosoma y su depleción (por ARNi) altera el procesamiento del ARNr 5.8S y reduce la expresión de *TbRRP45* en *T. brucei*. Aunque puede observarse una doble banda por Western blot sus movilidades electroforéticas aparentes no parecieran corresponderse con bandas de SUMOilación de la proteína completa (Estevez, Lehner et al. 2003).

Aunque no existen reportes previos de SUMOilación de los componentes mencionados en *T. brucei*, la proteína RRP45 ha sido identificada como sustrato de SUMOilación en experimentos de proteómica en mamíferos (Golebiowski, Matic et al. 2009). La proteína PMSCL1 (ortólogo en humanos de RRP45) posee un motivo SIM en su extremo C-terminal, fosforilado por la kinasa CK2 en sus serinas 409 y 411 *in vitro*. La integridad del dominio hidrofóbico y la fosforilación del SIM son críticos para la unión a SUMO (Stehmeier and Muller 2009). A través de este motivo SIM, RRP45 interacciona con la ARN/ADN helicasa involucrada en la terminación de la transcripción por la ARN pol II, Senataxin (SETX) SUMOilada en células HeLa. La SUMOilación de SETX y, en consecuencia, su interacción con RRP45, se ven alteradas en el desorden neurológico AOA2 (Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 2). Se piensa que SETX estaría participando, junto con otros factores, en la reparación del daño al ADN en sitios de colisión de las maquinarias replicativa y transcripcional y ante estrés oxidativo (R-loops y rupturas de doble cadena). Esta novedosa interacción permite localizar al **exosoma en sitios con daño al ADN** de manera dependiente de SUMO (Richard, Feng et al. 2013).

Proteína represora de la activación RAP1

TbRAP1 es una proteína fundamentalmente **telomérica** que interacciona con la proteína *TbTRF*, encargada del mantenimiento de la integridad de los extremos de los cromosomas en *T. brucei* (Li, Espinal et al. 2005). A diferencia de su ortólogo en humanos, la proteína del parásito conserva los dos dominios necesarios de unión al ADN que se observan en RAP1 de *S.*

cerevisiae y ha demostrado ser esencial en parásitos BS. *TbRAP1* produce un **gradiente de silenciamiento** que permite reprimir con mayor fuerza genes ubicados en regiones próximas a los telómeros. El silenciamiento de esta proteína en BS conlleva entonces a la derepresión de los sitios subteloméricos de expresión de las VSG (VSG-ES) inactivas (y no de aquellas VSG presentes en minicromosomas), produciendo la expresión simultánea de múltiples proteínas VSG en la superficie del parásito en este estadio (Yang, Figueiredo et al. 2009).

En el estadio PC del parásito, *TbRAP1* es también esencial y el silenciamiento de los **VSG-ES inactivos** por esta proteína es más fuerte que en BS. Además, a diferencia de lo que ocurre en BS, la depleción de esta proteína por ARNi produce además del efecto ya reportado en BS, cambios en la estructura de la cromatina, especialmente en las regiones subteloméricas asociadas a la expresión de VSG (Pandya, Sandhu et al. 2013).

La SUMOilación de RAP1 ha sido descrita en *S. cerevisiae*, siendo esta modificación importante para la viabilidad celular. ScRAP1 SUMOilada permite el reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal y promueve la transcripción de genes ribosomales y de ARNt vía TORC1 (target of rapamycin kinase complex 1) (Chymkowitz, Nguea et al. 2015).

La SUMOilación de esta proteína (en su lisina K292) identificada en nuestro experimento de proteómica, permite vincular nuevamente a esta modificación postraducciona con el complejo mecanismo de expresión monoalélica de VSG y variación antigénica en el parásito.

SUMO E3 ligasa TbSIZ1

Esta proteína fue identificada mediante un ensayo de doble híbrido como interactor de *TbRBP7*, subunidad asociada normalmente a la ARN pol II pero que forma parte del complejo de la ARN pol I involucrado en la expresión de la VSG en BS. Esta proteína de 72 kDa de alta expresión en BS posee un **dominio SP-RING característico de SUMO E3 ligasas de la familia PIAS** (ortólogo de SIZ en levaduras y PIAS en mamíferos) y no es una proteína esencial en este estadio del parásito. Su localización subcelular es, al igual que otras ligasas de SUMO, predominantemente **nuclear**, distribuida en focos puntuales (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

Se encuentra involucrada en la SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina en el sitio de expresión de la VSG activa en BS. Co-localiza parcialmente con el HSF (Highly SUMOylated Focus; foco de SUMOilación puntual observado en el núcleo de BS por IFI) asociado de manera relativa al sitio de expresión telomérico de la VSG activa, ESB (Expression Site Body). Esta co-localización ocurre de manera diferencial en función del ciclo celular.

Su depleción (por ARNi), aunque reduce la señal de *TbSUMO* analizada por IFI no elimina en su totalidad el HSF. Sin embargo, un efecto similar se observa al depletar de manera equivalente *TbSUMO* de las células. La depleción de *TbSIZ1* reduce también los niveles de *TbSUMO* en la región río arriba del promotor del VSG- ES activo y el reclutamiento de la ARN pol I, analizado por ChIP. La transcripción en el locus activo se encuentra regulada positivamente por SUMOilación (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014).

Aunque no hay reportes de SUMOilación de ligasas en parásitos, en mamíferos, las SUMO E3 ligasas PIAS α /ARIP3 (androgen receptor [AR]-interacting protein 3), PIAS β /Miz1 (Msx-interacting zinc finger) y PIAS1 se encuentran SUMOiladas en más de una lisina (Kotaja, Karvonen et al. 2002).

Se cree que la SUMOilación de E3 ligasas puede modificar su localización subcelular. A modo de ejemplo podemos citar la localización de RanBP2 en el complejo del poro nuclear, Pc2 (polychrome 2, remodelador de la cromatina) en cuerpos nucleares PcG (polycomb group) (Rosic, Moller et al. 2006) y algunas ligasas de la familia PIAS cuya localización es también nuclear al ser SUMOiladas (Yang and Sharrocks 2010).

Ribonucleoproteína U3 nucleolar pequeña MPP10

El procesamiento del ARNr 18S es llevado a cabo por el complejo SSU (small subunit processome), formado por los subcomplejos U3 snoRNP (ribonucleoproteína U3 nucleolar pequeña), tUTP, bUTP, MPP10 y BMS1/RCL1.

El **complejo MPP10** está formado por la fosfoproteína de fase M MPP10 y los dos factores de annealing IMP3 y IMP4 (Turner, Knox et al. 2009).

Esta proteína fue identificada en *T. brucei* PC mediante experimentos de proteómica en fracciones enriquecidas en acidocalcisomas (Huang, Ulrich et al. 2014). La lisina SUMOilada identificada (K355) no se encuentra dentro de ningún dominio característico.

Proteína ribosomal 60S L11

La proteína ribosomal L11 inhibe la ubiquitinación mediada por la E3 ligasa de ubiquitina MDM2, en respuesta al estrés nucleolar. El mismo efecto se observa con la proteína ARF (alternate reading frame). La proteína MDM2, en complejo con L11 y la proteína ARF, SUMOila a p53 (mediante SUMO2/3) en células humanas (Stindt, Carter et al. 2011).

En *T. brucei* PC se ha reportado la reducción de la transcripción de L11 ante la depleción por ARNi de la proteína ribosomal L5 (Umaer, Ciganda et al. 2014), pero hasta la fecha, la lisina identificada por nosotros (K5) constituye el primer reporte de SUMOilación de esta proteína.

La **Figura 57** resume de manera esquemática algunos de los distintos procesos celulares que estarían siendo regulados por *TbSUMO* mediante la modificación de las proteínas identificadas por proteómica.

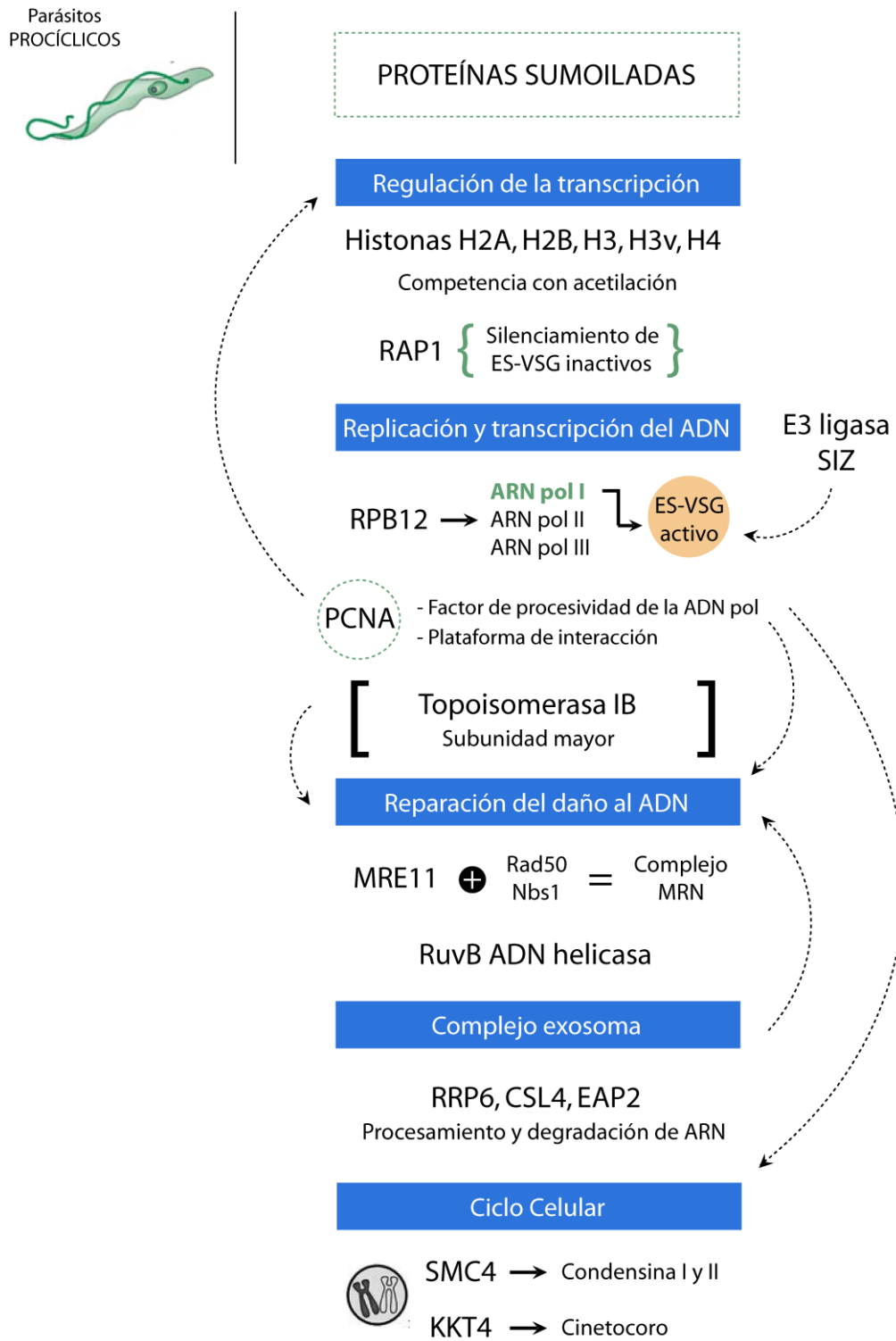


Figura 57. Sustratos de SUMOilación identificados por proteómica sitio-específica en *T. brucei* PC. Representación esquemática de las principales proteínas SUMOiladas identificadas por espectrometría de masas (Proteómica PC5) en parásitos PC. Se destacan fundamentalmente los principales procesos celulares en los que intervienen y las relaciones entre ellos ya reportadas.

De manera general, los resultados obtenidos a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} han permitido generar una **lista confiable de sustratos de SUMOilación** en el estadio PC del parásito, identificándose además las **lisinas modificadas** en un mismo experimento de proteómica. Sin embargo, existe una muy baja superposición entre las proteínas identificadas por esta estrategia y aquellas obtenidas en las proteómicas precedentes, habiéndose detectado solamente la histona H2A y la proteína SMC4 en la proteómica PC3 (HisHA-*TbSUMO* D).

Vale la pena destacar que, ante estos primeros resultados favorables, resulta alentador rediseñar la estrategia empleada para permitir la purificación óptima de conjugados a HisHA-*TbSUMO*^{T106K} a partir de líneas celulares con un doble reemplazo del alelo endógeno, en ausencia de copias silvestres. Considerando los antecedentes descritos en el desarrollo de las primeras estrategias mencionadas es de esperar que la incorporación de las etiquetas y la mutación deseada (T106K) ocurra con mayor eficiencia realizando algunos cambios de codones sinónimos en el ORF de *TbSUMO*, eliminando esta región de homología indeseada para el proceso de recombinación pretendido.

Considerando de manera general los resultados obtenidos en los dos estadios del parásito resulta difícil realizar una comparación rigurosa de proteínas diferencialmente SUMOiladas en PC y BS, que nos permita inferir funciones diferenciales del modificador.

Es de esperar que la pronta identificación de proteínas SUMOiladas a partir de la línea HisHA-*TbSUMO*^{T106K} en BS, nos permita resolver esta cuestión y dilucidar el rol de esta modificación post-traducciona en la regulación de la expresión de antígenos de superficie en el parásito.

SEGUNDA PARTE

Herramientas para el estudio del sistema de
SUMOilación

RESULTADOS

CAPÍTULO IV

Desarrollo de un sistema de SUMOilación *in bacteria* específico de *Trypanosoma brucei*

4.1 Reconstitución de la maquinaria de SUMOilación de *T. brucei* en un sistema bacteriano

Habiendo identificado una serie de proteínas blanco de SUMOilación en el parásito era necesario el desarrollo de una herramienta sencilla que permita la obtención de las distintas proteínas en su forma SUMOilada para facilitar el estudio del efecto que dicha modificación post-traduccional ejerce sobre éstos u otros potenciales sustratos. Considerando las desventajas que conlleva la expresión y purificación de cada uno de los componentes del sistema en un ensayo tradicional de SUMOilación *in vitro* (Werner, Moutty et al. 2009; Yunus and Lima 2009) decidimos **reconstruir la maquinaria de SUMOilación de *T. brucei* *in vivo* en un sistema bacteriano**. Dado que las bacterias no presentan un sistema de SUMOilación convencional no existe maquinaria análoga que compita o interfiera con la que se expresa de manera heteróloga. De esta manera, diseñamos un sistema inducible que permite la co-expresión, en bacterias *Escherichia coli* BL21 DE3, de las dos subunidades de la enzima activadora de *TbSUMO* (*TbE1a* y *TbE1b*), la enzima conjugadora de *TbSUMO* (*TbE2*) y una versión de *TbSUMO* ya procesada y etiquetada en su extremo N-terminal con el epítopo HA. Este sistema inducible permite además la expresión simultánea de la proteína cuya SUMOilación se quiere evaluar (Figura 48).

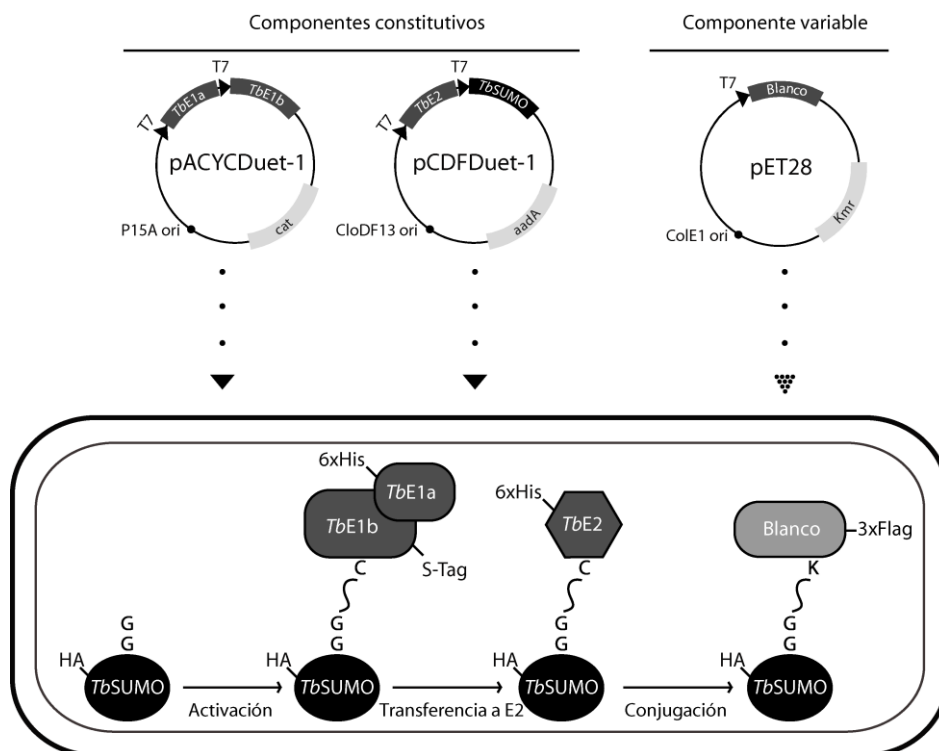


Figura 48. Representación esquemática del sistema de SUMOilación de *T. brucei* en *E. coli*. El vector pACYCDuet-1 permite la co-expresión de las dos subunidades de la enzima activadora (*TbE1a/TbE1b*) mientras que el vector pCDFDuet-1 permite la co-expresión de la enzima conjugadora (*TbE2*) y de *TbSUMO*. El vector pET28 permite la expresión del sustrato a evaluar (componente variable) fusionado en su extremo C-terminal con una etiqueta de Flag repetida tres veces (3xFlag).

Para llevar esto a cabo, cada uno de los componentes del sistema mencionado fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *T. brucei*, secuenciado y clonado en vectores de la serie Duet que permiten la expresión de dos proteínas de manera simultánea, agregando en cada caso etiquetas específicas para facilitar su detección y, eventualmente, su purificación. La adecuada combinación de estos vectores, considerando la compatibilidad de orígenes de replicación y marcadores de resistencia a antibióticos, es la que permite la expresión conjunta de los componentes necesarios para reconstruir el sistema de manera inducible.

Las dos subunidades de la enzima activadora *TbE1* fueron clonadas en el vector pACYCDuet-1 (**pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b***), conteniendo el origen de replicación P15A, un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (*cat*) y el operón de expresión *lac*. La inducción del vector con el análogo no hidrolizable de lactosa, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), permite la co-expresión de *TbE1a* con una etiqueta de 6 histidinas (His) en su extremo N-terminal y de *TbE1b* con una etiqueta S (S15 o S-tag; oligopéptido derivado de la ARNasa A pancreática) en su extremo C-terminal.

En paralelo, la enzima conjugadora *TbE2* y la forma procesada de *TbSUMO* (exponiendo el motivo diglicina en su extremo C-terminal, necesario para su conjugación) fueron clonadas en el vector pCDFDuet-1 con etiquetas de His y HA en su extremo N-terminal respectivamente (**pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO***). El vector pCDFDuet-1 contiene el origen de replicación CloDF13, un gen que confiere resistencia a estreptomycin/espectinomycin (*aadA*) y el operón de expresión *lac*. De manera equivalente a lo descrito para el vector pACYCDuet-1, la inducción con IPTG permite la expresión simultánea de *TbE2* y de *TbSUMO* con sus respectivas etiquetas.

En todos los casos, **bacterias *E. coli* BL21 DE3** transformadas con uno de estos vectores, su combinación y/o plásmidos control sin los componentes mencionados, fueron crecidas hasta fase exponencial e **inducidas con 1 mM IPTG** durante 5 hs a 37°C. Los cultivos así obtenidos fueron cosechados por centrifugación y resuspendidos en un buffer de lisis convencional. Los extractos resultantes fueron sonicados hasta pérdida de viscosidad y clarificados por centrifugación permitiendo la separación de fracciones solubles e insolubles en estas condiciones.

Teniendo en cuenta este procedimiento, la correcta expresión y solubilidad de HA-*TbSUMO* y de las enzimas necesarias para la SUMOilación fue analizada en los **extractos bacterianos solubles** por SDS-PAGE y tinción de Coomassie Blue (Figura 49 A) y, en la mayoría de los casos, también por Western blot utilizando anticuerpos específicos que reconocen las etiquetas de cada componente (Figura 49 B)⁶.

⁶ Considerando la imposibilidad de obtener anticuerpos que reconozcan la etiqueta S (S-tag) no fue posible analizar por Western blot la expresión de la subunidad mayor de la enzima activadora de *TbSUMO*, *TbE1b*.

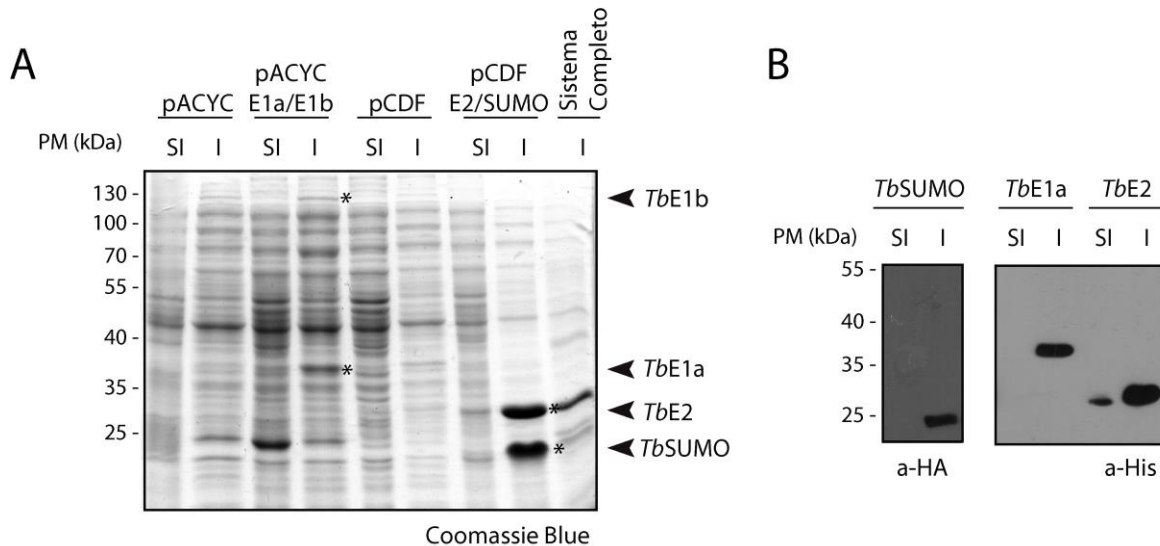


Figura 49. Evaluación de la expresión de los distintos componentes del sistema de SUMOilación de *T. brucei* en *E. coli*. (A) Análisis de la expresión de las distintas proteínas recombinantes por SDS-PAGE y tinción por Coomassie Blue. Los extractos solubles de bacterias *E. coli* BL21 DE3 transformadas con el vector vacío pACYCDuet-1 (pACYC, calles 1 y 2), el vector pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* (pACYC E1a/E1b, calles 3 y 4), el vector vacío pCDFDuet-1 (pCDF, calles 5 y 6), el vector pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO* (pCDF E2/SUMO, calles 7 y 8) y con los vectores pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* y pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO* de manera simultánea (Sistema Completo, calle 9) se observan en cada caso tras la inducción con IPTG (I) o sin el agregado de inductor (SI). En todos los casos se sembraron cantidades equivalentes de proteína total (30 µg). Los pesos moleculares esperados para cada proteína (incluyendo las etiquetas) son: 14 kDa para *TbSUMO*, 28 kDa para *TbE2*, 40 kDa para *TbE1a* y 97 kDa para *TbE1b*. Las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes se encuentran resaltadas con asteriscos (*) y etiquetadas en el margen derecho del gel. (B) Análisis por Western blot de algunas de las muestras mencionadas en (A) utilizando anticuerpos anti HA para los extractos derivados de pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO* (*TbSUMO*, calles 1 y 2) y anti His para los extractos derivados de pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* (*TbE1a*, calles 3 y 4) y pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO* (*TbE2*, calles 5 y 6).

Como puede visualizarse en la Figura 49, se observan **altos niveles de expresión** en extractos solubles de las proteínas recombinantes *TbSUMO* y *TbE2*, mientras que niveles más bajos son detectados para las subunidades de la enzima activadora de *TbSUMO*, particularmente de la subunidad *TbE1b*, en concordancia con lo reportado (Werner, Moutty et al. 2009). En todos los casos fue posible confirmar el peso molecular esperado para cada componente, con la excepción de *TbSUMO*, cuya movilidad electroforética atípica ya ha sido descrita (Johnson 2004).

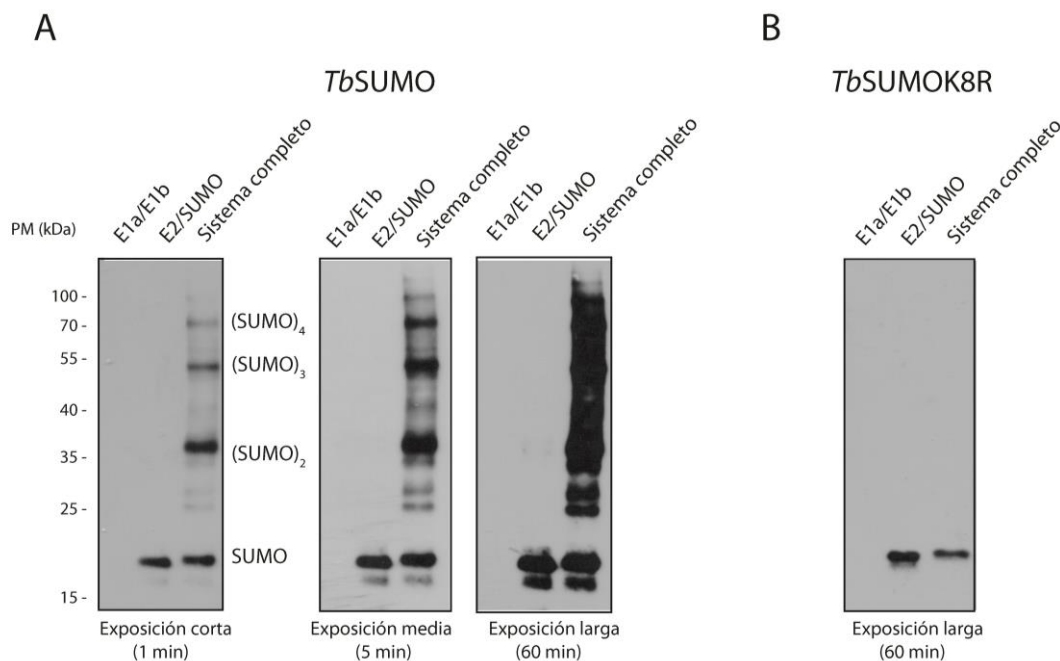
Tras la confirmación de la expresión de todos los componentes de la maquinaria de SUMOilación en forma soluble decidimos **evaluar la funcionalidad del sistema** en su conjunto, en ausencia de un blanco externo de SUMOilación.

Para llevar esto a cabo realizamos inducciones de bacterias conteniendo solo el vector pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b*, solo el vector pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO* o la combinación de ambos, y procesamos las muestras como fue descrito anteriormente. Los extractos solubles resultantes fueron evaluados por Western blot utilizando anticuerpos anti HA, permitiendo la visualización de la versión de *TbSUMO* empleada.

Como puede observarse en la Figura 50 A la expresión del sistema completo (pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* y pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO*) analizada por Western blot arroja un patrón de bandas complejo de alto peso molecular, que no se observa en ausencia de las dos subunidades de *TbE1*. Las múltiples bandas observadas presentan una distribución escalonada compatible con la presencia de multímeros de *TbSUMO*. Teniendo en cuenta estos resultados y, dado que en el parásito *T. cruzi* ha sido sugerida la modificación de dos lisinas internas de *TcSUMO* por su ortólogo en humanos SUMO1 (Annoura, Makiuchi et al. 2012), decidimos evaluar esta posibilidad empleando el sistema bacteriano desarrollado.

Para analizar la formación de cadenas de *TbSUMO* en el sistema, reemplazamos la versión silvestre del modificador, etiquetada en su extremo N-terminal con HA, por otra no SUMOilable, con todas sus lisinas reemplazadas por argininas (*TbSUMOK8R*)⁷. Esta versión no puede formar cadenas de *TbSUMO*, al carecer de lisinas internas modificables, pero conserva su capacidad de conjugarse a diversos sustratos al no alterarse su extremo C-terminal, con el motivo diglicina intacto. Esta nueva variante de *TbSUMO*, con el agregado de etiquetas de His y HA en su extremo N-terminal, fue clonada en el vector pCDFDuet-1-*TbE2*, en reemplazo de la versión original HA-*TbSUMO*, generando el vector pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMOK8R*. Este nuevo vector, de manera individual y en combinación con el vector pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b*, fue empleado para transformar bacterias *E. coli* que luego fueron inducidas y procesadas como fue descrito anteriormente. Los extractos solubles resultantes fueron nuevamente evaluados por Western blot empleando anticuerpos anti HA.

Como puede observarse en la Figura 50 B, el patrón de bandas observado por Western blot en el sistema original con HA-*TbSUMO* (Figura 50 A) se ve reducido significativamente cuando el sistema sólo posee esta nueva versión HisHA-*TbSUMOK8R*, no SUMOilable. Estos resultados estarían indicando entonces que *TbSUMO* posee la capacidad de formar cadenas.



⁷ Esta versión de *TbSUMO* es similar a la empleada en el Capítulo II pero, en este caso, carece de la mutación T106R y se encuentra procesada, exponiendo el motivo diglicina necesario para su conjugación en el extremo C-terminal.

Figura 50. Formación de cadenas de *TbSUMO*. (A) Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de extractos bacterianos solubles (70 μ l de cultivo) expresando los distintos componentes del sistema de SUMOilación de *T. brucei*: *TbE1a/TbE1b* (E1a/E1b), *TbE2/HA-TbSUMO* (E2/SUMO) y *TbE1a/TbE1b/TbE2/HA-TbSUMO* (Sistema completo). (B) Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de extractos bacterianos solubles (70 μ l de cultivo) expresando los distintos componentes del sistema de SUMOilación de *T. brucei* y la variante de *TbSUMO* deficiente en lisinas, no SUMOilable: *TbE1a/TbE1b* (E1a/E1b), *TbE2/HisHA-TbSUMOK8R* (E2/SUMO) y *TbE1a/TbE1b/TbE2/HisHA-TbSUMOK8R* (Sistema completo).

4.2 Modificación de un sustrato modelo empleando el sistema de SUMOilación de *T. brucei*

A continuación decidimos evaluar la actividad de las enzimas y el correcto funcionamiento de la maquinaria de SUMOilación en su conjunto sobre una proteína sustrato modelo. Para esto, decidimos utilizar como control una proteína cuya SUMOilación ha sido ampliamente estudiada incluso en ensayos *in vitro* heterólogos, como el antígeno de proliferación nuclear (proliferating cell nuclear antigen) de *Saccharomyces cerevisiae* (ScPCNA) (Colby, Matthai et al. 2006; Windecker and Ulrich 2008). Para esto, en paralelo al desarrollo de los dos vectores ya mencionados (pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* y pCDFDuet-1-*TbE2-TbSUMO*) se construyó un tercer vector, pET28, que permite la expresión de la proteína cuya SUMOilación se desea evaluar (componente variable del sistema) fusionada en su extremo C-terminal con una etiqueta de Flag repetida tres veces (3xFlag) (Figura 48). De esta manera, la expresión y eventual modificación de la proteína puede evaluarse de manera sencilla por Western blot empleando anticuerpos comerciales monoclonales de alta afinidad que reconocen de manera específica la etiqueta Flag. La secuencia codificante de ScPCNA fue amplificada por PCR a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae*, secuenciada y clonada en este vector de expresión que contiene un origen de replicación ColE1, un gen que confiere resistencia a kanamicina (Km^r) y el operón de expresión *lac*, permitiendo, al igual que los otros vectores componentes del sistema, su regulación con IPTG (pET28-ScPCNA). La correcta expresión y solubilidad de ScPCNA-3xFlag fue también evaluada por tinción con Coomassie Blue y Western blot (Figura 51), observándose una única banda reactiva del peso molecular esperado en ausencia de la maquinaria de SUMOilación.

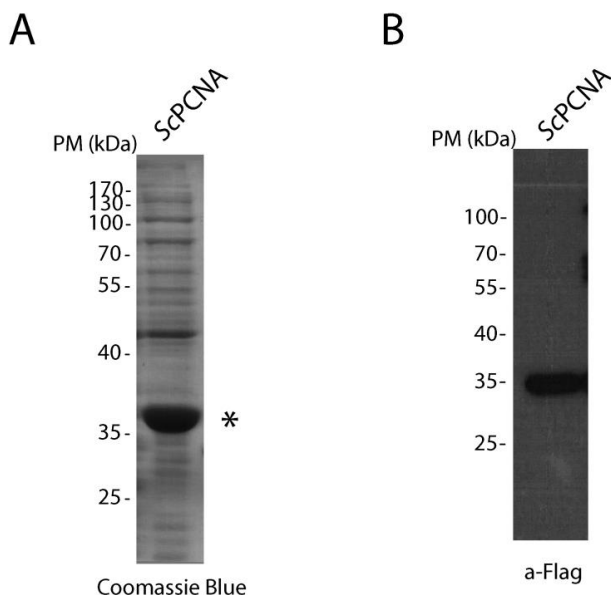


Figura 51. Evaluación de la expresión de ScPCNA en *E. coli*. (A) Análisis de la expresión de la proteína recombinante ScPCNA-3xFlag (31,9 kDa) por SDS-PAGE y tinción por Coomassie Blue. El extracto soluble de bacterias *E. coli* BL21 DE3 transformadas con el vector pET28-ScPCNA se observa tras la inducción con IPTG (3 μ l de cultivo). La banda correspondiente a la proteína recombinante se encuentra resaltada con un asterisco (*). (B) Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag de la muestra mencionada en (A) (3 μ l de cultivo).

Confirmada ya la expresión individual de todos los componentes necesarios para la SUMOilación (Figura 49) y del sustrato a evaluar (Figura 51) procedimos a co-expresarlos como fue descrito anteriormente en el sistema bacteriano, para evaluar la SUMOilación de la proteína blanco seleccionada por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag. Como se observa en la Figura 52, una única banda reactiva correspondiente al peso molecular esperado de ScPCNA es detectada cuando esta se expresa en presencia del sistema de SUMOilación de *T. brucei* incompleto (la proteína conjuntamente con *TbE2* y *TbSUMO* o *TbE1a* y *TbE1b*). Sin embargo, la expresión conjunta del sistema (*ScPCNA*, *TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b*) arroja un patrón de bandas adicionales de *ScPCNA* de mayor peso molecular, compatibles con bandas de SUMOilación. En particular se destacan dos bandas intensas con migración electroforética cercana al marcador de peso molecular de 55 kDa.

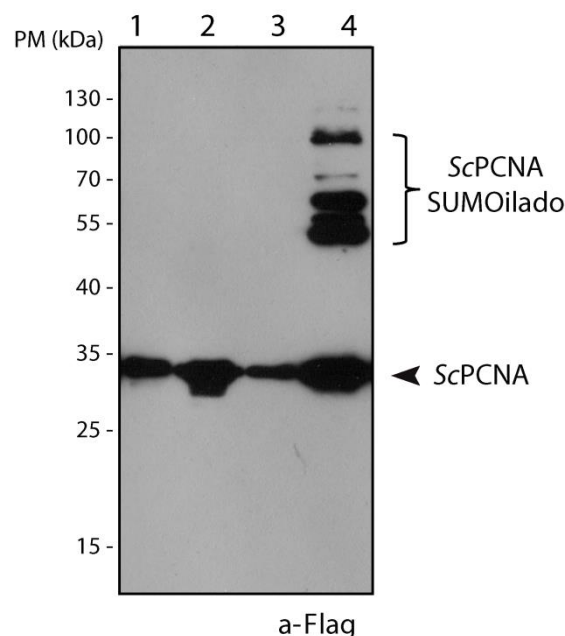


Figura 52. SUMOilación de un sustrato modelo: *ScPCNA*. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag de extractos bacterianos solubles expresando *ScPCNA* (Calle 1, 3 µl de cultivo), *ScPCNA*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 2, 30 µl de cultivo), *ScPCNA*, *TbE2* y *TbSUMO* (Calle 3, 30 µl de cultivo) y *ScPCNA* con el sistema completo de SUMOilación de *T. brucei*: *TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 4, 70 µl de cultivo).

La SUMOilación de *ScPCNA* ha sido parcialmente caracterizada *in vivo* e *in vitro* (Windecker and Ulrich 2008). En este sentido se conocen al menos tres sitios de SUMOilación en su secuencia: la lisina 127, la lisina 164 y una tercer lisina aún desconocida. El primero de los residuos mencionados, la lisina en posición 127, se encuentra formando parte de un sitio de SUMOilación canónico, Ψ KXE/D.

Para comparar el patrón de bandas obtenido para *ScPCNA* empleando nuestro sistema de SUMOilación de *T. brucei* con estas observaciones, decidimos mutar de manera individual los residuos previamente reportados como SUMOilados en la proteína. De esta manera, se construyeron mutantes puntuales de *ScPCNA* en las que se reemplazó, en forma independiente, la lisina en posición 127 o la lisina en posición 164 por arginina (mutantes *ScPCNAK127R* y

ScPCNAK164R). Estas construcciones fueron clonadas en el vector pET28 ya descrito, que permite su expresión con una etiqueta de 3xFlag en su extremo C-terminal.

De manera equivalente a lo desarrollado anteriormente (**Figura 52**), la proteína silvestre y las mutantes fueron expresadas en bacterias *E. coli* BL21 DE3 en presencia o ausencia del sistema de SUMOilación completo (*TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b*) y los extractos solubles obtenidos fueron evaluados de manera comparativa por Western blot empleando anticuerpos anti Flag (**Figura 53**).

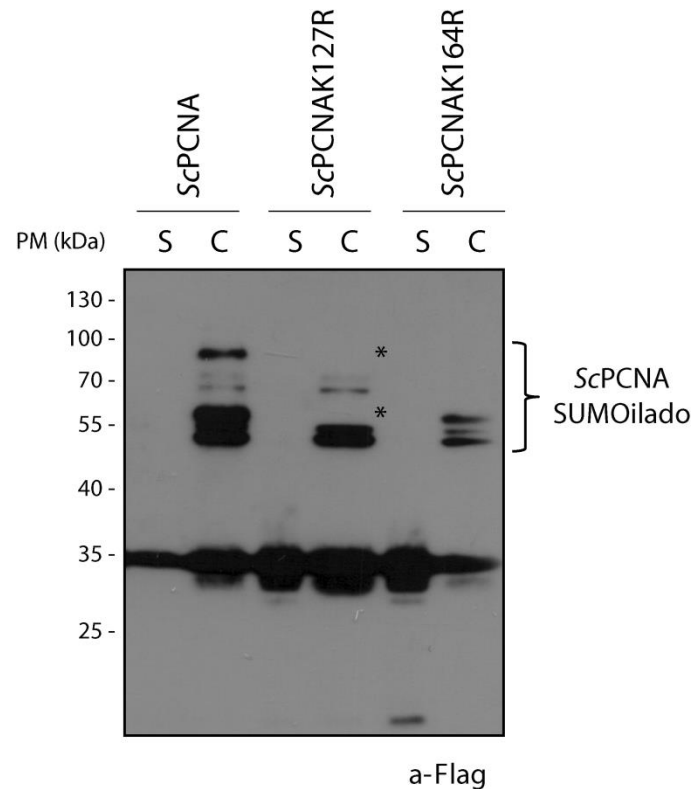


Figura 53. Análisis de mutantes puntuales de ScPCNA. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos monoclonales anti Flag de extractos bacterianos solubles expresando ScPCNA (Calles 1 y 2; 3 μ l y 70 μ l de cultivo, respectivamente), ScPCNAK127R (Calles 3 y 4; 3 μ l y 70 μ l de cultivo, respectivamente) y ScPCNAK164R (Calles 5 y 6; 3 μ l y 70 μ l de cultivo, respectivamente) en ausencia (S, proteína sola) o presencia del sistema de SUMOilación completo (C, *TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b*). Las bandas diferenciales se encuentran resaltadas con asteriscos (*).

Las tres variantes de ScPCNA analizadas se expresan correctamente de manera soluble, observándose una única banda del peso molecular esperado en todos los casos. El análisis por Western blot de la expresión de la mutante ScPCNAK127R en presencia de todos los componentes de la maquinaria de SUMOilación permite ver, en cambio, un patrón de bandas de alto peso molecular que difiere del observado inicialmente al emplear la versión silvestre de la proteína. Como puede visualizarse en la **Figura 52**, al emplear la **mutante K127R** es posible observar la **ausencia de una de las bandas mayoritarias** con migración cercana al marcador de peso molecular de 55 kDa; este hecho estaría indicando que esta banda, observada normalmente al expresar la proteína silvestre de manera conjunta con todos los componentes del sistema, puede adjudicarse a la **monoSUMOilación de ScPCNA en este residuo**. Las dos bandas tenues que se observan entre los marcadores de peso molecular de 55 kDa y 70 kDa en

la **Figura 53** y no se visualizan en la muestra correspondiente a la expresión de la mutante PCNAK164R en presencia del sistema completo de SUMOilación, pudieron ser detectadas en este caso tras tiempos de exposición más prolongados. Podemos concluir entonces que la expresión de la mutante ScPCNAK164R en el sistema completo, no altera la expresión de las tres bandas observadas de migración electroforética cercana a los 55 kDa por lo que ninguna de ellas puede ser asignada a la SUMOilación de ScPCNA en este residuo. De manera particular, en las dos mutantes analizadas se observa la desaparición de una **banda** con migración cercana al marcador de peso molecular de **100 kDa**, indicando que esta puede ser producto de la SUMOilación conjunta en ambos residuos (**multiSUMOilación**) y/o de la **poliSUMOilación** en alguno de ellos o en ambos.

Considerando estos resultados en conjunto es posible afirmar entonces que el **sistema de SUMOilación** desarrollado permite la **modificación por TbSUMO de ScPCNA** en algunas lisinas ya descritas, como la 127 y la 164. Las bandas observadas que no pueden adjudicarse a ninguno de estos sitios pueden ser resultado de la SUMOilación de ScPCNA en otras lisinas reportadas pero aún no identificadas.

Cabe destacar que la migración electroforética atípica de SUMO mencionada anteriormente, permite explicar como, en algunos casos, se observan bandas correspondientes a la monoSUMOilación en distintas lisinas de una proteína (con un mismo peso molecular teórico) con migración levemente diferencial en SDS-PAGE.

4.3 Estrategia para la validación de la modificación por TbSUMO: ensayos de deconjugación

La confirmación de la identidad de potenciales bandas de SUMOilación requiere el desarrollo de **herramientas de validación** que permitan **complementar** de manera sencilla la estrategia desarrollada, considerando los potenciales usos del sistema y los limitados conocimientos que en muchos casos se tiene en relación a la SUMOilación del sustrato que se quiere evaluar (sitios de SUMOilación no identificados, proteínas grandes con múltiples lisinas potencialmente modificables, etc.).

Teniendo en cuenta estos aspectos decidimos implementar de manera confirmatoria un **ensayo de deconjugación de TbSUMO** para validar de este modo la identidad de las potenciales bandas de SUMOilación obtenidas mediante el sistema de SUMOilación *in bacteria*, por reversión del efecto observado.

Para llevar esto a cabo, era necesario identificar, expresar de manera recombinante y evaluar la actividad de la **proteasa deconjugadora de TbSUMO** elegida para el desarrollo de este ensayo. Primeramente, como parte de la Tesis de licenciatura de María Agustina Berazategui, mediante análisis bioinformático, en base a las secuencias reportadas en levaduras y mamíferos, identificamos en el genoma del parásito un gen que codifica para una cisteín proteasa de la familia C48 con homología a la proteasa Ulp1 de levaduras y a las SENP 1,2,3 y 5 de humanos (Klein, Droll et al. 2013). Esta **proteasa TbSENP** conserva los residuos catalíticos Cys-His-Asp característicos de esta familia y, en otros organismos, es una de las encargadas de la deconjugación de SUMO de sus proteínas blanco así como del procesamiento del precursor de SUMO para dar lugar a su forma madura *in vivo*.

La secuencia codificante de esta proteasa fue amplificada por PCR a partir de ADN genómico de *T. brucei* y posteriormente clonada en un vector pBAD para su expresión inducible en bacterias, con una etiqueta de Glutatión S-transferasa (GST) en su extremo C-terminal para facilitar su purificación e identificación (Ver Anexo - Figura A6 A).

La **actividad peptidasa** (procesamiento del precursor de *TbSUMO*) e **isopeptidasa** (deconjugación de *TbSUMO* de sus sustratos) de la proteína recombinante fue confirmada mediante ensayos *in vitro* (Ver Anexo - Figura A6 B y C).

Dado que *TbSENP* recombinante conserva su actividad de deconjugación, decidimos entonces evaluar su actividad isopeptidasa ante ScPCNA, para confirmar de esta manera la identidad de las bandas de alto peso molecular observadas (Figura 52).

Para esto, realizamos la inducción del **sistema completo** (HA-*TbSUMO*, *TbE2*, *TbE1a* y *TbE1b*) en presencia de ScPCNA y los extractos solubles fueron posteriormente incubados 2 hs a 37°C con extractos obtenidos de manera equivalente conteniendo la **proteasa**.

Como puede observarse en la Figura 54, el tratamiento específico del sistema de SUMOilación/proteína blanco con *TbSENP* reduce drásticamente las bandas de ScPCNA de alto peso molecular observadas por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag. Este efecto se ve contrarrestado al realizar el ensayo en presencia del inhibidor de cisteín proteasas, NEM.

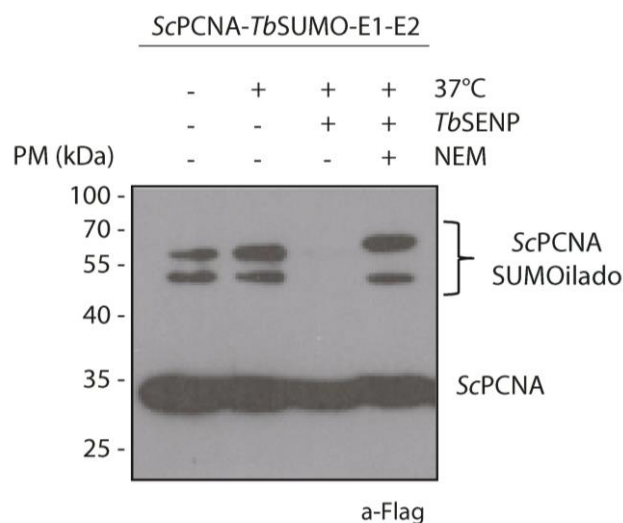


Figura 54. Ensayo de deconjugación. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag de extractos bacterianos solubles expresando ScPCNA y la maquinaria de SUMOilación de *T. brucei* en presencia o ausencia de incubación a 37 °C durante 2 hs con *TbSENP* y su inhibidor NEM.

En conjunto estos resultados sugieren que la **maquinaria de SUMOilación de *T. brucei*** expresada en el sistema bacteriano conserva su actividad, siendo capaz de SUMOilar proteínas blanco como ScPCNA. La adición de un **ensayo de deconjugación de *TbSUMO*** empleando la proteasa *TbSENP* constituye una herramienta sencilla para la confirmación de los resultados obtenidos.

4.4 Reconstitución del sistema de SUMOilación de *T. brucei* in bacteria: análisis de sustratos y potenciales aplicaciones

Una vez evaluada la funcionalidad del sistema empleando un sustrato modelo de SUMOilación como *ScPCNA*, decidimos evaluarlo sobre otras proteínas específicas de *T. brucei*, incluyendo algunas cuya modificación ha sido identificada *in vivo* o blancos potenciales que requieren validación.

Teniendo en cuenta estas consideraciones decidimos inicialmente evaluar el sistema de SUMOilación *in bacteria* sobre el ortólogo de *ScPCNA* en el parásito: *TbPCNA*. Esta proteína fue identificada como SUMOilada en los experimentos de proteómica ya descritos (Capítulo III), siendo la lisina en posición 201 el residuo modificado.

Para llevar a cabo el ensayo de SUMOilación, la secuencia codificante de la proteína fue amplificada por PCR a partir de ADN genómico de *T. brucei*, secuenciada y clonada en el vector pET28. Su versión etiquetada en el extremo C-terminal con 3xFlag fue expresada de manera conjunta con todos los componentes de la maquinaria de SUMOilación o con alguno de ellos a modo de control. La inducción de la co-expresión y el procesamiento de las muestras se realizó de manera equivalente a lo ya descrito. Los extractos solubles fueron analizados por Western blot empleando anticuerpos anti Flag (Figura 55).

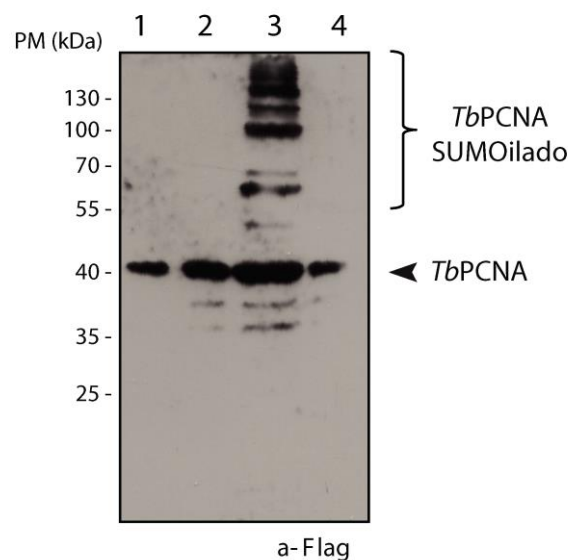


Figura 55. SUMOilación de *TbPCNA*. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag de extractos bacterianos solubles expresando *TbPCNA* (Calle 4, 3 µl de cultivo), *TbPCNA*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 1, 30 µl de cultivo), *TbPCNA*, *TbE2* y *TbSUMO* (Calle 2, 30 µl de cultivo) y *TbPCNA* con el sistema completo de SUMOilación de *T. brucei*: *TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 3, 70 µl de cultivo).

Al expresar *TbPCNA* en presencia de la maquinaria de SUMOilación la proteína se ve modificada, observándose bandas de menor movilidad electroforética compatibles con **bandas de SUMOilación**. Este patrón de bandas no se observa al expresar conjuntamente con *TbPCNA*

las subunidades de la enzima activadora o *TbE2* y *TbSUMO* de manera independiente. Estudios adicionales, incluyendo los ensayos de deconjugación con *TbSENP* y análisis de mutantes puntuales (por ejemplo, *TbPCNAK201R*) pueden realizarse para profundizar el estudio de la SUMOilación de este sustrato.

Dado que la SUMOilación de *TbPCNA* ha sido previamente confirmada *in vivo* en PC la visualización de esta modificación empleando las proteínas recombinantes *in bacteria* refuerza la validez del sistema desarrollado en el estudio de esta modificación post-traduccional.

De manera simultánea decidimos emplear el sistema para **validar potenciales sustratos de SUMOilación** previamente identificados por experimentos de proteómica en *T. brucei*. Para esto, elegimos el **factor activador de la transcripción 1** (*TbTAF1*), identificado con alta confianza por MS a partir de la purificación de conjugados de parásitos HisHA-*TbSUMO* D en BS (Capítulo I, Proteómica BS2). Esta proteína de localización nuclear presenta en su secuencia un motivo SNF, asociado a la accesibilidad de la cromatina en otros eucariotas, y se ha relacionado con la regulación de la expresión de antígenos de superficie en el parásito (VSG y prociclina) (trabajo presentado en Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting 2015; Saura, et al., http://hermes.mbl.edu/KMCB_book_2015.pdf).

Para realizar el análisis de este potencial sustrato el fragmento N-terminal y C-terminal de la proteína fueron clonados en el vector pET28 y expresados de manera independiente como fue descrito para *TbPCNA*, en presencia o ausencia de la maquinaria de SUMOilación completa o parcialmente reconstituida. Como puede visualizarse en el Western blot empleando anticuerpos anti Flag, en apariencia la proteína estaría siendo **SUMOilada** en uno o más residuos presentes **en el dominio N-terminal de la proteína**, visualizándose bandas de alto peso molecular ausentes en los controles expresando el sistema de SUMOilación incompleto (**Figura 56 A**). Esto no estaría ocurriendo en el extremo C-terminal de la proteína (**Figura 56 B**).

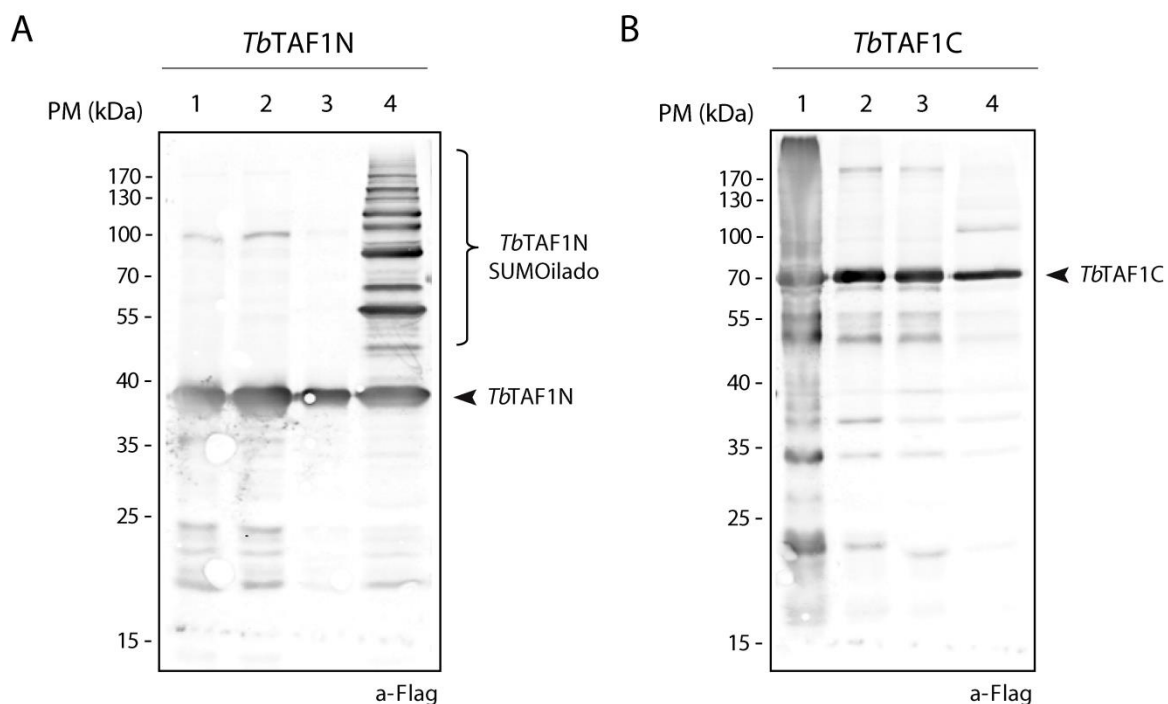


Figura 56. SUMOilación de *TbTAF1*. (A) Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag de extractos bacterianos solubles expresando el extremo N-terminal de *TbTAF1* (*TbTAF1N*) (Calle 1, 3 μ l de cultivo), *TbTAF1N*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 2, 30 μ l de cultivo), *TbTAF1N*, *TbE2* y *TbSUMO* (Calle 3, 30 μ l de cultivo) y *TbTAF1N* con el sistema completo de SUMOilación de *T. brucei*: *TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 4, 70 μ l de cultivo). (B) Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti Flag de extractos bacterianos solubles expresando el extremo C-terminal de *TbTAF1* (*TbTAF1C*) (Calle 1, 3 μ l de cultivo), *TbTAF1C*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 2, 30 μ l de cultivo), *TbTAF1C*, *TbE2* y *TbSUMO* (Calle 3, 30 μ l de cultivo) y *TbTAF1C* con el sistema completo de SUMOilación de *T. brucei*: *TbE2*, *TbSUMO*, *TbE1a* y *TbE1b* (Calle 4, 70 μ l de cultivo).

Actualmente, estamos realizando los ensayos de deconjugación empleando *TbSENP* para confirmar la identidad de las bandas observadas.

Para **identificar los residuos que están siendo modificados** en proteínas como *TbTAF1* o estudiar la modificación de nuevas lisinas en sustratos como *TbPCNA* sin tener que recurrir al tedioso desarrollo de mutantes puntuales, introdujimos algunas modificaciones en el sistema para poder estudiar esto de manera sencilla. De este modo introdujimos distintas versiones de *TbSUMO* en el vector pCDFDuet-1-*TbE2* para poder resolver esta cuestión:

- **HisHA-*TbSUMO*^{T106K}**: esta construcción permite purificar de manera sencilla y económica por cromatografía de afinidad a Ni⁺², el sustrato en estudio en su forma mono, multi y/o poliSUMOilada, pudiendo luego identificarse las lisinas modificadas por detección de péptidos firma por MS (Figura 41).
- **HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106K}**: variante no SUMOilable que permite la purificación por cromatografía de afinidad a Ni⁺² de formas mono o multiSUMOiladas de la proteína en estudio, reduciendo la complejidad de la muestra al eliminar la presencia de cadenas de *TbSUMO*. Las lisinas modificadas pueden determinarse nuevamente por identificación de péptidos firma por MS (Figura 41).

En paralelo, para **optimizar la purificación de conjugados**, como parte de la Tesis de licenciatura de Lucia Di Marzio, modificamos los vectores originales (pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* y pCDCDuet-1-*TbE2-TbSUMO*) eliminando la etiqueta de His en *TbE2* y *TbE1a*. De esta manera es posible mejorar la purificación de conjugados al eliminarse la copurificación de estas proteínas de alta expresión (Ver Figura 49 A). Como consecuencia, estos conjugados pueden ser obtenidos en altas concentraciones, necesarias para la identificación de sitios de SUMOilación por MS, generación de anticuerpos o para realizar estudios funcionales *in vitro* con la versión modificada.

Los vectores descriptos fueron evaluados de manera equivalente a lo realizado para sus formas originales, conjugándose todas las versiones de *TbSUMO* generadas satisfactoriamente a *ScPCNA*.

4.5 Conclusiones parciales

La expresión de la maquinaria de SUMOilación de *T. brucei* en *E. coli* ha permitido el desarrollo de una herramienta sencilla, versátil y económica para el estudio de sustratos de manera rápida. De manera complementaria, los ensayos de deconjugación de *TbSUMO* permiten confirmar los resultados obtenidos fácilmente, sin necesidad de purificar los componentes de manera individual.

El empleo de distintos vectores ha permitido además visualizar por primera vez la formación de cadenas de *TbSUMO*.

De manera conjunta, el análisis de los resultados hasta aquí obtenidos permite dar cuenta de la utilidad y potencialidad del sistema en cuanto a: i) la validación de sustratos de SUMOilación potenciales, identificados por proteómicas no sitio-específicas; ii) la identificación de nuevos sitios de SUMOilación; iii) la generación de proteínas SUMOiladas recombinantes para el desarrollo de estudios *in vitro* y/o generación de anticuerpos.

DISCUSIÓN

Herramientas para el estudio del sistema de SUMOilación

El efecto ejercido por SUMO sobre las proteínas que modifica no puede ser predicho *a priori*. Es por esto que las consecuencias de la unión de este modificador deben evaluarse de manera particular en cada sustrato.

El estudio de las **proteínas SUMOiladas** identificadas por proteómica en *T. brucei* ya descritas debe realizarse entonces considerando las características de cada sustrato y los procesos en los que participa, de modo tal de desarrollar estrategias de análisis adecuadas para la visualización del efecto producido por el modificador.

Esto puede desarrollarse básicamente mediante dos aproximaciones complementarias: estudios *in vivo* y estudios *in vitro*.

Para los **estudios *in vivo*** es posible expresar en el parásito mutantes no SUMOilables (reemplazando las lisinas identificadas por argininas) y evaluar el fenotipo resultante de manera comparativa con la versión silvestre SUMOilable. Estos ensayos pueden brindar información relevante en relación al proceso celular modulado por la proteína SUMOilada de interés, constituyendo la base fundamental para el desarrollo de estudios complementarios. Sin embargo, es frecuente observar en este tipo de aproximaciones la aparición de sitios crípticos de SUMOilación, es decir la SUMOilación de nuevas lisinas (normalmente no SUMOiladas o modificadas en baja proporción) para mantener la funcionalidad tras la mutación de los sitios canónicos (Jacobs, Nicol et al. 2007; Lee, Faivre et al. 2011; Rabellino, Carter et al. 2012).

En este contexto, la implementación de **estudios *in vitro*** permite complementar los resultados obtenidos de este modo, permitiendo incluso simplificar el abordaje de estudios *in vivo*. En particular, el desarrollo de un sistema de SUMOilación *in vitro* permite evaluar la aparición de sitios crípticos de manera más sencilla, brindando además nuevas herramientas para realizar otro tipo de estudios.

Los sistemas de **SUMOilación *in vitro*** convencionales involucran la expresión y purificación de los componentes recombinantes individuales, es decir, de las dos subunidades de la enzima activadora E1a y E1b, la enzima conjugadora E2, SUMO y la proteína sustrato a evaluar. Sin embargo, estos sistemas presentan varias desventajas: (i) son costosos y laboriosos, porque involucran la manipulación de grandes volúmenes de cultivo y varios pasos cromatográficos complejos; (ii) las enzimas purificadas tienen que almacenarse en condiciones específicas para conservar su actividad intacta y (iii) es necesario ajustar con cuidado las concentraciones de los diversos componentes para el desarrollo de un sistema óptimo.

Es por esto que, ante estas dificultades, surgieron nuevos enfoques que involucran la co-expresión de los distintos componentes de la **maquinaria de SUMOilación** en un mismo sistema bacteriano. El desarrollo de esta estrategia presenta numerosas **ventajas**: (i) es un sistema limpio [ya que al ser la SUMOilación exclusiva de eucariotas no hay interferencias con componentes bacterianos (Uchimura, Nakamura et al. 2004; Uchimura, Nakao et al. 2004)]; (ii) sencillo; (iii) rápido; (iv) versátil y (v) mucho más económico.

Teniendo en cuenta estas ventajas es que decidimos entonces desarrollar un sistema equivalente, específico para *T. brucei*.

Como fue descrito en este trabajo de Tesis fue posible desarrollar de manera exitosa un **sistema de SUMOilación específico de *T. brucei*** capaz de producir proteínas SUMOiladas, mediante la transferencia de un conjunto mínimo de enzimas a *E. coli*. Hemos logrado expresar de manera simultánea en vectores compatibles de la serie Duet, las dos subunidades de la enzima activadora *TbE1a* y *TbE1b*, la enzima conjugadora *TbE2* y la proteína *TbSUMO* en su forma procesada, es decir, exponiendo en su extremo C-terminal un motivo diglicina necesario para su conjugación. La expresión individual de las subunidades de la enzima activadora constituye una característica fundamental del sistema ya que la expresión de E1a-E1b como proteína de fusión ha demostrado tener menor actividad en humanos (Uchimura, Nakao et al. 2004). La proteína de interés cuya SUMOilación se quiere evaluar fue co-expresada en este mismo sistema empleando un vector, también compatible, pET28. La presencia de una etiqueta de 3xFlag en la proteína blanco en estudio permitió evaluar por Western blot de manera rápida y sencilla su SUMOilación en extractos bacterianos solubles, sin la necesidad de realizar pasos complejos de enriquecimiento. Además, la adición de etiquetas adicionales en el extremo N-terminal de *TbSUMO* hace factible la purificación del blanco modificado por afinidad en tándem. La versatilidad del sistema permite potencialmente combinar distintos principios de purificación por combinación de etiquetas diferentes; sin embargo estas deben ser elegidas cuidadosamente cuando estudios bioquímicos y/o estructurales son llevados a cabo. A modo de ejemplo podemos citar la SUMOilación, aunque en bajos niveles, de algunas etiquetas como GST (Okada, Nagabuchi et al. 2009; Weber, Schuermann et al. 2014).

La reconstitución del sistema permitió confirmar la **funcionalidad de *TbE1* y *TbE2***, proteínas previamente anotadas como enzimas putativas (Bayona, Nakayasu et al. 2011; Klein, Droll et al. 2013).

De manera adicional fue posible emplear otro componente regulador del sistema de SUMOilación del parásito, como la **proteasa *TbSENP***, ya caracterizada en el laboratorio (Tesis de licenciatura de María Agustina Berazategui, UNSAM). Esta enzima recombinante conserva su actividad isopeptidasa, característica utilizada para la confirmación de la SUMOilación de sustratos, por escisión del modificador de la proteína de interés.

En el desarrollo del sistema hemos elegido ***ScPCNA* como sustrato modelo**, proteína SUMOilada ampliamente estudiada (Ulrich 2013) y empleada como control heterólogo en otros sistemas de SUMOilación *in vitro* (Colby, Matthai et al. 2006).

En función de lo esperado, el patrón de SUMOilación de esta proteína tras su modificación empleando la maquinaria de SUMOilación de *T. brucei*, fue similar al obtenido *in vitro* con las enzimas del sistema de SUMOilación de *S. cerevisiae* (Windecker and Ulrich 2008).

De hecho, en este y otros sustratos evaluados hasta el momento (*TbPCNA* y *TbTAF1N*), es posible observar altos niveles de SUMOilación (cerca al 50%) de la proteína total expresada empleando este sistema. Este hecho contrasta con los pequeños niveles reportados generalmente para este tipo de modificaciones *in vivo* (SUMOilación de un 1-5% de la proteína total) e incluso en el sistema de SUMOilación *in vitro* desarrollado para *T. brucei* (Ye, Zhang et al. 2015), permitiendo además obtener eventualmente cantidad suficiente de las variantes modificadas de las proteínas para estudios estructurales y/o funcionales *in vitro*.

La aparente SUMOilación de *TbTAF1N* (sustrato identificado por espectrometría de masas a partir de la línea HisHA-*TbSUMO D* en BS; Proteómica BS2) (Figura 56) destaca también la utilidad del sistema para **validar potenciales sustratos de SUMOilación** identificados por proteómica no sitio-específica. Recientemente se ha reportado que esta proteína regularía positivamente la transcripción de la VSG activa y de manera inversa la transcripción de la prociclina en BS (trabajo presentado en Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting 2015; Saura, et al., http://hermes.mbl.edu/KMCB_book_2015.pdf).

Resulta importante destacar que los sustratos evaluados presentan mayoritariamente sitios canónicos de SUMOilación, favoreciendo esto la modificación de lisinas en ausencia de **E3 ligasas** específicas. Sin embargo, en ocasiones, grandes cantidades de enzima conjugadora, como la aquí reportada, pueden contrarrestar la ausencia de este componente; de hecho, la enzima E2 fusionada al sustrato a modificar suele emplearse en algunos casos para favorecer su SUMOilación (Weber, Schuermann et al. 2014). A pesar de este hecho, no hemos podido observar la modificación de las histonas identificadas como SUMOiladas por proteómica sitio específica (con sitios de SUMOilación no canónicos) empleando este sistema.

La recientemente identificada E3 ligasa de *TbSUMO*, *TbSIZ*, podría eventualmente incorporarse para su co-expresión en el sistema de manera sencilla (O'Brien and DeLisa 2012), empleando un cuarto vector de la serie: pETDuet-1, conteniendo el origen de replicación ColE1 y un gen que confiere resistencia a ampicilina (*bla*). Sin embargo es importante considerar que las E3 ligasas de SUMO poseen generalmente una especificidad de sustrato restringida y que su incorporación al sistema puede reducir significativamente la expresión de los demás componentes (Weber, Schuermann et al. 2014). En ocasiones, la fusión de SUMO y E2 ha permitido contrarrestar este problema (Kim, Kim et al. 2009).

Este sistema nos ha permitido evidenciar también la capacidad de *TbSUMO* de formar **multímeros**, observación ya sugerida por las reacciones *in vitro* de su ortólogo en *T. cruzi* (Annoura, Makiuchi et al. 2012). A diferencia de este último, *TbSUMO* carece de sitios consenso de SUMOilación por lo que mutaciones puntuales en distintas lisinas están siendo generadas para identificar él/los residuos involucrados en este proceso. Al igual que lo reportado en levaduras (Bylebyl, Belichenko et al. 2003), la formación de cadenas de *TbSUMO*, sin embargo, no pareciera ser un proceso esencial *in vivo* en *T. brucei*, a juzgar por los resultados presentados anteriormente con las líneas celulares HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} en PC y BS.

La evaluación de este hecho mediante la generación de la variante HisHA-*TbSUMOK8R* nos ha permitido confirmar simultáneamente la **especificidad del sistema**, dado que bajo estas condiciones en las que no hay formación de cadenas de *TbSUMO* en ausencia de un sustrato, no se observan por Western blot bandas adicionales SUMO-positivas, descartándose la modificación de proteínas bacterianas (Figura 50).

Como fue mencionado anteriormente, este sistema de SUMOilación *in bacteria* puede resultar de utilidad no sólo para evaluar sitios de SUMOilación en proteínas identificadas en experimentos de proteómica, sino también para generar y estudiar la modificación de mutantes no SUMOilables, tarea en ocasiones laboriosa *in vivo* por la aparición de sitios críticos de SUMOilación.

Para realizar esto e **identificar** nuevos potenciales **sitios de SUMOilación** hemos desarrollado y evaluado el sistema expresando distintas variantes de *TbSUMO*, que nos permitan identificar por espectrometría de masas aquellas lisinas modificadas en los sustratos de interés. Estas construcciones, HisHA-*TbSUMO*^{T106K} e HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106K}, permiten la generación, como fue descrito anteriormente, de péptidos firma característicos por agregado del motivo diglicina remanente de *TbSUMO* a la lisina modificada en el sustrato.

De manera general podemos decir que el sistema desarrollado constituye una **herramienta simple, rápida y económicamente conveniente**, en comparación con las reacciones *in vitro* convencionales utilizando enzimas disponibles comercialmente (de humanos o levaduras) o purificadas de manera individual (Uchimura, Nakamura et al. 2004; Okada, Nagabuchi et al. 2009; Werner, Moutty et al. 2009; Yunus and Lima 2009; Weber, Schuermann et al. 2014; Ye, Zhang et al. 2015).

Es importante destacar que este sistema ha sido específicamente diseñado para proteínas de tripanosomátidos y potencialmente puede evitar diferencias sutiles en la especificidad (es decir, el residuo lisina que se está modificando o la capacidad para formar cadenas) al utilizar enzimas provenientes de un organismos diferente.

En particular en nuestro modelo de estudio, el sistema desarrollado nos permitirá confirmar e identificar nuevos sitios de SUMOilación en aquellas proteínas identificadas por proteómica y analizar mutantes puntuales en dichos sitios.

En paralelo, nos proponemos estudiar el efecto de la SUMOilación de estas proteínas en los distintos estadios del parásito *in vivo*. Para esto desarrollaremos líneas celulares que expresen por etiquetado endógeno de genes la proteína de interés fusionada a etiquetas específicas, permitiendo al mismo tiempo la inducción de la maquinaria de ARNi contra la etiqueta y la complementación del sistema con variantes no SUMOilables. El desarrollo de estas líneas nos permitirá evaluar no sólo la viabilidad del parásito y la localización subcelular de estas variantes, sino también su asociación específica con regiones de la cromatina vinculadas a la expresión de antígenos de superficie por CHIP y su unión diferencial a interactores mediante purificación de complejos por inmutafinidad e identificación por espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Técnicas utilizadas para la Identificación global de proteínas SUMOiladas

1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo de parásitos

Los parásitos empleados, *T. brucei brucei* línea 427 y 29-13 (T7RNAPol NEO TetR HYG) (Wirtz, Leal et al. 1999) en su forma procíclica (PC) (Cross 1975) fueron cultivados a 28°C en medio SDM-79 (Gibco, Gaithersburg, MD, EE.UU.) (Brun and Schonenberger 1979) suplementado con 7,5 µg/ml de hemina y 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB) (Natocor, Córdoba, Argentina) inactivado por calor (45 minutos a 56°C).

Para el estudio del estadio sanguíneo (BS) se emplearon parásitos *T. brucei brucei* "Single Marker" (T7RNAPol TetR NEO) (Wirtz, Leal et al. 1999) y 90-13 (T7RNAPol NEO TetR HYG) (Wirtz, Leal et al. 1999) mantenidos de manera axénica a 37°C con 5% CO₂ en medio HMI-9 (Gibco) (Hirumi and Hirumi 1989) suplementado con 10% v/v de SFB inactivado por calor.

Las cepas 29-13, 90-13 y "Single Marker" fueron obsequios de G.A.M. Cross (Rockefeller University).

1.2 Construcción de plásmidos de expresión en *T. brucei*

Para el reemplazo de los alelos del gen de *TbSUMO* (Tb927.5.3210) utilizamos el vector de reemplazo pEnT6P - con marcador de resistencia a puromicina o higromicina -, derivado del vector pEnT5 (Kelly, Reed et al. 2007). A su vez, las siguientes construcciones fueron sintetizadas químicamente (GenScript):

1 - una variante HisHA-*TbSUMO*, conteniendo las secuencias codificantes de las etiquetas empleadas (8 residuos de histidina (His) -24pb- y el epítipo de hemaglutinina (HA) -27pb-), seguido de 249 pb del extremo 5' del marco abierto de lectura (ORF) de *TbSUMO*, el sitio de restricción *XhoI* y las primeras 250 pb del extremo 3' del 5'UTR de este gen.

2 - una variante HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}, basada en la construcción HisHA-*TbSUMO* original, pero con el reemplazo del extremo 5' del ORF de *TbSUMO* por el ORF completo modificado en el codón 106 (T→R) y con todas las lisinas reemplazadas por argininas, seguido de 200 pb del extremo 5' del 3'UTR de *TbSUMO*.

También se sintetizó una variante HisHA-*TbSUMO*^{T106R}, con un esquema equivalente al de la construcción anterior pero con el reemplazo del extremo 5' del ORF de *TbSUMO* por el ORF completo modificado en el codón 106 (T→R) y 200 pb del extremo 5' del 3'UTR de *TbSUMO*. Pese a que los resultados obtenidos a partir del uso de esta construcción no se encuentran plasmados en esta Tesis, el plásmido generado fue empleado posteriormente en el desarrollo del trabajo.

Estas construcciones fueron flanqueadas por las secuencias de corte reconocidas por las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*, utilizadas luego para su clonado en pEnT6. Los plásmidos pEnT6 conteniendo las construcciones mencionadas fueron finalmente linearizados con *XhoI* para la transfección de parásitos *T. brucei*.

Para generar la variante HisHA-*TbSUMO*^{T106K}, el plásmido conteniendo la construcción HisHA-*TbSUMO*^{T106R} se utilizó como templado para la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleótidos (Macrogen, Seoul, Korea): sentido 5'CCATGGACGAACACCACCAC, antisentido 5'GCTAGCTCACCCGCCCTTCTGCTC. El producto de amplificación, flanqueado por los sitios de corte *NcoI* y *NheI* fue clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y la identidad de la construcción fue confirmada por secuenciación (Macrogen). El inserto de interés fue liberado utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *NheI* (New England Biolabs) y subclonado a través de estos sitios en el vector inducible pLEW100v5, con marcador de resistencia a fleomicina. El plásmido resultante fue linearizado con *NotI* para la transfección de parásitos.

Para los experimentos de validación *in vivo* utilizamos el vector inducible por tetraciclina pRP (cedido por David Horn), con resistencia a blasticidina, modificado por adición de una secuencia específica que nos permitió unificar la estrategia de clonado. El fragmento sintetizado químicamente (GenScript) consistió en las secuencias de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *AvrII*, seguidas de las secuencias que codifican para el epítopo Flag repetido tres veces (con su respectivo codón de inicio ATG y sin codón de terminación de la traducción), las secuencias de corte para las enzimas de restricción *BglII* y *XbaI* y codones de terminación de la traducción en los tres marcos de lectura posibles. Este fragmento, flanqueado por los sitios de corte para las enzimas de restricción *HindIII* y *BclI*, fue clonado por estos sitios en el vector pRP original. Los ORF de 16 proteínas potencialmente SUMOiladas (**Tabla 1**), seleccionadas en base a los resultados de proteómica obtenidos a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMO* S de PC (**Tabla A2**) fueron luego amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos detallados en la **Tabla M1**. Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y subclonados en el vector pRP modificado (pRP-3xFlag). Como los pares de enzimas de restricción *BamHI/BglII* y *AvrII/XbaI* reconocen respectivamente secuencias de corte diferentes pero liberan los mismos extremos cohesivos, a partir de un mismo par de oligonucleótidos específicos para cada proteína blanco (conteniendo el oligonucleótido sentido el sitio de corte para *BamHI* o *BglII* y el antisentido el sitio de corte para *AvrII* o *XbaI*) es posible etiquetar la proteína en su extremo N o C-terminal en función de cómo se digiera el vector. En este caso, el vector pRP-3xFlag fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *AvrII* para etiquetar todas las proteínas evaluadas en su extremo C-terminal (considerando lo reportado en bibliografía para cada una de ellas). Las enzimas de restricción utilizadas para el clonado de cada una de las proteínas blanco se encuentran detalladas en la **Tabla M1**.

Identificación	Descripción	Enzimas de restricción	Oligonucleótidos Secuencia nucleotídica 5' - 3'
Tb927.10.13500	Proteína ribosomal 60S L10a	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCC ATGTCTAAGATCCCTC Antisentido GGCTCTAGA GTAGATACGCTGCG
Tb927.10.9880	Proteína ribosomal 60S L18	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCC ATGGGCGTAGACCTC Antisentido GGCTCTAGA CTTGTGACGGAAGG
Tb927.10.12680	Proteína ribosomal 60S L34	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCC ATG TCTTGCCCCCGTG Antisentido GGCTCTAGACTTCTTCAGCTTCG
Tb927.8.6160	Proteína ribosomal 40S S8	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGGGAATCGTTTCG Antisentido GGCTCTAGAACGCTTCTTCTTGTC
Tb927.9.5320	Proteína de unión a ARN nucleolar	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCC ATGAGTGGGGCC Antisentido GGCTCTAGACCTGAACCCACC
Tb927.4.3320	Uracil fosforibosil-transferasa	<i>Bgl</i> II/ <i>Xba</i> I	Sentido CGAAGATCTATGGCTCTACACGAC Antisentido GGCTCTAGATTCCGCATGTGCCGAAG
Tb927.9.15360	Proteína ribosomal 40S S6	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGAAGCTTAACATC Antisentido GGCTCTAGATTTCCGTGCCTTGAAG
Tb927.10.3520	Subunidad regulatoria ATPasa de proteasa	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGCAGGAACGTCAG Antisentido GGCTCTAGATTGCTCTGAGTATTG
Tb927.10.14930	Proteína 39 con dominio zinc finger CCCH	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGAACGATGCCGG Antisentido GGCTCTAGAACCACCACCTCGAG
Tb927.5.1610	Proteína ribosomal 60S L13a	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGGTTTTACCAAGC Antisentido GGCTCTAGACGCAAGACCAAATTC
Tb927.10.6810	Guanilato kinasa	<i>Bam</i> HI/ <i>Avr</i> II	Sentido GCGGGATCCATGTTGCCCCCTCC Antisentido GGTCTAGGCAACTTACTGCTCG
Tb927.6.4370	Subunidad 7-like del factor de inicio de la traducción eucariota 3	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGGCCTTTGTGTTAC Antisentido GGCTCTAGAACCGTCTTCCTCACC
Tb927.4.4070	Mevalonato kinasa	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGCACGTGGCTG Antisentido GGCTCTAGATAGCTTACTTCCGC
Tb11.02.1600	Proteína no caracterizada con dominio ubiquitin-like	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGCACATCAACGTC Antisentido GGCTCTAGACCTCCTCTCCAGTTG
Tb927.7.4480	Adenosina 5'-monofosforamidasa	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGTCCAACGTC Antisentido GGCTCTAGACAACCTTCTCGAGAGC
Tb05.5k5.150	Proteína pequeña de unión a GTP	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Sentido GCGGGATCCATGGGGCTGTTTTCG Antisentido GGCTCTAGAAGAATTTGAAGGTAC

Tabla M1. Validación de potenciales blancos de SUMOilación. Se detalla el código de identificación en GeneDB de las proteínas seleccionadas, junto con las enzimas empleadas en su clonado y los oligonucleótidos utilizados en cada caso para su amplificación por PCR.

1.3 Transfección de parásitos y generación de líneas celulares

Los plásmidos de interés fueron linearizados y precipitados con 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato de potasio, y 15 µg fueron utilizados para transfectar en forma independiente parásitos PC y/o BS de *T. brucei* según Cross (<http://tryps.rockefeller.edu/>), con pequeñas modificaciones.

Parásitos procíclicos

Parásitos en fase de crecimiento exponencial (6×10^6 parásitos/ml) fueron cosechados a temperatura ambiente (TA) por centrifugación (10 min a 1000 g), lavados con 10 ml de Cytomix (van den Hoff, Moorman et al. 1992) frío y finalmente resuspendidos en esta solución alcanzando una concentración final de 4×10^7 parásitos/ml. Posteriormente, 0,50 ml de parásitos fueron incubados con 10 μ l de ADN linearizado en una cubeta de electroporación de 0,2-cm (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.). La mezcla fue rápidamente sometida a dos pulsos de 1700 V y 25 μ F en un electroporador BTX Electro Square Porator ECM 830 y resuspendida en 10 ml de medio fresco.

La selección de transformantes estables se llevó a cabo empleando, según corresponda, 2 μ g/ml de puromicina (InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.), 25 μ g/ml de higromicina (InvivoGen), 1 μ g/ml de fleomicina (InvivoGen), 15 μ g/ml de G-418 (Sigma, Saint Louis, MO, EE.UU.) y/o 10 μ g/ml de blasticidina (InvivoGen).

En algunos casos, el clonado posterior se realizó por dilución límite en placas de 96 pocillos según especificaciones de Cross (<http://tryps.rockefeller.edu/>).

Brevemente, parásitos PC transfectados fueron diluidos a una concentración de 2 parásitos/ml en un volumen final de 20 ml de medio SDM-79 (suplementado con 10% SFB inactivado). El cultivo, en presencia de los antibióticos correspondientes, fue distribuido en alícuotas de 100 μ l en placas de 96 pocillos, sembrando aproximadamente 19 parásitos transgénicos por placa. Las placas fueron conservadas aproximadamente 10 días en estufa a 28°C hasta observar crecimiento de parásitos.

Para la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} la inducción se realizó con 5 μ g/ml de doxiciclina (Sigma) por 72 hs.

Parásitos sanguíneos

Parásitos en fase de crecimiento exponencial (1×10^6 parásitos/ml) fueron cosechados a TA por centrifugación (10 min a 1000 g) y resuspendidos en Cytomix (van den Hoff, Moorman et al. 1992) a temperatura ambiente alcanzando una concentración final de 4×10^7 parásitos/ml. Posteriormente, 0,50 ml de parásitos fueron mezclados con 10 μ l de ADN linearizado en una cubeta de electroporación de 0,2-cm (BTX Harvard Apparatus). La mezcla fue rápidamente sometida a un pulso de 1100 V y 25 μ F en un electroporador BTX Electro Square Porator ECM 830, incubada 10 min en hielo y transferida a una botella de cultivo con 5 ml de medio fresco. Tras 6 hs de incubación a 37°C, se realizó el clonado por dilución límite según especificaciones de Cross (<http://tryps.rockefeller.edu/>).

Brevemente, parásitos BS transfectados fueron diluidos a una concentración de 2×10^5 parásitos/ml en aproximadamente 25 ml de medio de cultivo con los antibióticos correspondientes. Posteriormente alícuotas de 1 ml fueron distribuidas en placas de 24 pocillos. Las placas fueron conservadas aproximadamente 7 días en estufa a 37°C con 5% CO₂ hasta observar crecimiento de parásitos.

La selección de transformantes estables se llevó a cabo empleando, según corresponda, 0,1 μ g/ml de puromicina (InvivoGen), 5 μ g/ml de higromicina (InvivoGen), 2,5 μ g/ml de fleomicina (InvivoGen) y/o 2,5 μ g/ml de G-418 (Sigma).

Para la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} la inducción se realizó con 5 μ g/ml de doxiciclina (Sigma) por 72 hs.

Las líneas celulares generadas en los distintos estadios del parásito se encuentran resumidas en la **Tabla M2**.

Nombre	Construcción	Parásitos	Características
Procíclicos			
HisHA- <i>TbSUMO</i> S PC	pEnT6P-HisHA- <i>TbSUMO</i>	<i>T. brucei brucei</i> 427 PC	Clon; reemplazo de 1 alelo de <i>TbSUMO</i>
HisHA- <i>TbSUMO</i> D PC	pEnT6H-HisHA- <i>TbSUMO</i>	Población sin clonar HisHA- <i>TbSUMO</i> S PC	Clon; reemplazo de los dos alelos de <i>TbSUMO</i> ; ausencia de <i>TbSUMO</i> endógeno
HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R} PC (S)	pEnT6P-HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R}	<i>T. brucei brucei</i> 427 PC	Población; reemplazo de 1 alelo de <i>TbSUMO</i>
HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R} PC (D)	pEnT6H-HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R}	HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R} PC (S)	Clon; reemplazo de los dos alelos de <i>TbSUMO</i> ; ausencia de <i>TbSUMO</i> endógeno
HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K} PC	pLew100v5-HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K}	<i>T. brucei brucei</i> 29:13 PC	Población; sobre-expresión inducible; inserción: región espaciadora del ARNr
HisHA- <i>TbSUMO</i> -pLew13 PC	pLew13	HisHA- <i>TbSUMO</i> S PC	Población; inserción: locus tubulina
pRP-Proteína blanco PC	pRP-Proteína blanco-3xFlag	HisHA- <i>TbSUMO</i> -pLew13 PC	Población; sobre-expresión inducible; inserción: región espaciadora del ARNr
Sanguíneos			
HisHA- <i>TbSUMO</i> S BS	pEnT6P-HisHA- <i>TbSUMO</i>	<i>T. brucei brucei</i> "Single Marker" BS	Clon; reemplazo de 1 alelo de <i>TbSUMO</i>
HisHA- <i>TbSUMO</i> D BS	pEnT6H-HisHA- <i>TbSUMO</i>	HisHA- <i>TbSUMO</i> S BS	Clon; reemplazo de los dos alelos de <i>TbSUMO</i> ; ausencia de <i>TbSUMO</i> endógeno
HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R} BS (S)	pEnT6P-HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R}	<i>T. brucei brucei</i> "Single Marker" BS	Clon; reemplazo de 1 alelo de <i>TbSUMO</i>
HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R} BS (D)	pEnT6H-HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R}	HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> ^{T106R} BS (S)	Clon; reemplazo de los dos alelos de <i>TbSUMO</i> ; ausencia de <i>TbSUMO</i> endógeno
HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K} BS	pLew100v5-HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K}	<i>T. brucei brucei</i> 90:13 BS	Clon; sobre-expresión inducible; inserción: región espaciadora del ARNr

Tabla M2. Generación de líneas celulares. Resumen de las líneas celulares generadas en los dos estadios replicativos del parásito, detallando la construcción empleada, los parásitos modificados y las características generales de la línea.

El desarrollo de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO* de BS se realizó en colaboración con el Dr. Miguel Navarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada, España), incluyendo una estancia de tres meses en su laboratorio (Noviembre 2012 - Febrero 2013).

1.4 Extracción de parásitos sanguíneos de sangre de ratas infectadas

Ratas adultas Wistar (preferentemente machos de por lo menos 250 g) fueron infectadas con 8×10^6 parásitos sanguíneos en fase de crecimiento exponencial (obtenidos a partir de cultivo axénico) por punción intraperitoneal en Trypanosome Dilution Buffer (TDB: 5 mM KCl, 80 mM NaCl, 1mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mM Na_2HPO_4 , 0,002 mM NaH_2PO_4) con 20 mM glucosa. La parasitemia fue evaluada diariamente hasta recuentos aproximados de 1×10^9 parásitos por ml de sangre, alcanzados generalmente al tercer o cuarto día post-infección. Los animales con alta parasitemia fueron inyectados con ketamina (70 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), y la sangre conteniendo los parásitos de interés (10-15 ml) fue extraída por punción cardíaca en jeringa heparinizada. Tras un paso de centrifugación de 10 min a 1400 g, se descartó el suero y se extrajo cuidadosamente la fracción blanquecina, rica en glóbulos blancos y parásitos, formada sobre la capa inferior de glóbulos rojos. Esta fracción fue resuspendida en aproximadamente 50 ml buffer SBG (44 mM NaCl, 57 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , 5 mM glucosa), que favorece la lisis de los glóbulos blancos presentes en la muestra. Los glóbulos rojos remanentes fueron retenidos empleando una columna de DEAE-celulosa (10-15 ml de resina cada 20-30 ml de sangre). Las muestras resultantes ricas en los parásitos sanguíneos de interés fueron centrifugadas nuevamente 10 min a 1400 g. Los parásitos colectados fueron almacenados a $-80^\circ C$ hasta su uso para la purificación de conjugados.

1.5 Extracción de ADN genómico de parásitos y confirmación del reemplazo de *TbSUMO*

Alrededor de 6×10^7 - 1×10^8 parásitos silvestres y de las distintas líneas celulares generadas fueron cosechados por centrifugación (10 min a 2000 rpm) y lavados dos veces con PBS (0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 8 g/l NaCl y 1,15 g/l Na_2HPO_4). La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el reactivo DNAzol, siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Para confirmar el reemplazo de los alelos de *TbSUMO* en las distintas líneas celulares se empleó la técnica de PCR a partir del ADN genómico extraído, empleando los oligonucleótidos detallados en la **Tabla M3**.

Nombre	Secuencia nucleotídica 5' - 3'
Up <i>Tb</i> SUMO fwd	GTGACTCGTTTGTACCTCAC
Puromicina rev	CGTGGGCTTGTACTCGGTC
Higromicina rev	GCCTATTCCTTTGCCCTCGG
HisHA fwd	CCACTACCCATACGATGTGC
5'UTR <i>Tb</i> SUMO fwd	GAGTTGGGTTTCATTTCTGAGCC
3'UTR <i>Tb</i> SUMO rev	AGTTGTGATGGACGAAGCAG

Tabla M3. Oligonucleótidos empleados para el análisis de líneas celulares. Resumen de los oligonucleótidos empleados para evaluar el correcto reemplazo de los alelos de *Tb*SUMO en el genoma de los parásitos y la identidad de los transgenes por secuenciación.

1.6 Análisis de crecimiento en cultivo

Las curvas de crecimiento fueron obtenidas por recuento diario de parásitos en cultivo, en presencia de los antibióticos correspondientes, por cuadruplicado en cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico de campo claro (x400).

1.7 Inmunofluorescencia indirecta

Parásitos procíclicos

Parásitos PC fueron cosechados por centrifugación (10 min a 2000 rpm), lavados dos veces con 500 µl de PBS y fijados 30 min a temperatura ambiente con 4% paraformaldehído (PAF) (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) en PBS. Tras otros dos lavados con 500 µl de PBS, los parásitos fueron adheridos a cubreobjetos de vidrio previamente tratados con poli-lisina (Sigma) e incubados durante 30 min con 25 mM NH₄Cl (Sigma). La permeabilización y bloqueo se llevó a cabo con una solución 2% seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), 2% suero normal de cabra y 0,1% saponina (Sigma) en PBS durante 30 min. Posteriormente las muestras fueron incubadas en cámara húmeda durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en una solución 2% BSA (Sigma) y 0,1% saponina (Sigma) en PBS. Tras 3 lavados con abundante PBS los cubreobjetos fueron incubados en cámara húmeda por 1 h en oscuridad con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido en una solución 2% BSA (Sigma) y 0,1% saponina (Sigma) en PBS. Finalmente los preparados fueron lavados nuevamente en abundante PBS y montados en portaobjetos utilizando FluorSave (Merck, Darmstadt, Alemania) conteniendo 5 mg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Life Technologies).

Las imágenes fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 y capturadas con una cámara digital Deporte RT deslizante (modelo 2.3.1 Instrumentos -reactivos para diagnóstico, Sterling Heights, MI, EE.UU.).

Parásitos sanguíneos

Parásitos BS fueron cosechados por centrifugación (10 min a 1500 rpm) y lavados con 500 µl de buffer TDB con 20 mM glucosa. La fijación se llevó a cabo con PAF (BioRad) 4% en TDB durante

10 min. Tras dos lavados con 500 μ l de TDB, los parásitos fueron adheridos a cubreobjetos de vidrio previamente tratados con poli-lisina (Sigma). La permeabilización se realizó por 30 seg empleando una solución 0,3% Triton-X100 en PBS y el bloqueo se llevó a cabo con una solución 50 mM NH_4Cl (Sigma), 3% BSA (Sigma), 5% suero normal de cabra y 1% gelatina de pescado (Sigma) por 30 min. Las muestras fueron incubadas en cámara húmeda por 1 h con el anticuerpo primario, diluido en PBS con 1% BSA (Sigma). Tras 3 lavados con abundante PBS los cubreobjetos fueron incubados nuevamente en cámara húmeda por 1 h en oscuridad con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido en PBS con 1% BSA (Sigma). Finalmente los preparados fueron lavados en abundante PBS y montados en portaobjetos utilizando FluorSave (Merck) conteniendo 5 mg/ml DAPI (Life Technologies).

Las imágenes fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 y capturadas con una cámara digital Deporte RT deslizante (modelo 2.3.1 Instrumentos -reactivos para diagnóstico, Sterling Heights, MI, EE.UU.).

La **Tabla M4** resume los anticuerpos y diluciones empleados en cada caso.

	Anticuerpo	Animal	Dilución
Anticuerpos primarios	anti HA monoclonal -high affinity 3F10 (Roche)	Rata	1:500
	anti <i>Tb</i> SUMO monoclonal (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014)	Ratón	1:500
	anti Flag M2 monoclonal (Sigma)	Ratón	1:1000
	anti <i>Tc</i> SUMO (Bayona, Nakayasu et al. 2011)	Ratón	1:500
Anticuerpos secundarios	anti Rata Alexa Fluor 488 (Life Technologies)	Cabra	1:1000
	anti Ratón Alexa Fluor 488 (Life Technologies)	Cabra	1:1000
	anti Rata Rhodamina (Roche)	Cabra	1:1000
	anti Ratón Alexa Fluor 546 (Life Technologies)	Cabra	1:1000

Tabla M4. Anticuerpos empleados para inmunofluorescencia indirecta. Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y las diluciones empleadas en inmunofluorescencia indirecta.

1.8 Análisis de estabilidad de conjugados a *Tb*SUMO y preparación de lisados totales de células

Parásitos HisHA-*Tb*SUMO PC fueron colectados por centrifugación, 10 min a 3000 rpm. Para evaluar la estabilidad de los conjugados a *Tb*SUMO una fracción de los parásitos fue resuspendida inmediatamente en buffer Laemmli con 100 mM DTT y hervida durante 5 min, mientras que las otras fracciones se resuspendieron a una concentración final de 1×10^6 parásitos/ μ l en buffer 1 (6 M de urea, 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl - pH 7,6) o PBS y se incubaron durante 20 min a TA. Todas las fracciones se resuspendieron luego en buffer Laemmli y se hirvieron durante 5 min.

Para la obtención de lisados totales de células los parásitos colectados por centrifugación fueron resuspendidos rápidamente en buffer Laemmli con 100 mM DTT y hervidos durante 5 min. Todas las muestras se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron por Western blot.

1.9 Purificación de proteínas y péptidos SUMOilados

Aproximadamente 1×10^{10} parásitos⁸ PC o BS de los clones seleccionados fueron colectados por centrifugación y lavados una vez en PBS (PC) o TDB (BS) suplementado con 20 mM NEM (Sigma). Las células fueron rápidamente resuspendidas en un buffer de lisis (6 M de urea, 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 5 mM β mercaptoetanol - pH 7,5) a una concentración de $\sim 3 \times 10^6$ parásitos/ μ l y sonicadas hasta pérdida de viscosidad. Los extractos fueron clarificados por centrifugación (30 min a 23000 g) y los sobrenadantes, con la adición de imidazol en una concentración final de 20 mM, se incubaron con 2,5 ml de resina Ni⁺² Sepharosa (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EE.UU.), pre-equilibrada en buffer de lisis, con agitación a TA durante 1:30 hs. Tras la centrifugación durante 10 min a 4500 g, la resina fue lavada 3 veces con 12 ml de buffer 1 (6 M de urea, 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 20 mM imidazol - pH 7,5) y luego otras 7 veces con 12 ml de buffer 2 (6 M de urea, 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 30 mM imidazol - pH 7,5). En cada lavado la resina fue incubada 3 min con agitación a TA y centrifugada durante 3 min a 4500 g. Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con buffer 3 (6 M de urea, 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 1 M imidazol - pH 7,5), colectándose, en la mayoría de los casos, tres fracciones de 1 volumen de resina. En cada etapa de elución, la resina fue incubada 5 min con agitación a TA y luego centrifugada 5 min a 4500 g.

Para los ensayos de validación de potenciales sustratos de SUMOilación se realizó un protocolo equivalente a partir de aproximadamente 1×10^9 parásitos PC de las líneas celulares que expresan el blanco a evaluar. La purificación de sustratos empleando la resina anti Flag M2-agarosa (Sigma) se realizó como se describe a continuación para la purificación por afinidad a la resina anti HA, a partir de 1×10^9 parásitos HisHA-*TbSUMO* S-pRP-Sustrato-3xFlag PC resuspendidos en buffer de lisis con 25 mM NEM (Sigma), en ausencia de urea.

En los casos en los que un segundo paso de purificación por afinidad utilizando resina anti HA fue requerido (líneas celulares HisHA-*TbSUMO*), los eluidos de la resina de Ni⁺² fueron diluidos en buffer 4 (0,5% NP-40, 50 mM Tris HCl, NaCl para una concentración final de 150 mM - pH 7,5) para reducir la concentración final de urea a 0,8 M (compatible con la resina a emplear). La muestra fue luego incubada con 350 μ l de resina anti HA (anti-HA Affinity Matrix, Roche), pre-equilibrada en buffer 5 (0,5% NP-40, 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl - pH 7,5), con agitación a 4°C durante 1 h. Tras la centrifugación durante 10 min a 4500 g, la resina fue lavada 4 veces con 6 ml de buffer 5. En cada paso de lavado la resina se incubó 3 min con agitación a 4°C y fue centrifugada durante 3 minutos a 4500 g a 4°C. Las proteínas fueron eluidas con buffer 6 (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% dodecilsulfato de sodio (SDS) - pH 7,5) tras una incubación de 15 min con agitación a TA. Las muestras fueron luego hervidas 5 min y centrifugadas durante 10 min a 4500 g.

En las muestras provenientes de las líneas celulares HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R}, para realizar la digestión con la endoproteasa Lys-C, el exceso de urea e imidazol de los eluidos obtenidos de la purificación por cromatografía de afinidad a Ni⁺² fue removido empleando una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare) y aproximadamente 70 μ g de proteína [cuantificados por el método de ácido bicinonónico, BCA (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.)] fueron incubados con 0,7 μ g de Lys-C por 24 h a 37°C. Los péptidos unidos covalentemente a HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} fueron

⁸ La cantidad de parásitos colectada en cada purificación se encuentra detallada en la sección correspondiente de Resultados.

purificados nuevamente por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ como se describió previamente, pero sin agentes desnaturalizantes.

Las proteínas y péptidos obtenidos en estos casos se concentraron por precipitación con acetona (80% v/v) y se almacenaron a -80°C por 48 hs. Las muestras fueron luego centrifugadas 30 min a alta velocidad y lavadas con acetona fría para su posterior procesamiento por MS.

La digestión con Lys-C de los eluidos provenientes de la purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*^{T106K} fue realizada como ya fue reportado por *Tammsalu et al* (Tammsalu, Matic et al. 2014).

Brevemente, las muestras se concentraron en unidades de filtración de 30 kDa (Sartorius, Göttingen, Alemania), fueron lavadas dos veces con buffer UA (200 ml - 8 M urea, 100 mM Tris HCl -pH 7,5) y finalmente incubadas con 50 mM cloroacetamida en buffer UA durante 20 min en oscuridad. Las muestras fueron luego lavadas dos veces con buffer UA, tres veces con 200 ml de buffer de inmunoprecipitación (IP) (50mM Mops-NaOH pH 7,2, 10 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl), y digeridas durante 16 hs con Lys-C (Wako, Richmond, VA, EE.UU.) en 50 ml de buffer IP a 37°C (relación enzima-proteína 1:100). Los péptidos resultantes fueron colectados y los filtros se lavaron con 50 ml de buffer IP para aumentar el rendimiento. Los péptidos retenidos en el filtro fueron digeridos posteriormente en algunos casos con la endoproteinasa Glu-C durante 16 hs en 50 ml de buffer IP a 20°C (relación enzima-proteína 1: 100), colectados y nuevamente los filtros se lavaron con 50 ml de buffer IP. Los péptidos firma generados fueron purificados empleando anticuerpos anti K-ε-GG conjugados a proteína A (PTMScan, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.). La mezcla de péptidos generada fue incubada con los anticuerpos unidos a proteína A ya mencionados en buffer IP a 4°C en agitación, toda la noche. Las muestras fueron lavadas dos veces con 500 ml de PBS, y los péptidos fueron colectados en dos eluidos de 50 µl con 0,1% ácido trifluoroacético (TCA).

En todos los casos fracciones proteicas fueron colectadas en los distintos pasos de purificación y resuspendidas en buffer Laemmli con 100 mM DTT para su posterior análisis por Western blot.

1.10 Identificación de proteínas purificadas

Proteómicas: HisHA-*TbSUMO*

De manera general, las muestras de proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 50 µl de buffer 400 mM NH₄HCO₃ conteniendo 8 M urea y reducidas con 5 mM DTT por 15 min a 50°C. Los grupos tioles reducidos fueron luego alquilados con 10 mM iodoacetamida (IAA) por 15 min a TA en oscuridad. Cada muestra fue luego diluída 8 veces en agua grado HPLC y las proteínas y/ péptidos presentes fueron incubados 18 hs a 37°C con 6 µg de tripsina grado secuenciación (Sigma). La reacción fue detenida con 10 µl de ácido fórmico (FA), la muestra fue desalada empleando una columna C18 (SPE C18 1 ml 100 mg Spelco, Sigma) y el eluido se llevó a sequedad por centrifugación al vacío. La mezcla de péptidos fue resuspendida en 50 µl 0,1% FA y 20 µl (20 µg de proteína) fueron utilizados para un análisis de 2D-LC MS/MS, empleando un equipamiento Eksigent 1D-plus nanoLC acoplado a LTQ XL/ETD-MS (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.) y equipado en el frente con TriVersa NanoMate electrospray ionization nano-source (Advion, Ithaca, NY, EE.UU.). La muestra fue cargada en una columna de intercambio iónico (SCX 5 µl, Opti-Pak, Optimized Technologies, Oregon City, OR, EE.UU.) y eluida en 6 fracciones de 20 µl con concentraciones crecientes de NaCl (0, 25, 50, 100, 200 y

500 mM en 5% acetonitrilo (ACN)/0,5% FA). Cada fracción fue analizada de manera independiente. Los péptidos eluidos fueron retenidos en una columna de capilaridad de fase reversa C18 (1 cm, 75 μ m, Phenomenex Luna C18, 5 μ m) y lavados con una solución 5% ACN/0,5% FA durante 130 min a 1,5 μ l/min. La separación se realizó en una columna de capilaridad de fase reversa C18 (20 cm, 75 μ m, Phenomenex Luna C18, 5 μ m) con un gradiente lineal (Solvente A: 5% ACN/0,1% FA; Solvente B: 80% ACN/0,1% FA): 5-40% B en 200 min, 50-90% B en 1 min, B en 5 min, 90-5% B en 1 min y 5% B en 20 min. Los péptidos fueron analizados a medida que eluían de la columna por un espectrómetro de masas conectado en línea (LTQ XL/ETD, Thermo Fischer Scientific). El equipo fue ajustado para realizar un barrido completo (400-2000 relación masa/carga (m/z) range) seguido de una identificación MS/MS de los 10 iones parentales más abundantes (ancho de aislamiento = 3,0 m/z; 35% de energía de colisión normalizada). La dinámica de exclusión fue ajustada para coleccionar dos veces cada ion parental y excluirlos seguidamente por 30 segundos.

Los datos coleccionados del espectro MS/MS (800-3500 Da, 10 cuentas mínimas y 15 iones) fueron convertidos en archivos tipo DTA. Los péptidos fueron identificados utilizando el programa SEQUEST (disponible en Bioworks v3.3.1, Thermo Fischer Scientific) contra la base de datos de GenBank de secuencia directa y reversa de *T. brucei brucei*, *Bos taurus*, queratina humana y tripsina bovina sometidas a una digestión triptica teórica. Los parámetros de búsqueda en base de datos fueron: (i) tolerancia de masa de fragmento y de péptido 2,0 y 1,0 Da, respectivamente; (ii) digestión por tripsina en ambos extremos, con tolerancia de un extremo no digerido; (iii) oxidación de metionina y carbamidometilación como modificaciones variables y fijas, respectivamente. Los resultados fueron filtrados empleando el programa Bioworks 3.3.1, con una correlación delta (dCN) \geq 0,05, una probabilidad de péptido \leq 0,05 y una correlación cruzada (Xcorr) \geq 1,5, 2,0 y 2,5 para péptidos con carga +1, +2 y +3, respectivamente. Las secuencias de péptidos fueron ensambladas en secuencias de proteínas y aquellas redundantes fueron agrupadas mediante Perl script. Los resultados fueron filtrados con los siguientes parámetros: suma de péptidos Xcorr \geq 6, al menos dos péptidos únicos y probabilidad de proteína \leq 1×10^{-3} , arrojando una probabilidad de falso positivo (FDR) para la identificación de proteínas de 0,7%. El análisis cuantitativo de la cantidad relativa de proteína se realizó considerando las cuentas espectrales, aplicando un análisis estadístico utilizando el programa Qspec. Se consideraron como potenciales proteínas SUMOizadas aquellas con FDR Qspec \leq 0,01 y, en los casos que corresponda, al menos dos veces mayor abundancia en la muestra respecto del control.

- El procesamiento de las muestras y el análisis estadístico de la mayor parte de los resultados fue realizado por el Dr. Igor Almeida y la Dra. Emma Arigi, en la University of Texas at El Paso y el Dr. Santiago Carmona, en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo A. Ugalde” (IIB-INTECH-CONICET-UNSAM).
- El procesamiento de las muestras obtenidas a partir de la línea celular HisHA-TbSUMO D del estadio BS fue realizado de manera similar a lo descrito, por el Dr. Enrique Calvo, en la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, España. En este caso se empleó un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL ETDTM (Thermo Fisher Scientific).
- El procesamiento de las muestras obtenidas a partir de la línea celular HisHA-TbSUMO D del estadio PC fue realizado por el servicio ITSI-Biosciences, Pennsylvania, Estados Unidos.

Proteómicas: HisHA-TbSUMOK8R^{T106R}

El procesamiento de las muestras obtenidas a partir de las líneas celulares HisHA-TbSUMOK8R^{T106R} del estadio PC y BS fue realizado por el servicio ITSI-Biosciences, Pennsylvania, Estados Unidos, empleando un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL ETDTM (Thermo Fisher Scientific). En el análisis de las muestras la adición de motivos diglicina en residuos de lisina fue considerada una modificación variable.

Proteómicas: HisHA-TbSUMO^{T106K}

Para la identificación de péptidos firma a partir de las líneas celulares HisHA-TbSUMO^{T106K} las muestras conteniendo los péptidos fueron desaladas empleando una columna de fase reversa C18 (Empore, South Eagan, MN, EE.UU.) Stop and Go - Tip de Extracción (Rappsilber, Mann et al. 2007) y luego analizadas por cromatografía líquida en tándem con MS en un espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un sistema de cromatografía líquida EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) a través de una fuente de ionización EASY-Spray (Thermo Fisher Scientific).

Los péptidos purificados fueron cargados en una columna 75 mm × 500 mm EASY-Spray (Thermo Fisher Scientific) a una presión máxima de 800 bar y eluidos en 90 a 150 min mediante un gradiente lineal de 5-22% de B (100% ACN/0,1% FA) en A (0,1% FA), seguido de una rampa de 40% B. La tasa de flujo se fijó a 250 nl/min y los péptidos eluidos fueron inyectados en línea en el espectrómetro de masas.

La adquisición de datos óptima para las muestras conteniendo los péptidos firma fue alcanzada con los siguientes parámetros: barrido completo (300-1600 m/z range) con resolución de 70000 para m/z de 400 (valor objetivo de 1000000 de iones, tiempo de inyección máximo de 20 ms). Los espectros MS2 fueron adquiridos con una resolución de 35000 para m/z de 400 (valor objetivo de 500000 iones, tiempo de inyección máximo de 1000 ms). Los iones sin carga asignada, monocargados o multicargados (> 8) no fueron analizados. El umbral de intensidad se fijó en $2,1 \times 10^4$ U. La dinámica de exclusión fue ajustada para coleccionar dos veces cada ion parental y excluirlos seguidamente por 40 segundos.

Los datos coleccionados fueron procesados empleando el programa MaxQuant (versión 1.3.0.5) (Cox and Mann 2008; Cox, Neuhauser et al. 2011) contra la base de datos de GenBank de secuencia directas y reversas de *T. brucei brucei*, *Bos taurus*, keratina humana y tripsina bovina sometidas a una digestión teórica con Lys-C o con Lys-C y Glu-C en los casos en los que fue necesario emplear también esta enzima. Un máximo de tolerancia de tres y cinco cortes fallidos fue permitido para digestiones con Lys-C y Lys-C/Glu-C, respectivamente. La carbamidometilación de cisteínas fue considerada una modificación fija mientras que la oxidación de metioninas, la acetilación de extremos N-terminales, la fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas y la adición de motivos diglicina en lisinas (a excepción de extremos C-terminales) fueron consideradas modificaciones variables. La mínima longitud de péptidos analizados fue ajustada a 7 aminoácidos y la masa máxima de péptidos a 10000 Da. En todos los casos se empleó un FDR $\leq 1\%$, con una desviación de masa de hasta 6 partes por millón (ppm) y 0,5 Da para los picos MS2. Los espectros MS2 de péptidos SUMOilados fueron validados manualmente y anotados empleando sistema MaxQuant (Neuhauser, Michalski et al. 2012) siguiendo los siguientes criterios: (i) buena cobertura de los iones de la serie y y b; (ii) buena identificación de picos de alta intensidad; (iii) error de masa inferior a 2 ppm después de recalibración de masa o 4 ppm en caso de recalibración fallida; (iv) fragmentación preferencial

con prolina en el extremo N-terminal o con ácido glutámico y ácido aspártico en el extremo C-terminal. Todos los péptidos identificados en la base de datos control, generada con las secuencias reversas, fueron eliminados y la probabilidad de localización de sitios fue mayor al 75 %. La identificación de picos diagnósticos correspondientes a un motivo diglicina (GG+, m/z +115.0505 Th), la identificación de una serie de iones con pérdidas de masa neutrales equivalentes a una glicina (m/z 57.0215 Th) o la identificación de varios péptidos modificados correspondientes a un mismo sitio de SUMOilación contribuyeron a la confianza asignada a cada sitio identificado.

- El procesamiento de las muestras y el análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de las líneas celulares HisHA-*TbSUMO*^{T106K} fue realizado por el Dr. Ron Hay y Triin Tammsalu en el Centre for Gene Regulation and Expression, Universidad de Dundee, Dundee, Escocia.

1.11 Análisis bioinformático de sitios de SUMOilación

El análisis de las secuencias correspondientes a los sitios de SUMOilación identificados a partir de la línea celular HisHA-*TbSUMO*^{T106K} PC fue realizado mediante el programa pLogo (O'Shea, Chou et al. 2013). El tamaño de los residuos graficados fue relativizado en función de su significancia estadística corregida por Bonferroni, empleando el proteoma de *T. brucei* TREU927, como control.

2 Técnicas utilizadas para el desarrollo de Herramientas para el estudio del sistema de SUMOilación

2.1 Construcción de plásmidos de expresión en *E. coli*

El ORF de *TbSUMO* (Tb927.5.3210), *TbE1a* (Tb11.02.5410), *TbE1b* (Tb927.5.3430) y *TbE2* (Tb927.2.2460) fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos (Macrogen) descritos en la **Tabla M5**.

Para la expresión de HisHA-*TbSUMO*, HisHA-*TbSUMO*^{T106K}, HisHA-*TbSUMOK8R* e HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106K} se amplificó por PCR el ORF completo de *TbSUMO* utilizando como templado ADN plasmídico correspondiente a la construcción pEnT6P-HisHA-*TbSUMO*^{T106R} (en los primeros dos casos) y pEnT6P-HisHA-*TbSUMOK8R*^{T106R} (en los dos últimos casos). Los oligonucleótidos empleados se detallan en la **Tabla M5**.

Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y posteriormente subclonados en los distintos vectores de la serie Duet para su co-expresión inducible en bacterias (Okada, Nagabuchi et al. 2009).

Para generar la construcción que permite la expresión simultánea de *TbSUMO* y *TbE2* (pCDFDuet-1-*TbSUMO-TbE2*), el fragmento correspondiente a HA-*TbSUMO* (o sus variantes) digerido con *NdeI* y *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) fue clonado en el sitio de múltiple clonado 2 (MCS2) del vector de expresión pCDFDuet-1 (Novagen, Palo Alto, CA, EE.UU.). Posteriormente, el fragmento correspondiente a *TbE2* digerido con *BamHI* y *NotI* fue clonado en el sitio de múltiple clonado 1 (MCS1) del vector.

Para generar la construcción que permite la expresión simultánea de *TbE1a* y *TbE1b* (pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b*), el fragmento correspondiente a *TbE1b* digerido con *NdeI* y *XhoI* (New England Biolabs) fue clonado en el MCS2 del vector de expresión pACYCDuet-1 (Novagen). Posteriormente, el fragmento correspondiente a *TbE1a* digerido con *EcoRI* y *HindIII* (New England Biolabs) fue clonado en el MCS1 del vector.

Para generar las versiones de las enzimas *TbE2* y *TbE1a* sin etiquetas se procedió de manera equivalente, amplificando por PCR a partir de los plásmidos ya generados con los oligonucleótidos descritos en la **Tabla M5**, los ORFs de las proteínas de interés. Posteriormente, el fragmento correspondiente a *TbE2* digerido con *NcoI* y *NotI* (New England Biolabs) fue clonado en el MCS1 del vector pCDFDuet-1-*TbSUMO*. De manera equivalente, el fragmento correspondiente a *TbE1a* digerido con *NcoI* y *HindIII* (New England Biolabs) fue clonado en el MCS1 del vector pACYCDuet-1-*TbE1b*.

Para la expresión del sustrato empleado como control del sistema de SUMOilación, el ORF del antígeno nuclear de proliferación celular de *S. cerevisiae* (ScPCNA) (P15873.1) fue amplificado por PCR utilizando como templado ADN genómico de *S. cerevisiae* y los oligonucleótidos detallados en la **Tabla M5**. El producto de amplificación fue primeramente clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega) y luego en el vector pBAD-3xFlag utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (New England Biolabs). Finalmente, el fragmento conteniendo la secuencia de ScPCNA etiquetada en su extremo C-terminal con el epítopo Flag repetido tres veces, fue

digerido con *Nco*I (New England Biolabs) y subclonado en el vector pET28a (Novagen). La correcta orientación del fragmento subclonado en el vector final (pET28a-ScPCNA) fue evaluada utilizando las enzimas de restricción *Sa*II y *Eco*RV (New England Biolabs).

La misma estrategia fue empleada para clonar el ORF de *Tb*PCNA (Tb927.9.5190), *Tb*TAF1N y *Tb*TAF1C (Tb927.3.2140). Las secuencias codificantes de estas proteínas fueron amplificadas por PCR a partir de ADN genómico empleando los oligonucleótidos detallados en la **Tabla M5** y clonados primeramente en el vector pGEM-T-Easy (Promega). Posteriormente los tres fragmentos fueron subclonados en el vector pET28a-3xFlag utilizando la enzima de restricción *Nco*I (New England Biolabs). En todos los casos se evaluó la correcta orientación del fragmento de interés en el vector final empleando diferencialmente enzimas de restricción adecuadas.

Para la generación de mutantes puntuales de ScPCNA el vector original pET28a-ScPCNA fue empleado como templado para amplificar mediante PCR SOEing (synthesis by overlap extension) las secuencias deseadas: ScPCNAK127R y ScPCNAK164R. Para esto se emplearon oligonucleótidos específicos que introducen el cambio de codón deseado en conjunción con aquellos empleados inicialmente para amplificar el ORF de ScPCNA (**Tabla M5**). Los fragmentos generados fueron clonados en el vector final pET28a-3xFlag de manera equivalente a lo descripto para los demás sustratos a evaluar.

Para la expresión de *Tb*SENP (Tb927.9.2220) el ORF completo fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos (Macrogen) detallados en la **Tabla M5** y posteriormente clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega). El fragmento digerido con las enzimas de restricción *Sma*I y *Spe*I (New England Biolabs) fue clonado en el vector pBAD-GST para la expresión de la enzima etiquetada en su extremo C-terminal con GST.

La identidad de todas las construcciones descriptas fue confirmada por secuenciación (IIB-UNSAM o Macrogen).

Descripción	Oligonucleótidos – Secuencia nucleotídica 5´- 3´
HA- <i>Tb</i> SUMO	Sentido CATATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGACGAACCCACTCATAAC Antisentido CTCGAGTCACCCGCCTGTCTGCTCCACC
HisHA- <i>Tb</i> SUMO	Sentido CATATGGACGAACACCACCAC Antisentido CTCGAGTCACCCGCCTGTCTGCTC
HisHA- <i>Tb</i> SUMOK8R	Sentido CATATGGACGAACACCACCAC Antisentido CTCGAGTCACCCGCCTGTCTGCTC
HisHA- <i>Tb</i> SUMOT ^{106K}	Sentido CATATGGACGAACACCACCAC Antisentido CTCGAGTCACCCGCCCTTCTGCTC
HisHA- <i>Tb</i> SUMOK8R ^{T106K}	Sentido CATATGGACGAACACCACCAC Antisentido CTCGAGTCACCCGCCCTTCTGCTC
His- <i>Tb</i> E1a	Sentido GAATTCGATGAATGCGGACGAAAAACG Antisentido AAGCTTCTACGGGTTGCGCAGGTGCC
<i>Tb</i> E1a	Sentido CCATGGCCAATGCGGACGAAAAACG Antisentido AAGCTTCTACGGGTTGCGCAGGTGCC
<i>Tb</i> E1b-S	Sentido CATATGCACGTTAATGTCCGACATATTGTC Antisentido CTCGAGATCAATTTCTACAACCTCGTCACTATC
His- <i>Tb</i> E2	Sentido GGATCCGATGTCCGGGCTATCTTTAGC Antisentido GCGGCCGCTTATACCCGCTTCCGGTG
<i>Tb</i> E2	Sentido CCATGGCCTCCGGGCTATCTTTAGC Antisentido GCGGCCGCTTATACCCGCTTCCGGTG
ScPCNA	Sentido CCATGGTAGAAGCAAAATTTG Antisentido CCATGGATTCTTCGTCATTA
ScPCNAK127R	Sentido GATGCTGATTTCTTAAAGATTGAAGAATTACA Antisentido TGTAATTCTTCAATGCGTAAGAAATCAGCATC
ScPCNAK164R	Sentido AATATCATGATCACCAAAGAAACAATAAAGTTTG Antisentido CAAACTTTATTGTTTACGGGTGATCATGATATT
<i>Tb</i> PCNA	Sentido CCATGGCCCTTGAGGCTCAGGTTCTGCAC Antisentido CCATGGACTCGGCGTCCACCTTTG
<i>Tb</i> TAF1N	Sentido CCCCATGGCT ATGAAGTTTGAGAACCCCGTTG Antisentido AACCCATGGAAAATTGGACTCCATCGAACTGGTA
<i>Tb</i> TAF1C	Sentido TCCCATGGCT ATGCACCGCGACGGACTAACTGAA Antisentido AACCCATGGAGTGAGATTCACTGAACTGCC
<i>Tb</i> SENP	Sentido CCCGGGTATGGCAGATATCCTTTTAAATGCCG Antisentido ACTAGTCGCCTTCGTGTATAAGGCCAGT

Tabla M5. Sistema de SUMOilación para expresión en bacterias. Resumen de los oligonucleótidos empleados en cada caso para la amplificación por PCR de las secuencias nucleotídicas de los distintos componentes del sistema de SUMOilación y los sustratos evaluados.

2.2 Reconstitución del sistema de SUMOilación del parásito *in vivo* en bacteria

Bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) competentes por el método de CaCl₂ para la captación de ADN (Inoue, Nojima et al. 1990) fueron transformadas por golpe térmico con el plásmido pCDFDuet-1-*Tb*SUMO-*Tb*E2 (o sus variantes). Las transformantes resultantes fueron utilizadas para la preparación de nuevas células competentes por el método de CaCl₂ y transformadas

nuevamente por golpe térmico con el plásmido pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b* (o sus variantes). Las bacterias generadas (conteniendo los vectores pCDFDuet-1-*TbSUMO-TbE2* y pACYCDuet-1-*TbE1a-TbE1b*) fueron nuevamente empleadas en la preparación de células competentes por el método de CaCl_2 y luego transformadas por golpe térmico con el plásmido pET28a-*ScPCNA*, pET28a-*ScPCNAK127R*, pET28a-*ScPCNAK164R*, pET28a-*TbPCNA*, pET28a-*TbTAF1N* o pET28a-*TbTAF1C*. Los controles realizados en cada caso con el sistema de SUMOilación incompleto fueron realizados de manera equivalente combinando, según el caso, los diferentes plásmidos y bacterias competentes disponibles.

Cultivos de células en fase estacionaria conteniendo los tres plásmidos mencionados (o un subconjunto de ellos para experimentos control) fueron diluidos 1:20 en medio Luria-Bertani (LB) y crecidos a 37°C con agitación (250 rpm) hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,6. A continuación los cultivos fueron inducidos con 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 5 hs a 37°C con agitación. Las células fueron cosechadas por centrifugación (10 min a 4000 rpm), resuspendidas en relación 10:1 en buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 0,4 mg/ml lisozima (Sigma), 0,1% Triton X-100, 10 mM ácido etildiaminotetraacético (EDTA), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, inhibidor de serin proteasas, Sigma) -pH 7,6) e incubadas en hielo por aproximadamente 30 min. Los extractos generados fueron luego sonicados hasta pérdida de viscosidad y clarificados por centrifugación (23000 g durante 30 min a 4°C). Para su análisis por Western blot, 70 μl del sobrenadante (extracto soluble; equivalente a 700 μl de cultivo inicial) fueron resuspendidos en buffer Laemmli con 100 mM DTT y hervidos durante 5 min.

2.3 Expresión de *TbSENP* recombinante

Bacterias competentes por el método de CaCl_2 *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) fueron transformadas por golpe térmico con el plásmido pBAD-*TbSENP-GST*. Cultivos de estas bacterias transformadas en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$) fueron inducidos en medio LB con 0,2% m/v arabinosa (Sigma) durante 3 hs a 37°C con agitación vigorosa (250 rpm) y posteriormente colectados por centrifugación (10 min a 4000 rpm). Las células fueron resuspendidas en relación 10:1 en buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 0,4 mg/ml lisozima (Sigma), 0,1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF (Sigma)-pH 7,6) e incubadas en hielo por aproximadamente 30 min. Los extractos generados fueron luego sonicados hasta pérdida de viscosidad y clarificados por centrifugación (23000 g durante 30 min a 4°C) para obtener extractos solubles conteniendo la proteasa de interés (1 μl de sobrenadante equivalente a 10 μl de cultivo inicial).

2.4 Ensayos de deconjugación de *TbSUMO*

Para llevar a cabo los ensayos de deconjugación de *TbSUMO* de sus sustratos 70 μl de los extractos solubles obtenidos tras la inducción del sistema bacteriano expresando la maquinaria de SUMOilación en presencia del sustrato a evaluar (Ver sección 2.2) fueron incubados durante 2 hs a 37°C con 70 μl del extracto soluble obtenido de manera equivalente a partir de bacterias expresando *TbSENP* (Ver sección 2.3) con el agregado de 10 mM DTT. Reacciones equivalentes en ausencia de proteasa o en presencia del inhibidor de cisteín proteasas NEM (Sigma) en

concentración final 25 mM fueron realizadas como control. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en buffer Laemmli con 100 mM DTT y hervidas durante 5 min para su análisis por Western blot.

3 Técnicas generales de biología molecular

3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN se llevó a cabo a partir de una mezcla de reacción en un volumen final de 50 μl conteniendo: ADN molde (aproximadamente 300 ng de ADN genómico de parásitos o 10 ng de ADN plasmídico o producto de una reacción de PCR), 30 pmoles de cada oligonucleótido sentido y antisentido, 2,5 mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega), 1,5 mM MgCl_2 (Life Technologies), 0,2 UI Taq ADN polimerasa (Life Technologies) y 5 μl de buffer de reacción 10X (Life Technologies).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Mycycler, BioRad) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a la temperatura correspondiente para cada oligonucleótido según su longitud y composición durante 1 min, elongación a 72°C a 1 min/kilobase (kb); elongación final de 10 min a 72°C.

Colony PCR

Este método rápido para detectar la presencia de un inserto de interés en un determinado plásmido a partir de colonias bacterianas individuales crecidas en LB-agar en presencia de antibiótico se llevó a cabo en algunas ocasiones de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) Picar parte de la colonia con una punta de pipeta estéril y resuspender en agua Milli Q autoclavada.
- 2) Lisar las bacterias por calentamiento a 90-100°C durante 10 min y luego centrifugar 10 min a 14000 rpm.
- 3) Emplear 5 μl del sobrenadante como molde para llevar a cabo la reacción de PCR de acuerdo al protocolo antes mencionado en un volumen final de reacción de 25 μl .

3.2 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron resueltos en geles de agarosa conteniendo 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. En la mayoría de los casos se emplearon geles cuyo porcentaje de agarosa varió entre 0,8 -2% según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Las muestras fueron preparadas agregando 0,2 volúmenes de buffer de siembra (10 mM Tris HCl pH 7,6, 0,15% orange G, 60 mM EDTA, 60% glicerol) en cada caso. Las condiciones de corrida empleadas fueron 3 V/cm en una cuba de electroforesis horizontal (Sub-Cell GT agarose electroforesis system, BioRad). Se utilizó de rutina TBE (90 mM Tris borato, 90 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA pH 8,3) como buffer de electroforesis. El ADN fue visualizado por fluorescencia inducida por luz ultravioleta sobre el bromuro de etidio intercalado en el mismo.

3.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN a ser purificados se resolvieron primero en geles de agarosa según se detalla en la sección 3.2. La banda de interés fue posteriormente escindida y purificada por el método QIAEX II (QIAQuick PCR purification Kit, QIAGEN) según instrucciones del fabricante.

3.4 Cuantificación de ADN purificado

El ADN fue cuantificado en geles de agarosa 1% por comparación con cantidades conocidas de ADN del fago λ .

3.5 Ligación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR y purificados por QIAEX II, fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega).

La ligación se llevó a cabo a 16°C incubando toda la noche una mezcla conteniendo: 50 ng del vector, inserto en una relación molar 3:1 o 5:1 inserto:vector, 1 U Weiss de ADN ligasa del fago T4 (Promega) y buffer de ligación en concentración indicada por el fabricante, manteniendo un volumen de reacción final de 10 μ l.

En el caso de fragmentos para subclonado, se utilizaron 50 ng de ADN plasmídico digerido con las enzimas adecuadas en cada caso y el fragmento de interés siguiendo el protocolo detallado anteriormente.

3.6 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN se realizaron en todos los casos según especificaciones del fabricante (New England Biolabs).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20-200 μ l adicionándose 1-20 μ g de ADN plasmídico en buffer adecuado según fuera necesario. Para cada reacción se utilizaron entre 5 y 10 unidades enzimáticas/ μ g de ADN, a la temperatura adecuada para la enzima por un lapso que varió entre 3 y 16 hs.

3.7 Preparación de bacterias competentes

La preparación de bacterias competentes de las distintas cepas de *E. coli* utilizadas se realizó según el método de CaCl₂ (Inoue, Nojima et al. 1990).

A partir de una colonia aislada se inoculó medio LB estéril conteniendo el antibiótico adecuado y el cultivo se creció a 18°C hasta una DO_{600 nm} de 0,6. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, resuspendidas en una solución conteniendo 15 mM CaCl₂, 55 mM MgCl₂, 250 mM MnCl₂ en 10 mM HEPES, incubadas en hielo durante 10 min y nuevamente centrifugadas. Las bacterias fueron luego resuspendidas en la solución antes

mencionada, suplementada con 7% dimetilsulfóxido (DMSO), e incubadas nuevamente en hielo durante 10 min. Finalmente las células fueron alicuotadas y congeladas a -70°C hasta su uso.

3.8 Transformación de bacterias por golpe térmico

Para cada transformación se utilizaron entre 50-100 μl de células competentes preparadas como se indica en la sección 3.7.

Las mismas fueron descongeladas en hielo e incubadas 30 min en estas condiciones con 5 ng de plásmido superenrollado o 5-10 μl de reacción de ligación (sección 3.5), según el caso. Posteriormente se aplicó un golpe térmico de 30 segundos a 42°C , se incubó la mezcla en hielo durante 2 minutos y se agregó 1 ml de medio LB. Las células fueron recuperadas durante 1 h a 37°C con agitación. Finalmente fueron cosechadas por centrifugación (5 min a 3000 rpm) y sembradas en placas de LB agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes, en función del marcador de resistencia presente en el plásmido que se desea incorporar.

Las bacterias fueron crecidas durante toda la noche a 37°C hasta visualización de colonias.

Se utilizaron bacterias *E. coli* Top10 (Life Technologies), DH5 α (Life Technologies), BL21-Codon Plus (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), BL21 (DE3) competentes por el método descrito en la sección 3.7.

3.9 Purificación de ADN plasmídico

Los plásmidos fueron purificados a partir de bacterias transformadas por el método de lisis alcalina. Para esto se crecieron las bacterias de interés en 3 ml de medio LB con el antibiótico adecuado a 37°C toda la noche con agitación (250 rpm). Al día siguiente las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (10 min a 4000 rpm) y el pellet resultante fue resuspendido en 300 μl de buffer P1 (50 mM Tris HCl pH 8.0 y 10 mM EDTA). Las bacterias fueron lisadas con el agregado de 300 μl de buffer P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) tras 5 min de incubación a TA. Luego se agregaron 300 μl de buffer P3 (3.0 M acetato de potasio pH 5.5) para favorecer la precipitación del ADN genómico. Las muestras se incubaron en hielo por 10 minutos y luego fueron centrifugadas durante 15 min a 13000 rpm. Se conservaron las fracciones solubles y estas fueron incubadas 1 h a 37°C con ARNasa (Sigma). Las proteínas presentes en las muestras fueron precipitadas mediante dos extracciones con 1 volumen de cloroformo:isoamilico (24:1) y el ADN plasmídico se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol frío (Merck). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 40 min a 4°C . El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 500 μl de etanol 70% v/v (Merck). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes y los pellets se dejaron secar para finalmente ser resuspendidos en 30 μl de agua miliQ autoclavada.

Preparación de plásmidos para transfectar

Los plásmidos empleados en la transfección de parásitos se purificaron a partir de 250 ml de cultivo de células DH5 α crecidas en medio LB en presencia de los antibióticos correspondientes, por medio de columnas de intercambio aniónico QIAGEN-tip 500 (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

3.10 Secuenciación automática de ADN

Se empleó el método de terminación de cadena (Sanger, Nicklen et al. 1977) utilizando los terminadores fluorescente del kit ABIPRISM (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). Los fragmentos fueron resueltos en un secuenciador automático ABI377 (Perkin Elmer) (servicio de secuenciación del IIB-UNSAM).

En algunos casos las muestras fueron analizadas empleando el servicio de secuenciación de la empresa Macrogen (Seoul, Korea).

4 Técnicas generales para el análisis de proteínas

4.1 Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó empleando el método de Bradford. En algunos casos esto fue realizado empleando el método del ácido bicinconínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific). Se utilizó BSA (Sigma) como estándar.

4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se llevaron a cabo rutinariamente en condiciones desnaturizantes de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970). Las muestras fueron desnaturizadas antes de su siembra mediante el agregado de buffer de Laemmli (0,125 M Tris pH 6.8, 4% m/v SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% m/v azul de bromofenol, 100 mM DTT) y calentadas a 100°C durante 5 min.

Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (con SDS) discontinuos, con un gel de apilamiento en la parte superior (4.5% de acrilamida/bisacrilamida) y con gel separador en la parte inferior (entre 7.5 y 10% de acrilamida/bisacrilamida según el tamaño de las proteínas a estudiar). Para resolver patrones de conjugación a *TbSUMO* y poder visualizar simultáneamente el monómero sin conjugar, se prepararon geles separadores en gradiente discontinuo, con una porción superior de 7,5% de acrilamida/bisacrilamida y una porción inferior de 12% de acrilamida/bisacrilamida. En algunos casos se emplearon geles de acrilamida comerciales de gradiente continuo 4-20% (BioRad).

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en cubas de electroforesis (260 SE Mighty Small II Electrophoresis Unit, Hoefer Inc., Holliston, MA, EE.UU.) a 15-20 mA constantes por gel.

Se utilizaron diversos marcadores de peso molecular comerciales en función del rango de proteínas a estudiar: LMW-SDS marker kit (GE Healthcare), HMW-SDS marker kit (GE Healthcare) y PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific).

4.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (HybondECL, GE Healthcare) usando la técnica de electrotransferencia semi-seca (en condiciones de 0.8 mA/cm² durante 90 min) o húmeda (en condiciones de 100 V constantes durante 2 hs). En ambos casos se utilizó el mismo buffer de transferencia: 20 mM Tris HCl pH 8, 150 mM glicina, 20% v/v metanol.

En algunos casos, la eficiencia de transferencia de proteínas a las membranas de nitrocelulosa se evaluó mediante tinción con colorante Rojo Ponceau 0.5% en 5% TCA.

Para la detección de proteínas con anticuerpos (ensayo de Western blot), las membranas fueron incubadas durante 1 h en solución de bloqueo (3% m/v leche descremada, 2% m/v glicina (Sigma) en TBS: 50 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl). A continuación las membranas se

incubaron durante 2 hs o durante toda la noche con el anticuerpo primario, diluido según corresponda en cada caso (**Tabla M6**) en solución de bloqueo. Para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos se realizaron 2 lavados de 10 min en agitación con TBS, 1 lavado de 10 min con una solución 0.5% NP-40 en TBS y 2 lavados adicionales de 10 min con TBS. Luego las membranas se incubaron aproximadamente 2 hs con anticuerpo secundario en la dilución correspondiente (**Tabla M6**) fusionado a peroxidasa de rábano picante (HRP), diluido en solución de bloqueo. Finalmente se repitieron los lavados descriptos para el anticuerpo primario. Para la visualización de los resultados se utilizó el kit de revelado para quimioluminiscencia SuperSignal West Pico Chemoluminescence (Thermo Fischer Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron expuestas a placas radiográficas (AGFA, Mortsel, Bélgica/Kodak, EE.UU.) y reveladas con las soluciones apropiadas (AGFA). En algunos casos los complejos antígeno-anticuerpo primario fueron detectados utilizando anticuerpos fluorescentes secundarios (**Tabla M6**) en solución de bloqueo (1% leche descremada en TBS) compatibles con el sistema Odyssey para escaneo infrarrojo (LiCor Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU.). En estos casos los lavados se realizaron de manera equivalente a lo previamente descrito empleando una solución 0,01% Tween en TBS.

	Anticuerpo	Animal	Dilución
Anticuerpos primarios	anti HA monoclonal -high affinity 3F10 (Roche)	Rata	1:500
	anti <i>Tb</i> SUMO monoclonal (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014)	Ratón	1:500
	anti Flag M2 monoclonal (Sigma)	Ratón	1:1000
	anti His monoclonal (Sigma)	Ratón	1:250
	anti Tubulina monoclonal (Sigma)	Ratón	1:500
Anticuerpos secundarios	anti Ratón HRP (Sigma)	Cabra	1:5000
	anti Rata HRP (Sigma)	Cabra	1:2000
	anti Ratón Alexa Fluor 790 (Jackson, West Grove, PA, EE.UU.)	Cabra	1:25000

Tabla M6. Anticuerpos empleados para Western blot. Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y las diluciones empleadas en la técnica de Western blot.

4.4 Tinción de geles de poliacrilamida

Tinción con Coomassie Brilliant Blue

La tinción de geles de poliacrilamida mediante ésta técnica permite la detección de cantidades relativamente altas de proteína ya que posee baja sensibilidad (límite de detección: 500 ng de proteína).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron incubados con agitación durante toda la noche con una solución conteniendo 0,05% de colorante azul brillante de Coomassie R-250 en 30% metanol y 10% ácido acético. La tinción inespecífica de los geles fue desteñida con una solución 30% metanol y 10% ácido acético.

Tinción con nitrato de plata

Este método de tinción es mucho más sensible que el antes mencionado ya que permite la detección de picogramos de proteína.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas presentes en los geles fueron fijadas en una solución 40% v/v metanol, 10% v/v ácido acético por 30 min con agitación. La sensibilización posterior se llevó a cabo incubando los geles en agitación con una solución 0,2% Na_2SO_3 , 6,8% acetato de sodio en 30% v/v metanol durante 30 min. Los geles fueron lavados tres veces con abundante agua Milli Q durante 5 min y luego incubados en agitación con una solución 0,25% AgNO_3 durante 20 min en oscuridad. Finalmente, los geles fueron lavados nuevamente dos veces con agua Milli Q por 1 min y revelados con una solución 2,5% Na_2CO_3 , 0,04% v/v PAF hasta visualización de bandas. La reacción fue detenida con una solución 1,5% EDTA. Los geles fueron manipulados con guantes en todo momento para evitar contaminaciones durante la tinción. El protocolo empleado es compatible con la técnica de espectrometría de masas (Yan, Wait et al. 2000).

ANEXO

ANEXO

Figura A1

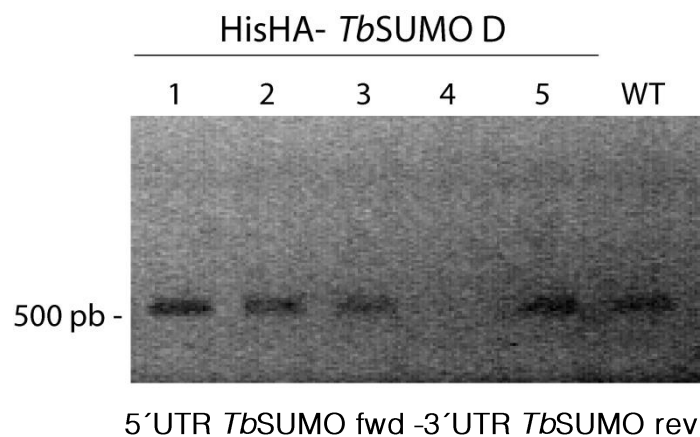


Figura A1. Evaluación de la presencia de copias endógenas de *TbSUMO* en parásitos PC HisHA-*TbSUMO* D. Productos de PCR separados por electroforesis en un gel de agarosa 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio y transiluminación UV. Los amplicones fueron obtenidos a partir de ADN genómico extraído de distintos clones (1-5) de las líneas celulares de PC HisHA-*TbSUMO* D y parásitos silvestres (WT) como control. Los oligonucleótidos empleados en la reacción permiten la amplificación exclusiva de la versión de *TbSUMO* silvestre.

Figura A2

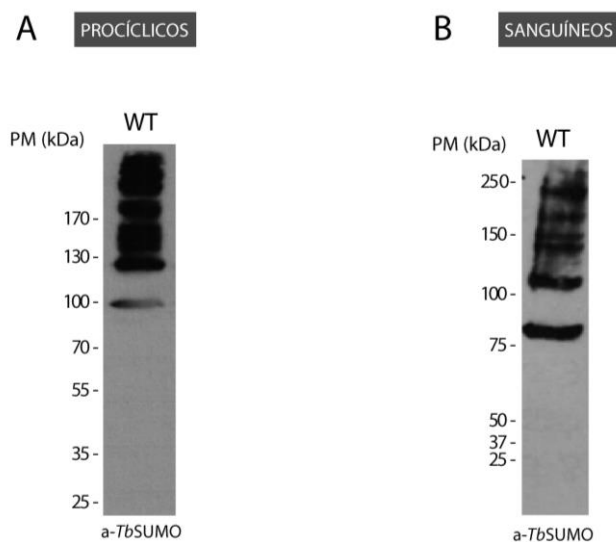


Figura A2. Expresión y conjugación de *TbSUMO*. Análisis por Western blot de extractos de parásitos silvestres (WT) (A) PC y (B) BS utilizando anticuerpos monoclonales anti *TbSUMO* (Lopez-Farfan, Bart et al. 2014). WT PC: $\sim 3,5 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición largo; WT BS: $\sim 1,5 \times 10^7$ parásitos - Tiempo de exposición largo. Por limitaciones propias del suero empleado no se visualiza la forma libre de *TbSUMO*.

Figura A3

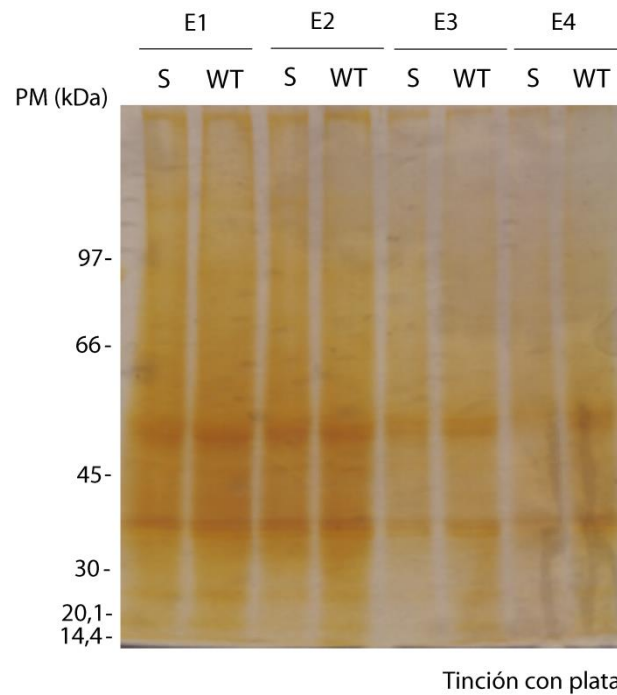


Figura A3. Purificación de proteínas SUMOiladas tras un paso cromatográfico a partir de parásitos PC HisHA-*TbSUMO S*. Análisis por tinción con plata de los eluidos resultantes de la purificación de proteínas SUMOiladas tras un paso cromatográfico de afinidad a Ni^{+2} a partir de parásitos PC HisHA-*TbSUMO S* y silvestres (WT), de manera comparativa (Ver Figura 21 (A)). Volumen de elución equivalente a $1,2 \times 10^9$ parásitos.

Figura A4

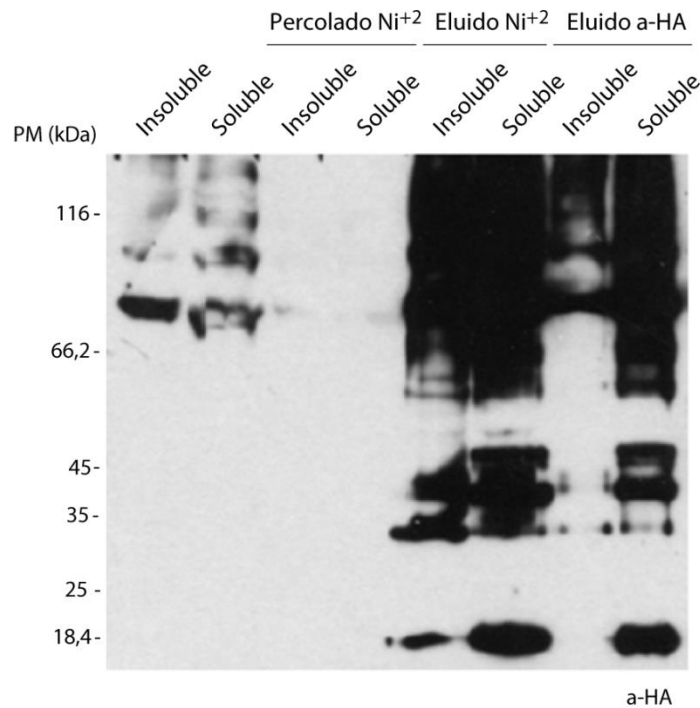


Figura A4. Purificación de proteínas SUMOiladas por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} y resina anti HA a partir de parásitos PC HisHA-*TbSUMO S*. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti HA de la purificación en dos pasos realizada a partir de parásitos PC HisHA-*TbSUMO S*. Los parásitos fueron lisados en presencia del detergente

NP-40 y las fracciones solubles (Soluble) e insolubles (Insoluble) fueron procesadas de manera independiente. Soluble/Insoluble; $1,3 \times 10^8$ parásitos; Percolado Ni^{+2} : fracción no retenida por la resina de Ni^{+2} ($1,3 \times 10^8$ parásitos); Eluido Ni^{+2} : muestra retenida y luego eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni^{+2} (2×10^9 parásitos); Eluido a-HA: muestra retenida y luego eluida con SDS de la resina anti HA (7×10^9 parásitos).

Figura A5

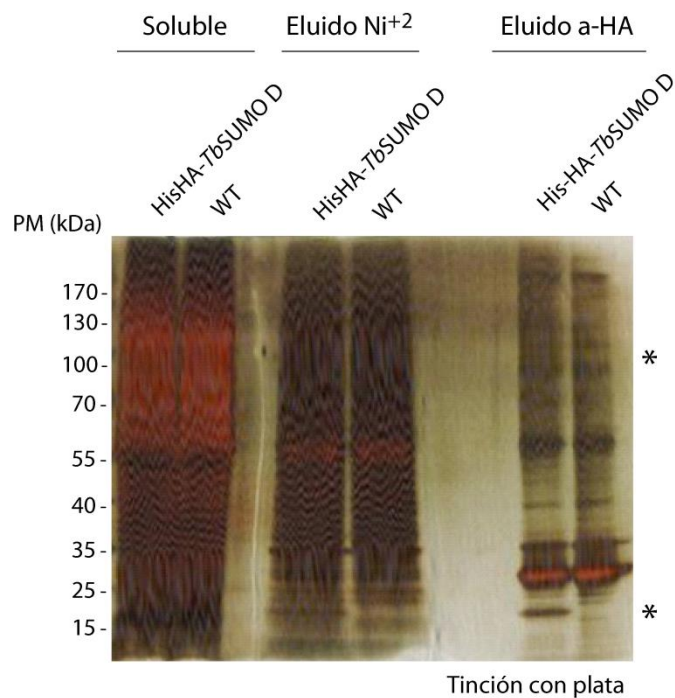


Figura A5. Purificación de proteínas SUMOiladas tras dos pasos cromatográficos a partir de parásitos PC HisHA-TbSUMO D. Análisis por tinción con plata de la purificación de proteínas SUMOiladas tras un paso cromatográfico de afinidad a Ni^{+2} y resina anti HA a partir de parásitos PC HisHA-TbSUMO D y silvestres (WT), de manera comparativa (Ver Figura 22 (A)). Soluble: fracción soluble tras lisis en presencia de urea (3×10^7 parásitos); Eluido Ni^{+2} : muestra retenida y luego eluida con 500 mM imidazol de la resina de Ni^{+2} (3×10^8 parásitos); Eluido a-HA: muestra retenida y luego eluida con SDS de la resina anti HA (3×10^9 parásitos). Los asteriscos (*) resaltan bandas diferenciales.

Figura A6

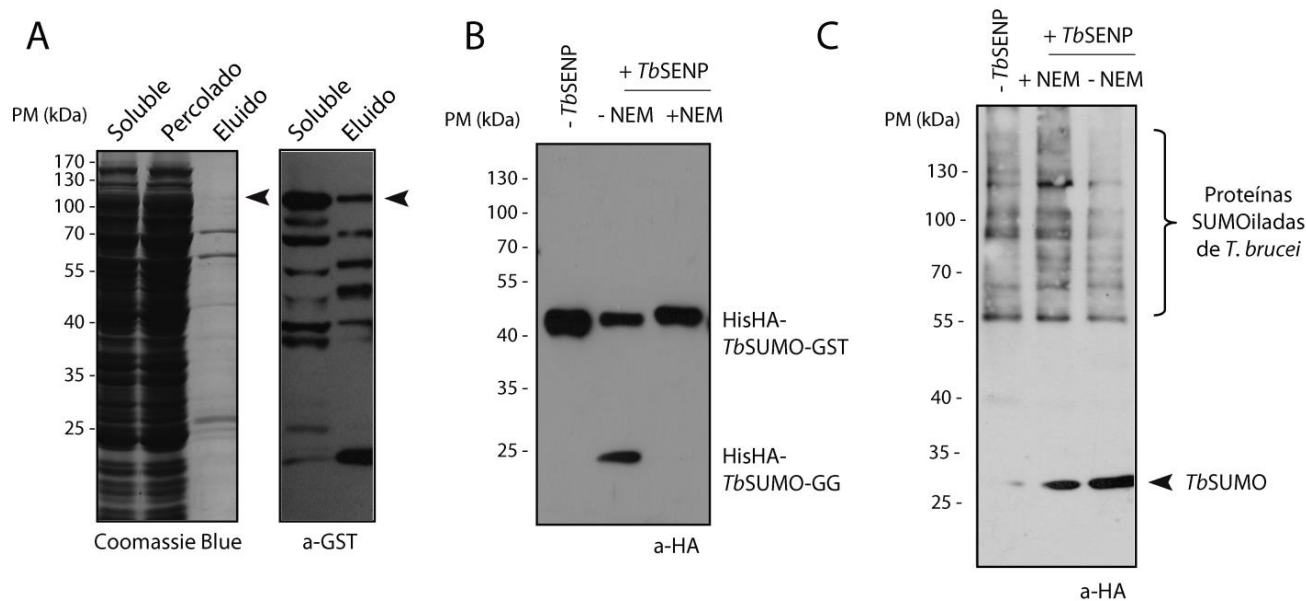


Figura A6. Actividad peptidasa e isopeptidasa de *TbSENP*. (A) Análisis por SDS-PAGE y tinción por Coomassie Blue (panel izquierdo) o Western blot utilizando anticuerpos anti GST (panel derecho) de la purificación de *TbSENP* por cromatografía de afinidad a glutatión. Soluble: extracto soluble de bacterias sobre-expresando *TbSENP*; Percolado: fracción no retenida por la resina; Eluido: muestra retenida y luego eluida de la resina. La proteína completa se encuentra etiquetada en el margen derecho de los geles. Las bandas de mayor movilidad electroforética se corresponden con productos de degradación de la proteína. (B) El precursor de *TbSUMO* fusionado a His-HA y GST en sus extremos N y C-terminal, respectivamente, fue purificado por cromatografía de afinidad a glutatión y 7,5 μ g fueron incubados a 37°C por 1 h junto con 0,75 μ g de *TbSENP* recombinante, purificada de manera análoga, en 30 μ l de TBS con 1 mM DTT en ausencia (Calle 2) o presencia (Calle 3) del 20 mM NEM. Las muestras fueron analizadas por Western blot empleando anticuerpos anti HA. El sustrato sin el agregado de proteasa fue analizado como control (Calle 1). (C) Para evaluar la actividad isopeptidasa de *TbSENP*, 0,75 μ g de la proteína recombinante fueron incubados con 3 μ g de conjugados purificados a partir de parásitos HisHA-*TbSUMO* D PC, en 30 μ l de TBS con 1 mM DTT. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 1 h en presencia (Calle 2) o ausencia (Calle 3) de 20 mM NEM. Las reacciones fueron finalmente analizadas por Western blot utilizando anticuerpos anti HA. Los sustratos sin el agregado de proteasa fueron analizados como control.

Tabla A1. Resumen de proteómicas realizadas.

Estadio	Línea celular empleada	Purificación	Proteómica					
			Nombre	Tabla	Análisis	Equipamiento	Procesamiento	Proteínas diferenciales identificadas
PC	HisHA- <i>TbSUMO S</i>	Resina Ni ⁺²	PC1	A2	Dr. Igor Almeida, EE.UU.	MALDI-ToF	2 muestras/Cuadruplicado	72 proteínas
PC	HisHA- <i>TbSUMO S</i>	Resina Ni ⁺² /Resina anti HA	PC2	A4	Dr. Igor Almeida, EE.UU.	MALDI-ToF	1 muestra/Sextuplicado	77 proteínas
PC	HisHA- <i>TbSUMO D</i>	Resina Ni ⁺² /Resina anti HA	PC3	A5	ITSI-Biosciencias, EE.UU.	Cuadrupolo-Orbitrap	1 muestra	488 proteínas
PC	HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> _{T106R} (D)	Resina Ni ⁺² /Lys-C/ Resina Ni ⁺²	PC4	2	ITSI-Biosciencias, EE.UU.	Cuadrupolo-Orbitrap	1 muestra	6 proteínas/ 6 sitios
PC	HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K}	Resina Ni ⁺² /Lys-C/ anti K-ε-GG	PC5	4	Dr. Ron Hay, Escocia	Cuadrupolo-Orbitrap	3 muestras	44 proteínas/52 sitios
BS	HisHA- <i>TbSUMO S</i>	Resina Ni ⁺²	BS1	A3	Dr. Igor Almeida, EE.UU.	MALDI-ToF	1 muestra/Cuadruplicado	39 proteínas
BS	HisHA- <i>TbSUMO D</i>	Resina Ni ⁺² /Resina anti HA	BS2	A6	Dr. Enrique Calvo, España	Orbitrap	2 muestras	228 proteínas
BS	HisHA- <i>TbSUMOK8R</i> _{T106R} (D)	Resina Ni ⁺² /Lys-C/ Resina Ni ⁺²	BS3	3	ITSI-Biosciencias, EE.UU.	Cuadrupolo-Orbitrap	1 muestra	19 proteínas/ 19 sitios
BS	HisHA- <i>TbSUMO</i> ^{T106K}	Resina Ni ⁺² /Lys-C/ anti K-ε-GG	BS4	5	Dr. Ron Hay, Escocia	Cuadrupolo-Orbitrap	3 muestras	6 proteínas/7 sitios

Tabla A2. Proteómica PC1-HisHA-*Tb*SUMO S

Identificación	Descripción
OG5_127114	60S ribosomal protein L10a, putative
OG5_127236	60S ribosomal protein L18, putative
OG5_126611	beta tubulin
OG5_127025	60S ribosomal protein L34, putative
OG5_144830	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase
OG5_127057	isocitrate dehydrogenase, putative
OG5_126593	tryparedoxin peroxidase, putative
OG5_127537	hypothetical protein, conserved
OG5_126691	aconitase, putative
OG5_127070	ubiquitin-activating enzyme e1, putative
OG5_127216	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, putative
OG5_128522	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
OG5_127082	pyruvate phosphate dikinase, putative
OG5_139863	Gim5B protein, glycosomal membrane protein, putative
OG5_127039	40S ribosomal protein S8, putative
OG5_127950	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit
OG5_127592	nucleolar RNA binding protein, putative
OG5_131078	hypothetical protein, conserved
OG5_126624	uracil phosphoribosyltransferase, putative
OG5_127498	dynein light chain, putative
OG5_157959	hypothetical protein, conserved
OG5_151471	protein transport protein Sec23, putative
OG5_138267	hypothetical protein, conserved
OG5_126964	40S ribosomal protein S6, putative
OG5_147574	hypothetical protein, conserved
OG5_148314	hypothetical protein, conserved
OG5_127278	eukaryotic translation initiation factor 4e, putative (eIF4E)
OG5_126617	receptor-type adenylate cyclase GRESAG
OG5_128198	hypothetical protein, conserved
OG5_126704	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD], glycosomal, putative
OG5_140422	protein kinase, putative
OG5_127312	translation initiation factor IF-2, putative
OG5_149130	hypothetical protein, conserved
OG5_148071	hypothetical protein, conserved
OG5_127828	Tbgamb.27571 protease regulatory ATPase subunit, putative
OG5_148367	hypothetical protein, conserved
OG5_130635	calpain, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative
OG5_148081	RNA binding protein, putative
OG5_126869	pumillio RNA binding protein, putative, RNA-binding protein, putative
OG5_126957	60S ribosomal protein L13a, putative
OG5_156704	Adenine phosphoribosyltransferase, putative
OG5_153789	guanylate kinase, putative
OG5_143279	hypothetical protein, conserved
OG5_127137	40S ribosomal protein S10, putative
OG5_128265	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein, putative
OG5_145957	hypothetical protein, conserved
OG5_147543	hypothetical protein, conserved
OG5_147291	hypothetical protein, conserved
OG5_126720	transketolase, putative
OG5_128754	hypothetical protein, conserved
OG5_148324	hypothetical protein, conserved

OG5_142497	hypothetical protein, conserved
OG5_126779	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, putative
OG5_128331	mevalonate kinase, putative
OG5_142244	hypothetical protein, conserved
OG5_162386	hypothetical protein, conserved
OG5_127535	hypothetical protein, conserved
OG5_126772	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase HEL64, putative
OG5_145896	ubiquitin-like protein, putative
OG5_127227	aspartyl-tRNA synthetase, putative
OG5_126794	adenosine 5'-monophosphoramidase, putative
OG5_128662	threonine synthase, putative
OG5_146165	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative
OG5_129676	hypothetical protein, conserved
OG5_128997	hypothetical protein, conserved
OG5_127331	small GTP-binding protein, putative
OG5_129633	glucose transporter
OG5_129265	pteridine transporter, putative
OG5_139852	unspecified product
OG5_162243	hypothetical protein, conserved
OG5_153896	NUP-1 protein, putative (28H13.465)
OG5_126923	elongation factor 2, putative

Tabla A3. Proteómica BS1-HisHA- *Tb*SUMO S

GeneDB	Descripción
Tb927.1.700	phosphoglycerate kinase
Tb927.5.3210	small ubiquitin protein, putative
Tb927.1.3830	glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal
Tb927.2.4230	NUP-1 protein, putative
H25N7.12	H25N7.12 (retrotransposon hot spot)
Tb927.8.5460	flagellar calcium-binding protein TB-44A
Tb927.5.1610	60S ribosomal protein L13a, putative
Tb927.5.1810	lysosomal/endosomal membrane protein p67
Tb927.3.4070	hypothetical protein, conserved;PTZ00207 super family ; Major facilitator superfamily MFS-1(bomba de eflujo)
Tb927.8.5650	hypothetical protein, conserved
Tb927.7.4570	nucleoside hydrolase, putative
Tb927.10.8190	t-complex protein 1, theta subunit, putative;TCP-1 (CTT or eukaryotic type II) chaperonin family, theta subunit;GroEL-intermediate domain like; Chaperone, tailless complex polypeptide 1
Tb927.9.8850	actin
Tb927.6.2390	hypothetical protein, conserved ;DUF4140(N-terminal domain of unknown function); DUF4139(Domain of unknown function usually found at the C-terminus of proteins);Conserved hypothetical protein CHP02231
Tb927.6.3840	reticulon domain protein (or neuroendocrine-specific protein (NSP), is a protein of unknown function which associates with the endoplasmic reticulum);transmembrana
Tb927.7.710	heat shock 70 kDa protein, putative
Tb927.8.6660	hypothetical protein, conserved ;Leucine-rich repeats (LRRs), ribonuclease inhibitor (RI)-like subfamily (protein-protein interactions ;in Ran GTPase Activating Proteins);paraflagellar rod component; RNI-like domain
Tb927.9.12110	Chain B, X-Ray Structure Of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase From The Protozoan Parasite T. Brucei
Tb927.4.1100	ribosomal protein L21E (60S), putative
Tb927.4.760	gamma-adaptin 1, putative (Adaptins are components of the adaptor complexes which link clathrin to receptors in coated vesicles);Armadillo-type fold
Tb927.8.6580	succinate dehydrogenase flavoprotein, putative
Tb927.6.2200	hypothetical protein, conserved;ThiJ/Pfpl(cistein proteasa)/DJ-1(asociación con Parkinson);Class I glutamine amidotransferase-like
Tb927.8.1990	tryparedoxin peroxidase(actividad peroxidasa)
Tb927.5.2370	hydrolase, alpha/beta fold family, putative
Tb927.6.2790	L-threonine 3-dehydrogenase, putative
13J3.09	ESAG7, subunit of heterodimeric transferrin receptor
Tb927.7.5700	hypothetical protein, conserved
Tb927.9.10790	T. brucei spp.-specific protein
Tb927.3.1360	cytosine-specific DNA methylase, putative
Tb927.11.17970	ESAG3
Tb927.4.2530	hypothetical protein, conserved ;transmembrana
Tb927.8.7030	hypothetical protein, conserved;BTB/POZ fold(present near the N-terminus of a fraction of zinc finger proteins,mediate transcriptional repression and to interact with components of histone deacetylase co-repressor complexes)
Tb927.4.2580	hypothetical protein, conserved
Tb927.11.13730	Chain D, Crystal Structure Determination Of T. Brucei Ornithine Decarboxylase Bound To D-Ornithine And To G418
Tb927.1.2990	hypothetical protein, conserved;Pentatricopeptide repeat (possibly involved in RNA editing-comun en plantas y hongos)
Tb927.8.6060	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
Tb927.2.3280	65 kDa invariant surface glycoprotein ;transmembrana

Tb927.4.5560	variant surface glycoprotein (VSG), putative
Tb927.4.4400	hypothetical protein, conserved;Leucine-rich repeats (LRRs), ribonuclease inhibitor (RI)-like subfamily(protein-protein interactions- in Ran GTPase Activating Proteins

Tabla A4. Proteómica PC2-HisHA-*Tb*SUMO S

Identificación	Descripción
gi 71755711	hypothetical protein
gi 70832704	prolyl oligopeptidase, putative
gi 71744720	hypothetical protein
gi 113227	Actin A
gi 72387027	hypothetical protein
gi 74025108	hypothetical protein
gi 72388242	cytoskeleton-associated protein CAP5.5
gi 70834762	elongation factor 1 gamma, putative
gi 70833124	P-type H ⁺ -ATPase, putative
gi 72389510	glutamine hydrolysing (not ammonia-dependent) carbomoyl phosphate synthase
gi 33348439	fatty acid desaturase, putative
gi 70830971	ribosomal protein S7, putative
gi 70832473	40S ribosomal protein S9, putative
gi 72392251	small GTP-binding protein Rab1
gi 71756205	hypothetical protein
gi 72389268	translation initiation factor
gi 33348255	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
gi 71745856	hypothetical protein
gi 261332101	methionyl-tRNA synthetase, putative
gi 71754717	hypothetical protein
gi 72388946	NADH-dependent fumarate reductase
gi 70833550	dynein light chain, putative
gi 72391092	hypothetical protein
gi 17942709	Chain B, Crystal Structure Of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (Pepck)
gi 72388220	nucleolar protein
gi 71746510	hypothetical protein
gi 71755691	hypothetical protein
gi 72390882	asparagine synthetase a
gi 70832032	t-complex protein 1, delta subunit, putative
gi 74025026	hypothetical protein
gi 72393259	fatty acid desaturase
gi 70833318	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
gi 71746836	hypothetical protein
gi 74025898	hypothetical protein
gi 70832811	isoleucyl-tRNA synthetase, putative
gi 70833159	prolyl-trna synthetase, putative
gi 70832065	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative
gi 72388986	choline/ethanolamine kinase
gi 261332409	40S ribosomal protein S3A, putative
gi 72393189	hypothetical protein
gi 72390796	chaperone protein DNAJ
gi 70833288	N-myristoyl transferase, putative
gi 70833267	Aconitase
gi 62358814	hypothetical protein, conserved
gi 33348199	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
gi 70803049	pitriylsin-like metalloprotease
gi 70831753	ADP-ribosylation factor, putative
gi 70803050	Golgi/lysosome glycoprotein 1
gi 70833840	leucyl-tRNA synthetase, putative
gi 261332765	dipeptidyl-peptidase 8-like serine protease
gi 33348195	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative

gi 70834768	eukaryotic translation initiation factor 2 gamma, putative
gi 71754735	hypothetical protein
gi 72388142	hypothetical protein
gi 72390599	hypothetical protein
gi 83642644	arginine N-methyltransferase, putative
gi 70831486	mitochondrial carrier protein, putative
gi 74025290	hypothetical protein
gi 72389558	hypothetical protein
gi 72391324	hypothetical protein
gi 72389781	hypothetical protein
gi 72387626	dynein heavy chain
gi 71746874	hypothetical protein
gi 71745856	hypothetical protein
gi 74025400	hypothetical protein
gi 72387868	hypothetical protein
gi 33348614	hypothetical protein, conserved
gi 70833683	proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 3
gi 83642351	hypothetical protein, conserved
gi 72392569	acetyl-CoA synthetase
gi 72388918	casein kinase
gi 72390702	proline oxidase
gi 70833541	RNA polymerase I second largest subunit
gi 74025618	hypothetical protein
gi 70802010	tubulin-tyrosine ligase-like protein, conserved
gi 71746640	hypothetical protein
gi 72387287	Dynammin
gi 72389558	hypothetical protein

Tabla A5. Proteómica PC3-HisHA-*Tb*SUMO D

Identificación	Descripción
115503997	hypothetical protein
115504053	hypothetical protein
115504055	hypothetical protein
115504127	hypothetical protein
115504165	hypothetical protein
115504167	hypothetical protein
115504355	hypothetical protein
115504461	hypothetical protein
115504569	glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal
115504605	hypothetical protein
115504657	hypothetical protein
115504663	hypothetical protein
115504697	hypothetical protein
115504761	hypothetical protein
115504843	expression site-associated gene 1 (ESAG1) protein
122112495	RecName: Full=Probable eukaryotic initiation factor 4A; Short=eIF-4A
133355	RecName: Full=DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1
135440	RecName: Full=Tubulin alpha chain
135500	RecName: Full=Tubulin beta chain; AltName: Full=Beta-tubulin
17369669	RecName: Full=Nucleolar GTP-binding protein 1
227343644	Chain A, Solution Structure Of Sumo From Trypanosoma Brucei
261328675	hypothetical protein, conserved
261328808	hypothetical protein, conserved
261328826	hypothetical protein, conserved
261328832	hypothetical protein, conserved
261328834	protein kinase, putative
261328838	Hydin
261328839	splicing factor 3a, putative
261328892	hypothetical protein, conserved
261330948	hypothetical protein, conserved
261330986	hypothetical protein, conserved
261331092	protein kinase, putative
261331142	hypothetical protein, conserved
261331161	hypothetical protein, conserved
261331179	hypothetical protein, conserved
261331245	glutamate dehydrogenase, putative
261331258	protein phosphatase 2a regulatory subunit, putative
261331288	hypothetical protein, conserved
261331349	hypothetical protein, conserved
261331396	hypothetical protein, conserved
261331397	chloride channel protein, putative
261331416	hypothetical protein, conserved
261331614	hypothetical protein, conserved
261331615	hypothetical protein, conserved
261331616	hypothetical protein, conserved
261331648	hypothetical protein, conserved
261331715	hypothetical protein, conserved
261331778	ribonuclease, putative
261331818	hypothetical protein, conserved
261331829	hypothetical protein, conserved
261331969	choline dehydrogenase, putative

261332002	structural maintenance of chromosome 4, putative
261332024	kinesin, putative
261332041	hypothetical protein TbgDaL_X1150
261332045	hypothetical protein, conserved
261332108	hypothetical protein, conserved
261332153	DNA topoisomerase IA, putative
261332296	hypothetical protein, conserved
261332306	hypothetical protein, unlikely
261332344	hypothetical protein, conserved
261332392	hypothetical protein, conserved
261332401	hypothetical protein, conserved
261332428	hypothetical protein, conserved
261332547	hypothetical protein, conserved
261332636	hypothetical protein, conserved
261332664	hypothetical protein, conserved
261332679	hypothetical protein, conserved
261332683	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
261332753	hypothetical protein, conserved
261332777	hypothetical protein, conserved
261332778	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
261332802	hypothetical protein, conserved
261332869	ubiquitin fusion degradation protein, putative
261332897	beta-adaptin, fragment, putative
261332900	hypothetical protein, conserved
261332949	hypothetical protein, conserved
261332952	flagellum transition zone component, putative
261333037	hypothetical protein, conserved
261333042	hypothetical protein, conserved
261333057	hypothetical protein, conserved
261333081	hypothetical protein, unlikely
261333095	hypothetical protein, conserved
261333153	hypothetical protein, conserved
261333209	T. brucei spp.-specific protein
261333210	hypothetical protein, conserved
261333317	hypothetical protein, conserved
261333345	ABC1 protein, putative
261333440	hypothetical protein, unlikely
261333458	hypothetical protein, conserved
261333514	DNA-directed RNA polymerases II subunit, putative
261333517	hypothetical protein, conserved
261333573	hypothetical protein, conserved
261333580	hypothetical protein, conserved
261333622	aconitase, putative
261333640	protein kinase, putative
261333667	hypothetical protein, conserved
261333781	kinesin, putative
261333840	hypothetical protein, conserved
261333928	hypothetical protein, conserved
261333989	hypothetical protein, conserved
261334007	hypothetical protein, conserved
261334008	calpain-like protein, putative, (fragment)
261334010	antigen, putative
261334036	hypothetical protein, conserved
261334137	hypothetical protein, conserved
261334157	dynein heavy chain, putative

261334184	hypothetical protein, conserved
261334237	dual-specificity protein kinase, putative
261334322	serine peptidase, clan SB, family S8-like protein, putative
261334355	hypothetical protein, conserved
261334377	hypothetical protein, conserved
261334384	hypothetical protein, conserved
261334437	hypothetical protein, conserved
261334465	hypothetical protein, conserved
261334471	hypothetical protein, conserved
261334515	hypothetical protein, conserved
261334539	hypothetical protein, conserved
261334582	eukaryotic release factor 3, putative
261334619	hypothetical protein, conserved
261334627	hypothetical protein, conserved
261334711	neurobeachin/beige protein, putative
261334779	endonuclease/exonuclease/phosphatase, putative
261334841	hypothetical protein, conserved
261334928	hypothetical protein, unlikely
261334975	hypothetical protein, conserved
261335000	hypothetical protein, conserved
261335023	actin-like protein, putative
261335046	hypothetical protein, conserved
261335089	ATP-dependent helicase, putative
261335105	hypothetical protein, conserved
261335114	hypothetical protein, conserved
261335193	minichromosome maintenance (MCM) complex subunit,putative
261335242	RNA helicase, putative
261335250	hypothetical protein, conserved
261335256	minichromosome maintenance (MCM) complex subunit,putative
261335296	hypothetical protein, conserved
261335309	T. brucei spp.-specific protein
261335313	ubiquitin ligase, putative
261335318	hypothetical protein, conserved
261335347	hypothetical protein, unlikely
261335384	hypothetical protein, conserved
261335514	hypothetical protein, conserved
261335519	RNA guanylyltransferase
261335528	DEAD/DEAH box helicase, putative
261335559	hypothetical protein, conserved
261335599	hypothetical protein, conserved
261335659	hypothetical protein, conserved
261335673	hypothetical protein, conserved
261335680	hypothetical protein, conserved
261335763	hypothetical protein, conserved
262368067	Chain U, Crystal Structure Of Archaeal 20s Proteasome In Complex With Mutated P26 Activator
33348181	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
33348218	leucine-rich repeat protein (LRRP), putative
33348262	hypothetical protein Tb927.2.1290
33348344	small GTP-binding protein RAB6, putative
33348357	phosphatidylinositol kinase domain protein, putative
33348365	hypothetical protein, conserved
33348370	hypothetical protein, conserved
33348403	protein kinase, putative
33348498	hypothetical protein, conserved

33348528	chaperone protein DNAJ, putative
33348555	NUP-1 protein, putative
33348570	hypothetical protein, conserved
33348580	hypothetical protein, conserved
33348678	hypothetical protein, conserved
33348682	hypothetical protein, conserved
33348695	hypothetical protein, conserved
343033671	esag6
359545650	Chain D, Crystallographic Structure Of Gm23, Mutant G89d.
449802196	Chain C, High-resolution Cryo-electron Microscopy Structure Of The Trypanosoma Brucei Ribosome
449802239	Chain U, High-resolution Cryo-electron Microscopy Structure Of The Trypanosoma Brucei Ribosome
449802249	Chain e, High-resolution Cryo-electron Microscopy Structure Of The Trypanosoma Brucei Ribosome
449802250	Chain f, High-resolution Cryo-electron Microscopy Structure Of The Trypanosoma Brucei Ribosome
449802257	Chain m, High-resolution Cryo-electron Microscopy Structure Of The Trypanosoma Brucei Ribosome
46396074	RecName: Full=Adenylate kinase; Short=AK; AltName: Full=ATP-AMP transphosphorylase
469603288	variant surface glycoprotein 2020, partial
469603290	variant surface glycoprotein 2021, partial
469603308	variant surface glycoprotein 2031, partial
469603350	variant surface glycoprotein 2053, partial
469603372	variant surface glycoprotein 2064, partial
469603374	variant surface glycoprotein 2065, partial
469603418	variant surface glycoprotein 2088, partial
469603540	variant surface glycoprotein 2153, partial
469603560	variant surface glycoprotein 2165, partial
469603746	variant surface glycoprotein 2284, partial
469603840	variant surface glycoprotein 714, partial
469603858	variant surface glycoprotein 1839, partial
469603866	variant surface glycoprotein 2196, partial
469603878	variant surface glycoprotein 3006, partial
469603918	variant surface glycoprotein 3026, partial
469603956	variant surface glycoprotein 3045, partial
469603962	variant surface glycoprotein 3048, partial
469603990	variant surface glycoprotein 3064, partial
469603996	variant surface glycoprotein 3067, partial
469604002	variant surface glycoprotein 3070, partial
469604026	variant surface glycoprotein 3084, partial
469604102	variant surface glycoprotein 3123, partial
469604116	variant surface glycoprotein 3130, partial
469604200	variant surface glycoprotein 3172, partial
469604234	variant surface glycoprotein 3189, partial
469604256	variant surface glycoprotein 3200, partial
469604268	variant surface glycoprotein 3207, partial
469604316	variant surface glycoprotein 3234, partial
469604380	variant surface glycoprotein 3266, partial
469604386	variant surface glycoprotein 3269, partial
469604450	variant surface glycoprotein 3303, partial
469604524	variant surface glycoprotein 3344, partial
469604556	variant surface glycoprotein 3360, partial
469604566	variant surface glycoprotein 3365, partial
469604592	variant surface glycoprotein 3378, partial

469604692 variant surface glycoprotein 3429, partial
469604732 variant surface glycoprotein 3449, partial
469604824 variant surface glycoprotein 3495, partial
469604852 variant surface glycoprotein 3511, partial
469604858 variant surface glycoprotein 3514, partial
469604894 variant surface glycoprotein 3533, partial
469604964 variant surface glycoprotein 3571, partial
469605026 variant surface glycoprotein 3604, partial
469605060 variant surface glycoprotein 3621, partial
469605088 variant surface glycoprotein 3635, partial
469605218 variant surface glycoprotein 3702, partial
469605320 variant surface glycoprotein 3755, partial
469605340 variant surface glycoprotein 3766, partial
469605342 variant surface glycoprotein 3767, partial
469605358 variant surface glycoprotein 3776, partial
469605454 variant surface glycoprotein 326
469605670 variant surface glycoprotein 1006
469605696 variant surface glycoprotein 1021
469605756 variant surface glycoprotein 1053
469606006 variant surface glycoprotein 1181
469606044 variant surface glycoprotein 1200
469606084 variant surface glycoprotein 1220
469606142 variant surface glycoprotein 1252
469606144 variant surface glycoprotein 1253
469606200 variant surface glycoprotein 1282
469606224 variant surface glycoprotein 1294
469606244 variant surface glycoprotein 1305]
469606256 variant surface glycoprotein 1311, partial
469606350 variant surface glycoprotein 1359, partial
469606470 variant surface glycoprotein 1420
469606492 variant surface glycoprotein 1431
469606506 variant surface glycoprotein 1438
469606528 variant surface glycoprotein 1450
469606542 variant surface glycoprotein 1458, partial
469606626 variant surface glycoprotein 1501
469606642 variant surface glycoprotein 1510
469606658 variant surface glycoprotein 1519
469606718 variant surface glycoprotein 1551
469606848 variant surface glycoprotein 1620
469606876 variant surface glycoprotein 1634, partial
469606968 variant surface glycoprotein 1686
469606978 variant surface glycoprotein 1691
469607106 variant surface glycoprotein 1759
469607120 variant surface glycoprotein 1766
469607152 variant surface glycoprotein 1782
469607166 variant surface glycoprotein 1790
469607184 variant surface glycoprotein 1799
469607186 variant surface glycoprotein 1800
469607582 variant surface glycoprotein 328
469607710 variant surface glycoprotein 399
469607718 variant surface glycoprotein 405
469607748 variant surface glycoprotein 421
469607758 variant surface glycoprotein 426
469607764 variant surface glycoprotein 429
469607774 variant surface glycoprotein 434

469607802 variant surface glycoprotein 449
469607804 variant surface glycoprotein 451
469607852 variant surface glycoprotein 478
469607856 variant surface glycoprotein 480
469607864 variant surface glycoprotein 485
469607926 variant surface glycoprotein 520
469608014 variant surface glycoprotein 565
469608020 variant surface glycoprotein 568
469608022 variant surface glycoprotein 569
469608140 variant surface glycoprotein 630
469608184 variant surface glycoprotein 652
469608218 variant surface glycoprotein 672
469608224 variant surface glycoprotein 690
469608318 variant surface glycoprotein 822
523581484 variant surface glycoprotein
523581566 variant surface glycoprotein
523581582 variant surface glycoprotein
6094046 RecName: Full=60S ribosomal protein L27a; AltName: Full=L29
70800230 hypothetical protein, conserved
70800245 hypothetical protein, conserved
70800301 rev7, putative
70800305 pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative
70800310 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative
70800387 hypothetical protein, conserved
70800400 hypothetical protein, conserved
70800404 hypothetical protein, conserved
70800443 hypothetical protein, conserved
70800491 RNA-binding protein, putative
70800497 ABC transporter, putative
70800504 hypothetical protein, conserved
70800526 phosphatidylinositol 4-kinase alpha, putative
70800542 hypothetical protein Tb927.3.4180
70800550 hypothetical protein, conserved
70800551 hypothetical protein, conserved
70800558 diphthamide synthesis protein, putative
70800559 hypothetical protein, conserved
70800585 hypothetical protein, conserved
70800595 hypothetical protein, conserved
70800619 kinesin, putative
70800635 hypothetical protein, conserved
70800638 hypothetical protein, conserved
70800659 hypothetical protein, conserved
70800707 retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
70800714 hypothetical protein, conserved
70800725 phosphatidylinositol 3-kinase tor, putative
70800760 ubiquitin-protein ligase, putative
70800763 hypothetical protein, conserved
70800765 hypothetical protein, conserved
70800858 hypothetical protein, conserved
70800871 hypothetical protein, conserved
70800923 hypothetical protein, conserved
70800934 multidrug resistance-associated protein, putative
70800948 hypothetical protein, conserved
70800956 kinesin, putative
70801045 serine/threonine-protein phosphatase PP1, putative

70801072	ATP-dependent RNA helicase, putative
70801105	small GTP-binding rab protein, putative
70801108	UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase, putative
70801161	hypothetical protein, conserved
70801183	calreticulin, putative
70801214	hypothetical protein Tb927.4.5330
70801215	hypothetical protein, conserved
70801233	variant surface glycoprotein (VSG)-related, putative
70801264	hypothetical protein, conserved
70801320	hypothetical protein, conserved
70801376	hypothetical protein, conserved
70801408	hypothetical protein Tb927.5.2000
70801444	hypothetical protein, conserved
70801450	hypothetical protein, conserved
70801456	hypothetical protein, conserved
70801459	hypothetical protein, conserved
70801516	hypothetical protein Tb927.5.3100
70801519	hypothetical protein Tb927.5.3130
70801524	hypothetical protein, conserved
70801536	hypothetical protein, conserved
70801651	hypothetical protein, conserved
70801744	hypothetical protein Tb927.6.860
70801747	hypothetical protein, conserved
70801775	hypothetical protein, conserved
70801847	hypothetical protein, conserved
70801914	hypothetical protein, conserved
70802043	hypothetical protein, conserved
70802246	hypothetical protein, conserved
70802258	hypothetical protein, conserved
70802269	hypothetical protein, conserved
70802288	hypothetical protein, conserved
70802355	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
70802369	GMP synthase, putative
70802376	hypothetical protein, conserved
70802398	hypothetical protein, conserved
70802453	histone H2A, putative
70802470	transporter protein, putative
70802492	hypothetical protein, conserved
70802524	protein kinase, putative
70802533	hypothetical protein, conserved
70802581	hypothetical protein, conserved
70802617	hypothetical protein, conserved
70802648	hypothetical protein, conserved
70802670	hypothetical protein, conserved
70802674	hypothetical protein, conserved
70802683	hypothetical protein, conserved
70802692	hypothetical protein, conserved
70802720	hypothetical protein, conserved
70802724	kinesin, putative
70802748	hypothetical protein, conserved
70802768	hypothetical protein, conserved
70802789	hypothetical protein, conserved
70802810	variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative
70802812	hypothetical protein, conserved
70802823	hypothetical protein, conserved

70802831	hypothetical protein, conserved
70802856	hypothetical protein, conserved
70802861	hypothetical protein, conserved
70802866	hypothetical protein Tb927.7.7100
70802867	leucine-rich repeat protein (LRRP), putative
70802880	hypothetical protein, conserved
70802889	hypothetical protein, conserved
70802927	hypothetical protein, conserved
70802972	hypothetical protein, conserved
70802980	hypothetical protein, conserved
70803002	hypothetical protein, conserved
70803101	ABC transporter, putative
70803102	hypothetical protein, conserved
70803140	hypothetical protein, conserved
70803158	hypothetical protein, conserved
70803181	hypothetical protein, conserved
70803186	dynein heavy chain, putative
70803214	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], glycosomal
70803222	hypothetical protein, conserved
70803231	hypothetical protein, conserved
70803260	hypothetical protein, conserved
70803285	hypothetical protein, conserved
70803305	mitochondrial carrier protein, putative
70803307	hypothetical protein, conserved
70803334	amino acid transporter, putative
70803355	kinesin, putative
70803376	hypothetical protein, conserved
70803424	hypothetical protein, conserved
70803465	hypothetical protein, conserved
70803497	hypothetical protein, conserved
70803504	RNA-binding protein, putative
70803522	hypothetical protein, conserved
70803532	hypothetical protein, conserved
70803543	kinesin, putative
70803593	trans-sialidase, putative
70803617	hypothetical protein, conserved
70803633	hypothetical protein, conserved
70803650	hypothetical protein, conserved
70803685	hypothetical protein, conserved
70803686	calpain, putative
70830747	variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative
70830942	hypothetical protein, conserved
70830983	hypothetical protein, unlikely
70831284	hypothetical protein, conserved
70831429	minichromosome maintenance (MCM) complex subunit, putative
70831581	hypothetical protein, conserved
70831610	hypothetical protein, conserved
70831633	hypothetical protein, conserved
70831723	hypothetical protein, conserved
70831729	phosphoinositide-binding protein, putative
70831850	hypothetical protein Tb09.244.2550
70831857	BARP protein
70831904	hypothetical protein, unlikely
70831980	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
70831983	hypothetical protein, conserved

70831998 hypothetical protein, conserved
70832166 hypothetical protein Tb10.70.5240
70832229 hypothetical protein, conserved
70832264 hypothetical protein, conserved
70832270 hypothetical protein, conserved
70832282 NADH-dependent fumarate reductase, putative
70832301 hypothetical protein, conserved
70832372 elongation factor 2
70832379 EIF3-interacting protein, putative
70832428 protein kinase, putative
70832500 hypothetical protein Tb10.70.1030
70832614 myo-inositol-1-phosphate synthase, putative
70832795 hypothetical protein, conserved
70832811 isoleucyl-tRNA synthetase, putative
70832848 hypothetical protein, conserved
70833039 hypothetical protein, conserved
70833072 syntaxin, putative
70833173 calpain-like cysteine peptidase, putative
70833254 tubulin tyrosine ligase protein, putative
70833320 hypothetical protein, conserved
70833346 mitochondrial carrier protein, putative
70833385 hypothetical protein, conserved
70833387 protein kinase, putative
70833489 variant surface glycoprotein
70833525 transcription factor, putative
70833580 chaperone protein DNAJ, putative
70833661 cation transporter protein, putative
70833881 hypothetical protein, conserved
70833906 hypothetical protein Tb11.02.2020
70833911 long-chain-fatty acid-CoA ligase protein, putative
70833926 calpain-like protein, putative
70833976 hypothetical protein, conserved
70833995 protein kinase, putative
70834170 hypothetical protein, conserved
70834247 minichromosome maintenance (MCM) complex subunit, putative
70834368 DNA topoisomerase III, putative
70834372 hypothetical protein, conserved
70834507 hypothetical protein, conserved
70834516 hypothetical protein, conserved
70834544 hypothetical protein, conserved
70834560 hypothetical protein, conserved
70834592 trans-sialidase, putative
70834605 DNA topoisomerase II, putative
70834618 vacuolar ATP synthase subunit B, putative
70834629 hypothetical protein, conserved
70834643 cytochrome oxidase assembly protein, putative
70834860 hypothetical protein, conserved
70834956 hypothetical protein, conserved
70835062 hypothetical protein Tb11.01.7870
70835069 hypothetical protein, conserved
70835174 variant surface glycoprotein (VSG), putative
70908171 variant surface glycoprotein (VSG), putative
70908176 variant surface glycoprotein (VSG), putative
70908249 hypothetical protein, conserved
70908275 variant surface glycoprotein (VSG), putative

71749583	hypothetical protein, partial
72385417	hypothetical protein
74831362	RecName: Full=Alpha-tubulin N-acetyltransferase

Tabla A6. Proteómica BS2-HisHA- *Tb*SUMO D

Identificación	Descripción
Tb08.27P2.220	VSG
Tb09.v4.0016	expression site associated gene 5 (ESAG5) protein, putative
Tb09.v4.0017,Tb 927.9.15930	rab1 (small gtp-binding protein rab1, putative), transporte núcleocitoplasma, chrIX additional; Ras small GTPasa//Rab1B
Tb10.v4.0042	Hipotética
Tb10.v4.0134	variant surface glycoprotein (VSG), putative
Tb11.0140	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative
Tb927.1.1670	Hipotética, armadillo repeat
Tb927.1.3030	KREL2/MP48/REL2, RNA editing ligase, RNA-editing complex protein, mitochondrial mRNA editing complex
Tb927.1.4340	Hipotética.
Tb927.1.4450	Hipotética. calcium-activated potassium channel activity
Tb927.1.4870	ESAG1
Tb927.10.11020	MSH2, DNA mismatch repair protein, putative
Tb927.10.11310	intraflagellar transport protein IFT55/IFT57, putative (required for the assembly and maintenance of eukaryotic cilia and flagella)
Tb927.10.11420	Hipotética
Tb927.10.11620	calcium-transporting ATPase, putative
Tb927.10.11660	Hipotética
Tb927.10.12180	Hipotética
Tb927.10.12200	Hipotética
Tb927.10.12460	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
Tb927.10.12890	bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase
Tb927.10.13150	Hipotética
Tb927.10.13280	Hipotética
Tb927.10.13330	paraflagellar rod component, putative (traceable author statement)
Tb927.10.13900	UDP-galactose transporter
Tb927.10.1470	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
Tb927.10.15680	Hipotética
Tb927.10.1610	Hipotética
Tb927.10.1890	calpain, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative. calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity
Tb927.10.2060	Hipotética
Tb927.10.2760	Hipotética. ATP binding
Tb927.10.3100	glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative
Tb927.10.3300	Hipotética, Pleckstrin homology domain containing protein (PH domain, una IP3)
Tb927.10.370	calcineurin B subunit, putative. unión a calcio. dominios: EF hand (musculo)
Tb927.10.3790	hypothetical protein, dominio armadillo
Tb927.10.3870	Hipotética. Dominios: WD40 repeat (scaffold for protein interactions; en E3 ubiquitin ligasas); EF hand (unión a calcio)
Tb927.10.3970	Hipotética. cell redox homeostasis. Dominio: Thioredoxin-like fold
Tb927.10.4170	Hipotética. Dominios: Type III secretion system, YscO (secretion protein); Q30KS2_CANFA_Q30KS2
Tb927.10.4600	predicted SET domain protein (presente en proteínas que metilan histonas); ATP binding
Tb927.10.5280	pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase; DEAH-box RNA helicase
Tb927.10.5640	Hipotética.
Tb927.10.6050	clathrin heavy chain
Tb927.10.6300	Hipotética. mitochondrial
Tb927.10.6440	phosphomannomutase, putative.
Tb927.10.7350	Hipotética.
Tb927.10.7490	cullin, putative

Tb927.10.7510	chromatin binding protein, putative. chromosome organization.nucleus.Ran GTPase binding
Tb927.10.7570	dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit
Tb927.10.8020	prolyl oligopeptidase
Tb927.10.8190	T-complex protein 1, theta subunit, putative (HSP60)
Tb927.10.8420	target of rapamycin (TOR) kinase 1 (Inferred from Sequence Orthology)
Tb927.10.8610	Hipotética
Tb927.10.8750	GTPase activating protein, putative.regulation of Rab GTPase activity
Tb927.10.9000	Hipotética
Tb927.10.9050	Hipotética.
Tb927.10.9490	expression site-associated gene 3 (ESAG3)-like protein
Tb927.10.9660	Hipotética.
Tb927.10.9890	Hipotética.
Tb927.11.10190	telomerase reverse transcriptase, putative
Tb927.11.10630	Hipotética
Tb927.11.10670	glycosyl hydrolase, putative.Dominios:Haloacid dehalogenase-like hydrolase;Glycoside hydrolase family 65, central catalytic
Tb927.11.10760	kinesin-like protein
Tb927.11.10900	MENG.ciliary or flagellar motility
Tb927.11.1160	Region in Clathrin and VPS
Tb927.11.11810	Hipotética
Tb927.11.11900	coatamer gamma subunit, putative.cytosolic coat protein, putative. retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER.COPI vesicle coat.Dominios: Clathrin/coatamer adaptor, adaptin-like, N-terminal;Armadillo-type fold(uni3n de sustratos grandes como prote3nas o ac.nucleicos)
Tb927.11.12310	protein kinase, putative.cdc2-related kinase, putative
Tb927.11.12620	Glucosidase II beta subunit-like
Tb927.11.12630	Hipotética
Tb927.11.13140	cytochrome oxidase subunit X, mitochondrial
Tb927.11.13550	Hipotética
Tb927.11.13620	Hipotética.mitochondrial.Dominio:Rhodanese-like(detoxifies cyanide by converting it to thiocyanate)
Tb927.11.13670	Hipotética.Dominios:IQ calmodulin-binding region;Concanavalin A-like lectin/glucanase
Tb927.11.13930	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3, putative;dominio:ribosomal protein S4; RNA binding S4
Tb927.11.14190	Hipotética.RNA-induced silencing complex? Dominios:tudor(en prote3nas q reconocen histonas metiladas), Staphylococcal nuclease (SNase-like)(union a ADN,simple cadena?),EBNA2 BINDING PROTEIN P100
Tb927.11.1420	Hipotética.Dominios: WD40 repeat(scaffold for protein interactions; en E3 ubiquitin ligasas)
Tb927.11.15470	methionyl-tRNA formyltransferase.mitochondria
Tb927.11.15830	Hipotética.
Tb927.11.17040	expression site-associated gene (ESAG) protein, putative (44 others) expression site-associated gene 4 (ESAG4) protein, putative (7 others) receptor-type adenylate cyclase, putative (6 others)
Tb927.11.17150	variant surface glycoprotein (VSG), frameshifted
Tb927.11.18230	variant surface glycoprotein (VSG), putative
Tb927.11.18260	variant surface glycoprotein (VSG), putative
Tb927.11.2890	Hipotética
Tb927.11.3130	glycosomal transporter (GAT2) (Inferred from Direct Assay); fatty acid transport
Tb927.11.3550	XPA-interacting protein, putative (GTPase)
Tb927.11.3850	AMP deaminase, putative.purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process.Dominios:Metallo-dependent hydrolases;Adenosine/AMP deaminase
Tb927.11.4380	ATP-dependent RNA helicase;DEAD/DEAH box RNA helicase
Tb927.11.5020	Hipotética, Zn finger RING type, Armadillo domain

Tb927.11.5060	Hipotética.
Tb927.11.5150	Hipotética.
Tb927.11.5740	formin, putative
Tb927.11.6050	Hipotética
Tb927.11.6830	Hipotética
Tb927.11.6980	Hipotética.
Tb927.11.7070	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase
Tb927.11.7211	SNF2 DNA repair protein
Tb927.11.7290	pantothenate kinase subunit, putative. coenzyme A biosynthetic process.ATP binding.Dominios:Endonuclease/exonuclease/phosphatas,Fumble (required for cell division in Drosophila)
Tb927.11.8120	protein transport protein SEC13
Tb927.11.840	Hipotética
Tb927.11.8990	cation transporter, putative.mitochondrial.Dominios: Zinc/iron permease
Tb927.11.9300	Hipotética
Tb927.11.9370	Hipotética
Tb927.11.9420	ATP synthase, putative.proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain
Tb927.11.9890	signal recognition particle receptor alpha subunit, putative
Tb927.2.1760	Hipotética.Dominios:EGF-like, type 3
Tb927.2.2380	Hipotética
Tb927.2.2400	Hipotética.mitochondrial
Tb927.2.2430	casein kinase II, alpha chain
Tb927.2.2650	Hipotética
Tb927.2.3320	65 kDa invariant surface glycoprotein
Tb927.2.3370	UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase, putative
Tb927.2.4090	Hipotética
Tb927.2.4230	NUP-1 protein, putative
Tb927.2.4240	GTP binding protein, putative, TGS like domain (dominio TGS relacionado con la superfamilia ubq-like)
Tb927.2.4760	Hipotética
Tb927.2.4950	Hipotética.translation initiation factor activity.
Tb927.2.4970	Hipotética
Tb927.2.5260	Hipotética
Tb927.2.6410	variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative
Tb927.3.1220	Hipotética
Tb927.3.2140	transcription activator, TAF1
Tb927.3.2210	Hipotética.Dominio: HEH2P(Inner nuclear membrane protein HEH2, YDR458C)
Tb927.3.2790	leucine-rich repeat protein (LRRP), putative.dominio de signaling, translation?
Tb927.3.2870	multicopper oxidase, putative
Tb927.3.3150	Hipotética
Tb927.3.4020	phosphatidylinositol 4-kinase alpha, putative (Inferred from Mutant Phenotype),phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor
Tb927.3.4030	Hipotética
Tb927.3.4960	kinesin, putative
Tb927.3.5170	Hipotética
Tb927.3.5210	Hipotética
Tb927.4.1060	Hipotética
Tb927.4.2510	multidrug resistance-associated protein, putative,p-glycoprotein. cadmium ion transport. ATP-binding cassette (ABC) transporter complex
Tb927.4.3870	receptor-type adenylate cyclase GRESAG 4, putative
Tb927.4.3940	calpain-like cysteine peptidase, putative.cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative.union a calcio.
Tb927.4.410	CAF 40 (Inferred from Experiment).Dominio:Cell differentiation proteins, Rcd1-like
Tb927.4.4130	Hipotética.Dominio:Q806D4_9VIRU_Q806D4
Tb927.4.470	snoRNP protein GAR1, putative(rRNA processing, rRNA binding,small nucleolar

	ribonucleoprotein complex)
Tb927.4.5530	variant surface glycoprotein (VSG), putative
Tb927.4.840	Hipotética
Tb927.5.1320	Hipotética.
Tb927.5.1560	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
Tb927.5.1590	Hipotética.
Tb927.5.2420	Hipotética.
Tb927.5.2440	Hipotética.role in flagellar motility(Inferred from Mutant Phenotype)
Tb927.5.2520	Hipotética
Tb927.5.2660	Hipotética
Tb927.5.2920	Hipotética.Zinc ion binding.Dominios:Zinc finger, ZZ-type;Zinc finger, RING-type; Zinc finger, SWIM-type;Zinc finger, C3HC4 RING-type
Tb927.5.310	Hipotética.
Tb927.5.330b	receptor-type adenylyate cyclase, putative; expression site associated gene (ESAG) 4 protein
Tb927.5.3580	phosphoglycerate mutase protein, putative
Tb927.6.1120	Hipotética
Tb927.6.1440	Hipotética
Tb927.6.250	Hipotética.
Tb927.6.2600	Hipotética
Tb927.6.280	receptor-type adenylyate cyclase GRESAG 4, putative
Tb927.6.2880	kinesin, putative
Tb927.6.2930	Hipotética.ATPasa
Tb927.6.3150	Hydin, flagellar component
Tb927.6.3520	Hipotética
Tb927.6.3980	Hipotética
Tb927.6.4430	homoserine kinase, putative.Dominios: Ribosomal protein S5 domain 2-type fold,GHMP kinase
Tb927.6.4750	Hipotética
Tb927.6.4770	protein mkt1, putative.DNA repair,nuclease activity,cytoplasm
Tb927.6.680	Hipotética
Tb927.7.1010	Hipotética
Tb927.7.1030	heat shock 70 kDa protein, putative.ATP binding
Tb927.7.1190	regulator of chromosome condensation, putative
Tb927.7.1570	Hipotética.péptido señal.
Tb927.7.1780	Adenine phosphoribosyltransferase, putative
Tb927.7.2160	Hipotética
Tb927.7.2580	zinc finger protein family member, putative.RNA binding
Tb927.7.2630	Hipotética
Tb927.7.3330	Hipotética.transcription regulator activity .vesicle-mediated transport.nucleus
Tb927.7.3770	Hipotética
Tb927.7.3860	Hipotética, dominio Cystinosin/ERS1p repeat(transport cystine out of lysosomes), dominioMannose-P-dolichol utilization defect 1 protein
Tb927.7.4110	kinesin, putative
Tb927.7.4450	Hipotética
Tb927.7.4630	Hipotética.GTP binding.Dominio: ARF/SAR superfamily
Tb927.7.5070	Hipotética
Tb927.7.530	FYVE zinc finger, putative
Tb927.7.5560	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase, putative
Tb927.7.560	Hipotética
Tb927.7.580	GTP-binding protein, putative
Tb927.7.7510	Hipotética
Tb927.8.1130	protein phosphatase with EF-Hand domains, putative
Tb927.8.1580	Hipotética
Tb927.8.1860	pitrilysin-like metalloprotease, metallo-peptidase, Clan ME, Family M16C.mitochondrial

Tb927.8.2060	Hipotética
Tb927.8.2360	Hipotética.
Tb927.8.2450	Hipotética.Dominios:5-AMP-activated protein kinase, beta subunit, complex-interacting región
Tb927.8.2890	Hipotética, calponin homology domain (dominio de unión a actina)
Tb927.8.3190	Hipotética
Tb927.8.3290	DNA polymerase zeta catalytic subunit, putative
Tb927.8.3630	folate transporter, putative ; expression site-associated gene 10 (ESAG10) protein, putative, bipterin transporter activity
Tb927.8.3940	Hipotética
Tb927.8.4350	Hipotética
Tb927.8.4500	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, putative (Inferred from Sequence Alignment)
Tb927.8.4780	Hipotética, repetitive motif.Dominio Q30KS2_CANFA_Q30KS2;
Tb927.8.5580	Hipotética, dominios: galactosa-binding like;Dysferlin, C-terminal(reparación de músculo esquelético)
Tb927.8.5640	Hipotética
Tb927.8.6310	Hipotética.heat shock protein binding
Tb927.8.6840	mismatch repair protein MLH1
Tb927.8.6970	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha subunit, putative .mitochondrial
Tb927.8.7540	Hipotética, Retrotransport Hot Spot protein
Tb927.8.8000	Hipotética
Tb927.8.8140	small GTP-binding rab protein, putative.Dominios:Ras small GTPase, Rho type
Tb927.8.910	Hipotética
Tb927.9.10190	Hipotética
Tb927.9.10530	Hipotética
Tb927.9.10670	Bardet-Biedl syndrome 1 protein homolog (BBS1-like protein 1), putative
Tb927.9.10710	elongation factor 1-alpha, putative, hsp70 subfamily B suppressor 1
Tb927.9.10890	Hipotética.cAMP-dependent protein kinase regulator activity
Tb927.9.110	Hipotética.
Tb927.9.11000	small GTPase, putative.GTP-binding protein, putative.nucleocytoplasmic transport
Tb927.9.11120	Hipotética
Tb927.9.11410	60S ribosomal protein L23, putative
Tb927.9.11500	Hipotética
Tb927.9.12490	Hipotética.WD40 repeat(scaffold for protein interactions; en E3 ubiquitin ligasas);Calcium-binding EF-hand(union a calcio)
Tb927.9.12650	UBA2, ubiquitin-activating enzyme E1, putative
Tb927.9.13250	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative
Tb927.9.1500	protein kinase, putative
Tb927.9.15980	nucleoside transporter 1, putative (adenosine?);chrIX additional, unordered contigs
Tb927.9.16250	variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative
Tb927.9.17730	Hipotética.
Tb927.9.4580	Hipotética.
Tb927.9.6320	Hipotética
Tb927.9.8040	Hipotética.
Tb927.9.8400	predicted zinc finger protein
Tb927.9.9150	GTP-binding protein, putative

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Achcar, F., E. J. Kerkhoven, et al. (2014). "Trypanosoma brucei: meet the system." *Curr Opin Microbiol* 20: 162-169.
- Aillet, F., F. Lopitz-Otsoa, et al. (2012). "Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I κ B degradation and NF- κ B activity." *PLoS One* 7(12): e51672.
- Aitchison, N., S. Talbot, et al. (2005). "VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection." *Mol Microbiol* 57(6): 1608-1622.
- Akiyoshi, B. and K. Gull (2014). "Discovery of unconventional kinetochores in kinetoplastids." *Cell* 156(6): 1247-1258.
- Albuquerque, C. P., G. Wang, et al. (2013). "Distinct SUMO ligases cooperate with Esc2 and Slx5 to suppress duplication-mediated genome rearrangements." *PLoS Genet* 9(8): e1003670.
- Ambit, A., N. Fasel, et al. (2008). "An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression." *Cell Death Differ* 15(1): 113-122.
- Andrews, E. A., J. Palecek, et al. (2005). "Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage." *Mol Cell Biol* 25(1): 185-196.
- Annoura, T., T. Makiuchi, et al. (2012). "SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*." *PLoS One* 7(5): e37183.
- Arakawa, H., G. L. Moldovan, et al. (2006). "A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation." *PLoS Biol* 4(11): e366.
- Bakshi, R. P. and T. A. Shapiro (2004). "RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential." *Mol Biochem Parasitol* 136(2): 249-255.
- Barbosa, R. L., P. Legrand, et al. (2014). "RRP6 from *Trypanosoma brucei*: crystal structure of the catalytic domain, association with EAP3 and activity towards structured and non-structured RNA substrates." *PLoS One* 9(2): e89138.
- Barysz, H., J. H. Kim, et al. (2015). "Three-dimensional topology of the SMC2/SMC4 subcomplex from chicken condensin I revealed by cross-linking and molecular modelling." *Open Biol* 5(2).
- Bayer, P., A. Arndt, et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." *J Mol Biol* 280(2): 275-286.
- Bayona, J. C., E. S. Nakayasu, et al. (2011). "SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins." *Mol Cell Proteomics* 10(12): M110 007369.
- Becker, J., S. V. Barysch, et al. (2013). "Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues." *Nat Struct Mol Biol* 20(4): 525-531.
- Benson, M. D., Q. J. Li, et al. (2007). "SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1805-1810.
- Bernier-Villamor, V., D. A. Sampson, et al. (2002). "Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1." *Cell* 108(3): 345-356.
- Berriman, M., E. Ghedin, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." *Science* 309(5733): 416-422.

- Blomster, H. A., S. Y. Imanishi, et al. (2010). "In vivo identification of sumoylation sites by a signature tag and cysteine-targeted affinity purification." *J Biol Chem* 285(25): 19324-19329.
- Bodley, A. L., A. K. Chakraborty, et al. (2003). "An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 7539-7544.
- Borst, P. (2002). "Antigenic variation and allelic exclusion." *Cell* 109(1): 5-8.
- Bruderer, R., M. H. Tatham, et al. (2011). "Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates." *EMBO Rep* 12(2): 142-148.
- Brun, R. and Schonenberger (1979). "Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication." *Acta Trop* 36(3): 289-292.
- Bylebyl, G. R., I. Belichenko, et al. (2003). "The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast." *J Biol Chem* 278(45): 44113-44120.
- Caruthers, J. M. and D. B. McKay (2002). "Helicase structure and mechanism." *Curr Opin Struct Biol* 12(1): 123-133.
- Ciechanover, A., Y. Hod, et al. (2012). "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. 1978." *Biochem Biophys Res Commun* 425(3): 565-570.
- Citro, S. and S. Chiocca (2013). "Sumo paralogs: redundancy and divergencies." *Front Biosci (Schol Ed)* 5: 544-553.
- Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." *EMBO J* 21(8): 1881-1888.
- Colasante, C., A. Robles, et al. (2007). "Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* 151(2): 193-204.
- Colby, T., A. Matthai, et al. (2006). "SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 142(1): 318-332.
- Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." *Nat Biotechnol* 26(12): 1367-1372.
- Cox, J., N. Neuhauser, et al. (2011). "Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment." *J Proteome Res* 10(4): 1794-1805.
- Cremona, C. A., P. Sarangi, et al. (2012). "Extensive DNA damage-induced sumoylation contributes to replication and repair and acts in addition to the mec1 checkpoint." *Mol Cell* 45(3): 422-432.
- Cross, G. A. (1975). "Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*." *Parasitology* 71(3): 393-417.
- Cross, G. A., L. E. Wirtz, et al. (1998). "Regulation of vsg expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* 91(1): 77-91.
- Cubenas-Potts, C. and M. J. Matunis (2013). "SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function." *Dev Cell* 24(1): 1-12.
- Chavez, A., V. George, et al. (2010). "Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution." *J Biol Chem* 285(16): 11922-11930.

- Cheng, C. H., Y. H. Lo, et al. (2006). "SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* 20(15): 2067-2081.
- Cheng, Y. H., C. N. Chuang, et al. (2013). "Three distinct modes of Mec1/ATR and Tel1/ATM activation illustrate differential checkpoint targeting during budding yeast early meiosis." *Mol Cell Biol* 33(16): 3365-3376.
- Chymkowitch, P., A. P. Nguea, et al. (2015). "Sumoylation of Rap1 mediates the recruitment of TFIID to promote transcription of ribosomal protein genes." *Genome Res* 25(6): 897-906.
- D'Amours, D., F. Stegmeier, et al. (2004). "Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA." *Cell* 117(4): 455-469.
- Dadke, S., S. Cotteret, et al. (2007). "Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation." *Nat Cell Biol* 9(1): 80-85.
- Das, A., H. Li, et al. (2006). "Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II." *Mol Biochem Parasitol* 150(2): 201-210.
- Das, A., Q. Zhang, et al. (2005). "Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression." *Mol Cell Biol* 25(16): 7314-7322.
- De Lange, T., A. Y. Liu, et al. (1983). "Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription?" *Cell* 34(3): 891-900.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1998). "SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation." *Mol Cell* 2(2): 233-239.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1999). "Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1." *J Biol Chem* 274(15): 10618-10624.
- Devaux, S., S. Kelly, et al. (2007). "Diversification of function by different isoforms of conventionally shared RNA polymerase subunits." *Mol Biol Cell* 18(4): 1293-1301.
- Dieckman, L. M., B. D. Freudenthal, et al. (2012). "PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA." *Subcell Biochem* 62: 281-299.
- Enserink, J. M. (2015). "Sumo and the cellular stress response." *Cell Div* 10: 4.
- Estevez, A. M., T. Kempf, et al. (2001). "The exosome of *Trypanosoma brucei*." *EMBO J* 20(14): 3831-3839.
- Estevez, A. M., B. Lehner, et al. (2003). "The roles of intersubunit interactions in exosome stability." *J Biol Chem* 278(37): 34943-34951.
- Flotho, A. and F. Melchior (2013). "Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease." *Annu Rev Biochem* 82: 357-385.
- Gali, H., S. Juhasz, et al. (2012). "Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork." *Nucleic Acids Res* 40(13): 6049-6059.
- Galisson, F., L. Mahrouche, et al. (2011). "A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells." *Mol Cell Proteomics* 10(2): M110 004796.
- Garcia-Dominguez, M. and J. C. Reyes (2009). "SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control." *Biochim Biophys Acta* 1789(6-8): 451-459.
- Garcia, V., S. E. Phelps, et al. (2011). "Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1." *Nature* 479(7372): 241-244.

- Gareau, J. R. and C. D. Lima (2010). "The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12): 861-871.
- Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 947-956.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" *Genes Dev* 18(17): 2046-2059.
- Golebiowski F., I. Matic, et al. (2009). "System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock." *Sci Signal* 2(72): ra24.
- Gong, X., A. Ahner, et al. (2016). "Non-native Conformers of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator NBD1 Are Recognized by Hsp27 and Conjugated to SUMO-2 for Degradation." *J Biol Chem* 291(4): 2004-2017.
- Goodson, M. L., Y. Hong, et al. (2001). "Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor." *J Biol Chem* 276(21): 18513-18518.
- Gostissa, M., A. Hengstermann, et al. (1999). "Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1." *EMBO J* 18(22): 6462-6471.
- Gunzl, A., T. Bruderer, et al. (2003). "RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*." *Eukaryot Cell* 2(3): 542-551.
- Guo, D., M. Li, et al. (2004). "A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes." *Nat Genet* 36(8): 837-841.
- Haglund, K. and I. Dikic (2005). "Ubiquitylation and cell signaling." *EMBO J* 24(19): 3353-3359.
- Haile, S., M. Cristodero, et al. (2007). "The subcellular localisation of trypanosome RRP6 and its association with the exosome." *Mol Biochem Parasitol* 151(1): 52-58.
- Haile, S., A. M. Estevez, et al. (2003). "A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs." *RNA* 9(12): 1491-1501.
- Hammarton, T. C., M. Engstler, et al. (2004). "The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology." *J Biol Chem* 279(23): 24757-24764.
- Harder, Z., R. Zunino, et al. (2004). "Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission." *Curr Biol* 14(4): 340-345.
- Hendriks, I. A., R. C. D'Souza, et al. (2014). "Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner." *Nat Struct Mol Biol* 21(10): 927-936.
- Herhaus, L. and I. Dikic (2015). "Expanding the ubiquitin code through post-translational modification." *EMBO Rep* 16(9): 1071-1083.
- Hershko, A., A. Ciechanover, et al. (1980). "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(4): 1783-1786.
- Hickey, C. M., N. R. Wilson, et al. (2012). "Function and regulation of SUMO proteases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(12): 755-766.
- Hietakangas, V., J. Anckar, et al. (2006). "PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1): 45-50.
- Hirumi, H. and K. Hirumi (1989). "Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers." *J Parasitol* 75(6): 985-989.

- Hoege, C., B. Pfander, et al. (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* 419(6903): 135-141.
- Hsiao, H. H., E. Meulmeester, et al. (2009). "'ChopNSpice,' a mass spectrometric approach that allows identification of endogenous small ubiquitin-like modifier-conjugated peptides." *Mol Cell Proteomics* 8(12): 2664-2675.
- Hu, H., Z. Yu, et al. (2014). "The Aurora B kinase in *Trypanosoma brucei* undergoes post-translational modifications and is targeted to various subcellular locations through binding to TbCPC1." *Mol Microbiol* 91(2): 256-274.
- Huang, G., P. N. Ulrich, et al. (2014). "Proteomic analysis of the acidocalcisome, an organelle conserved from bacteria to human cells." *PLoS Pathog* 10(12): e1004555.
- Impens, F., L. Radoshevich, et al. (2014). "Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(34): 12432-12437.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96(1): 23-28.
- Iyer, L. M., A. M. Burroughs, et al. (2006). "The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains." *Genome Biol* 7(7): R60.
- Jacobs, A. M., S. M. Nicol, et al. (2007). "SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1." *Oncogene* 26(40): 5866-5876.
- Johnson, E. S. (2004). "Protein modification by SUMO." *Annu Rev Biochem* 73: 355-382.
- Johnson, E. S. and A. A. Gupta (2001). "An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins." *Cell* 106(6): 735-744.
- Johnson, E. S., I. Schwiienhorst, et al. (1997). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." *EMBO J* 16(18): 5509-5519.
- Joseph, J., S. T. Liu, et al. (2004). "The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo." *Curr Biol* 14(7): 611-617.
- Kagey, M. H., T. A. Melhuish, et al. (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." *Cell* 113(1): 127-137.
- Kahyo, T., T. Nishida, et al. (2001). "Involvement of Pias1 in the sumoylation of tumor suppressor p53." *Mol Cell* 8(3): 713-718.
- Kamitani, T., H. P. Nguyen, et al. (1997). "Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule." *J Biol Chem* 272(22): 14001-14004.
- Kaufmann, D., A. Gassen, et al. (2012). "Regulation and spatial organization of PCNA in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Biophys Res Commun* 419(4): 698-702.
- Kelly, S., J. Reed, et al. (2007). "Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci." *Mol Biochem Parasitol* 154(1): 103-109.
- Kerscher, O., R. Felberbaum, et al. (2006). "Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180.
- Kim, E. T., K. K. Kim, et al. (2009). "Enhanced SUMOylation of proteins containing a SUMO-interacting motif by SUMO-Ubc9 fusion." *Biochem Biophys Res Commun* 388(1): 41-45.
- Klein, C. A., D. Droll, et al. (2013). "SUMOylation in *Trypanosoma brucei*." *PeerJ* 1: e180.

- Knipscheer, P., A. Flotho, et al. (2008). "Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination." *Mol Cell* 31(3): 371-382.
- Kolev, N. G., E. Ullu, et al. (2014). "The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*." *Cell Microbiol* 16(4): 482-489.
- Kolli, N., J. Mikolajczyk, et al. (2010). "Distribution and paralogue specificity of mammalian deSUMOylating enzymes." *Biochem J* 430(2): 335-344.
- Komander, D. and M. Rape (2012). "The ubiquitin code." *Annu Rev Biochem* 81: 203-229.
- Kooter, J. M. and P. Borst (1984). "Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes." *Nucleic Acids Res* 12(24): 9457-9472.
- Kotaja, N., U. Karvonen, et al. (2002). "PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases." *Mol Cell Biol* 22(14): 5222-5234.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lallemand-Breitenbach, V., M. Jeanne, et al. (2008). "Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway." *Nat Cell Biol* 10(5): 547-555.
- Lamarche, B. J., N. I. Orazio, et al. (2010). "The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance." *FEBS Lett* 584(17): 3682-3695.
- Landeira, D. and M. Navarro (2007). "Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Biol* 176(2): 133-139.
- Leach, C. A. and W. M. Michael (2005). "Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts." *J Cell Biol* 171(6): 947-954.
- Lee, F. Y., E. J. Faivre, et al. (2011). "Eliminating SF-1 (NR5A1) sumoylation in vivo results in ectopic hedgehog signaling and disruption of endocrine development." *Dev Cell* 21(2): 315-327.
- Lee, M. T. and J. Bachant (2009). "SUMO modification of DNA topoisomerase II: trying to get a CENSe of it all." *DNA Repair (Amst)* 8(4): 557-568.
- Lee, S. H., J. L. Stephens, et al. (2007). "A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism." *Nat Rev Microbiol* 5(4): 287-297.
- Leung, K. F., F. S. Riley, et al. (2011). "Ubiquitylation and developmental regulation of invariant surface protein expression in trypanosomes." *Eukaryot Cell* 10(7): 916-931.
- Li, B., A. Espinal, et al. (2005). "Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2." *Mol Cell Biol* 25(12): 5011-5021.
- Liao, S., T. Wang, et al. (2010). "The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is essential in cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*." *Exp Cell Res* 316(5): 704-715.
- Lin, D., M. H. Tatham, et al. (2002). "Identification of a substrate recognition site on Ubc9." *J Biol Chem* 277(24): 21740-21748.
- Lois, L. M. and C. D. Lima (2005). "Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1." *EMBO J* 24(3): 439-451.
- Lopez-Farfan, D., J. M. Bart, et al. (2014). "SUMOylation by the E3 Ligase TbSIZ1/PIAS1 Positively Regulates VSG Expression in *Trypanosoma brucei*." *PLoS Pathog* 10(12): e1004545.
- Lowell, J. E. and G. A. Cross (2004). "A variant histone H3 is enriched at telomeres in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* 117(Pt 24): 5937-5947.

- Mahajan, R., C. Delphin, et al. (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." *Cell* 88(1): 97-107.
- Mandava, V., J. P. Fernandez, et al. (2007). "Histone modifications in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* 156(1): 41-50.
- Mao, Y., M. Sun, et al. (2000). "SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4046-4051.
- Matic, I. and R. T. Hay (2012). "Detection and quantitation of SUMO chains by mass spectrometry." *Methods Mol Biol* 832: 239-247.
- Matic, I., J. Schimmel, et al. (2010). "Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif." *Mol Cell* 39(4): 641-652.
- Matunis, M. J., E. Coutavas, et al. (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." *J Cell Biol* 135(6 Pt 1): 1457-1470.
- Meluh, P. B. and D. Koshland (1995). "Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C." *Mol Biol Cell* 6(7): 793-807.
- Millar, C. B. and M. Grunstein (2006). "Genome-wide patterns of histone modifications in yeast." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 657-666.
- Minning, T. A., D. B. Weatherly, et al. (2009). "The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*." *BMC Genomics* 10: 370.
- Moldovan, G. L., B. Pfander, et al. (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." *Cell* 129(4): 665-679.
- Morelle, C., Y. Sterkers, et al. (2015). "The nucleoporin Mlp2 is involved in chromosomal distribution during mitosis in trypanosomatids." *Nucleic Acids Res.*
- Mukhopadhyay, D. and M. Dasso (2007). "Modification in reverse: the SUMO proteases." *Trends Biochem Sci* 32(6): 286-295.
- Mullen, J. R. and S. J. Brill (2008). "Activation of the Slx5-Slx8 ubiquitin ligase by poly-small ubiquitin-like modifier conjugates." *J Biol Chem* 283(29): 19912-19921.
- Nathan, D., K. Ingvarsdottir, et al. (2006). "Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications." *Genes Dev* 20(8): 966-976.
- Navarro, M. and G. A. Cross (1996). "DNA rearrangements associated with multiple consecutive directed antigenic switches in *Trypanosoma brucei*." *Mol Cell Biol* 16(7): 3615-3625.
- Navarro, M. and K. Gull (2001). "A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*." *Nature* 414(6865): 759-763.
- Navarro, M., X. Penate, et al. (2007). "Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*." *Trends Microbiol* 15(6): 263-270.
- Neuhauser, N., A. Michalski, et al. (2012). "Expert system for computer-assisted annotation of MS/MS spectra." *Mol Cell Proteomics* 11(11): 1500-1509.
- O'Brien, S. P. and M. P. DeLisa (2012). "Functional reconstitution of a tunable E3-dependent sumoylation pathway in *Escherichia coli*." *PLoS One* 7(6): e38671.
- O'Shea, J. P., M. F. Chou, et al. (2013). "pLogo: a probabilistic approach to visualizing sequence motifs." *Nat Methods* 10(12): 1211-1212.

- Obado, S. O., C. Bot, et al. (2011). "Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." *Nucleic Acids Res* 39(3): 1023-1033.
- Obado, S. O., M. C. Taylor, et al. (2005). "Functional mapping of a trypanosome centromere by chromosome fragmentation identifies a 16-kb GC-rich transcriptional "strand-switch" domain as a major feature." *Genome Res* 15(1): 36-43.
- Okada, S., M. Nagabuchi, et al. (2009). "Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry." *Plant Cell Physiol* 50(6): 1049-1061.
- Ouyang, J., E. Garner, et al. (2015). "Noncovalent interactions with SUMO and ubiquitin orchestrate distinct functions of the SLX4 complex in genome maintenance." *Mol Cell* 57(1): 108-122.
- Owerbach, D., E. M. McKay, et al. (2005). "A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation." *Biochem Biophys Res Commun* 337(2): 517-520.
- Pandya, U. M., R. Sandhu, et al. (2013). "Silencing subtelomeric VSGs by *Trypanosoma brucei* RAP1 at the insect stage involves chromatin structure changes." *Nucleic Acids Res* 41(16): 7673-7682.
- Pays, E. and D. P. Nolan (1998). "Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* 91(1): 3-36.
- Pelisch, F., R. Sonnevile, et al. (2014). "Dynamic SUMO modification regulates mitotic chromosome assembly and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*." *Nat Commun* 5: 5485.
- Penate, X., D. Lopez-Farfan, et al. (2009). "RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in *Trypanosoma brucei*." *EMBO Rep* 10(3): 252-257.
- Picard, N., V. Caron, et al. (2012). "Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta." *Mol Cell Biol* 32(14): 2709-2721.
- Pichler, A., P. Knipscheer, et al. (2005). "SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K." *Nat Struct Mol Biol* 12(3): 264-269.
- Potts, P. R. and H. Yu (2005). "Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair." *Mol Cell Biol* 25(16): 7021-7032.
- Prudden, J., S. Pebernard, et al. (2007). "SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability." *EMBO J* 26(18): 4089-4101.
- Psakhye, I. and S. Jentsch (2012). "Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair." *Cell* 151(4): 807-820.
- Rabellino, A., B. Carter, et al. (2012). "The SUMO E3-ligase PIAS1 regulates the tumor suppressor PML and its oncogenic counterpart PML-RARA." *Cancer Res* 72(9): 2275-2284.
- Rappsilber, J., M. Mann, et al. (2007). "Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips." *Nat Protoc* 2(8): 1896-1906.
- Reverter, D. and C. D. Lima (2004). "A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex." *Structure* 12(8): 1519-1531.
- Richard, P., S. Feng, et al. (2013). "A SUMO-dependent interaction between Senataxin and the exosome, disrupted in the neurodegenerative disease AOA2, targets the exosome to sites of transcription-induced DNA damage." *Genes Dev* 27(20): 2227-2232.

- Robinson, N. P., N. Burman, et al. (1999). "Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes." *Mol Cell Biol* 19(9): 5839-5846.
- Rodriguez, M. S., C. Dargemont, et al. (2001). "SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting." *J Biol Chem* 276(16): 12654-12659.
- Roscic, A., A. Moller, et al. (2006). "Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2." *Mol Cell* 24(1): 77-89.
- Rudenko, G. and L. H. Van der Ploeg (1989). "Transcription of telomere repeats in protozoa." *EMBO J* 8(9): 2633-2638.
- Sachdev, S., L. Bruhn, et al. (2001). "PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies." *Genes Dev* 15(23): 3088-3103.
- Saitoh, H. and J. Hinchey (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." *J Biol Chem* 275(9): 6252-6258.
- Saitoh, H., R. Pu, et al. (1997). "RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3736-3741.
- Saitoh, H., D. B. Sparrow, et al. (1998). "Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2." *Curr Biol* 8(2): 121-124.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." 2nd edition. Col Spring Harbour: Col Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Sapetschnig, A., G. Rischitor, et al. (2002). "Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1." *EMBO J* 21(19): 5206-5215.
- Schmidt, D. and S. Muller (2002). "Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2872-2877.
- Schulz, S., G. Chachami, et al. (2012). "Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions." *EMBO Rep* 13(10): 930-938.
- Shang, Q., C. Xu, et al. (2009). "Solution structure of SUMO from *Trypanosoma brucei* and its interaction with Ubc9." *Proteins* 76(1): 266-269.
- Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13225-13230.
- Shin, E. J., H. M. Shin, et al. (2012). "DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease." *EMBO Rep* 13(4): 339-346.
- Siegel, T. N., D. R. Hekstra, et al. (2009). "Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*." *Genes Dev* 23(9): 1063-1076.
- Sobko, A., H. Ma, et al. (2002). "Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis." *Dev Cell* 2(6): 745-756.
- Sohn, S. Y. and P. Hearing (2012). "Adenovirus regulates sumoylation of Mre11-Rad50-Nbs1 components through a paralog-specific mechanism." *J Virol* 86(18): 9656-9665.
- Song, J., L. K. Durrin, et al. (2004). "Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(40): 14373-14378.
- Stehmeier P. and S. Muller (2009). "Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling." *Mol Cell* 33(3): 400-409.

- Steinacher, R., F. Osman, et al. (2013). "Six8 removes Pli1-dependent protein-SUMO conjugates including SUMOylated topoisomerase I to promote genome stability." *PLoS One* 8(8): e71960.
- Stindt, M. H., S. Carter, et al. (2011). "MDM2 promotes SUMO-2/3 modification of p53 to modulate transcriptional activity." *Cell Cycle* 10(18): 3176-3188.
- Sun, H., J. D. Levenson, et al. (2007). "Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins." *EMBO J* 26(18): 4102-4112.
- Takahashi, Y., T. Kahyo, et al. (2001). "Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates." *J Biol Chem* 276(52): 48973-48977.
- Tammsalu, T., I. Matic, et al. (2014). "Proteome-wide identification of SUMO2 modification sites." *Sci Signal* 7(323): rs2.
- Tatham, M. H., M. C. Geoffroy, et al. (2008). "RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation." *Nat Cell Biol* 10(5): 538-546.
- Tatham, M. H., M. S. Rodriguez, et al. (2009). "Detection of protein SUMOylation in vivo." *Nat Protoc* 4(9): 1363-1371.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." *EMBO J* 19(1): 94-102.
- Turner, A. J., A. A. Knox, et al. (2009). "A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4." *Mol Cell Biol* 29(11): 3007-3017.
- Uchimura, Y., M. Nakamura, et al. (2004). "Overproduction of eukaryotic SUMO-1- and SUMO-2-conjugated proteins in *Escherichia coli*." *Anal Biochem* 331(1): 204-206.
- Uchimura, Y., M. Nakao, et al. (2004). "Generation of SUMO-1 modified proteins in *E. coli*: towards understanding the biochemistry/structural biology of the SUMO-1 pathway." *FEBS Lett* 564(1-2): 85-90.
- Ulrich, H. D. (2013). "New insights into replication clamp unloading." *J Mol Biol* 425(23): 4727-4732.
- Umaer, K., M. Ciganda, et al. (2014). "Ribosome biogenesis in african trypanosomes requires conserved and trypanosome-specific factors." *Eukaryot Cell* 13(6): 727-737.
- Uzunova, K., K. Gottsche, et al. (2007). "Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates." *J Biol Chem* 282(47): 34167-34175.
- Valenciano, A. L., A. C. Ramsey, et al. (2015). "Deviating the level of proliferating cell nuclear antigen in *Trypanosoma brucei* elicits distinct mechanisms for inhibiting proliferation and cell cycle progression." *Cell Cycle* 14(4): 674-688.
- van den Hoff, M. J., A. F. Moorman, et al. (1992). "Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival." *Nucleic Acids Res* 20(11): 2902.
- Vanhamme, L., P. Poelvoorde, et al. (2000). "Differential RNA elongation controls the variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* 36(2): 328-340.
- Vlachakis, D., A. Pavlopoulou, et al. (2014). "3D molecular modeling and evolutionary study of the *Trypanosoma brucei* DNA Topoisomerase IB, as a new emerging pharmacological target." *Genomics* 103(1): 107-113.
- Wang, C. Y. and J. X. She (2008). "SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis." *Diabetes Metab Res Rev* 24(2): 93-102.

- Weber, A. R., D. Schuermann, et al. (2014). "Versatile recombinant SUMOylation system for the production of SUMO-modified protein." *PLoS One* 9(7): e102157.
- Werner, A., A. Flotho, et al. (2012). "The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase." *Mol Cell* 46(3): 287-298.
- Werner, A., M. C. Moutty, et al. (2009). "Performing in vitro sumoylation reactions using recombinant enzymes." *Methods Mol Biol* 497: 187-199.
- Windecker, H. and H. D. Ulrich (2008). "Architecture and assembly of poly-SUMO chains on PCNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* 376(1): 221-231.
- Wirtz, E., S. Leal, et al. (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* 99(1): 89-101.
- Xie, Y., O. Kerscher, et al. (2007). "The yeast Hex3.Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation." *J Biol Chem* 282(47): 34176-34184.
- Yan, J. X., R. Wait, et al. (2000). "A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry." *Electrophoresis* 21(17): 3666-3672.
- Yang, S. H., A. Galanis, et al. (2006). "An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO." *EMBO J* 25(21): 5083-5093.
- Yang, S. H. and A. D. Sharrocks (2010). "The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif." *Mol Cell Biol* 30(9): 2193-2205.
- Yang, X., L. M. Figueiredo, et al. (2009). "RAP1 is essential for silencing telomeric variant surface glycoprotein genes in *Trypanosoma brucei*." *Cell* 137(1): 99-109.
- Ye, K., X. Zhang, et al. (2015). "Identification of enzymes involved in SUMOylation in *Trypanosoma brucei*." *Sci Rep* 5: 10097.
- Yuan, Y. F., R. Zhai, et al. (2014). "SUMO-1 plays crucial roles for spindle organization, chromosome congression, and chromosome segregation during mouse oocyte meiotic maturation." *Mol Reprod Dev* 81(8): 712-724.
- Yunus, A. A. and C. D. Lima (2009). "Purification of SUMO conjugating enzymes and kinetic analysis of substrate conjugation." *Methods Mol Biol* 497: 167-186.
- Yunus, A. A. and C. D. Lima (2009). "Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA." *Mol Cell* 35(5): 669-682.
- Zhang, F. P., L. Mikkonen, et al. (2008). "Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development." *Mol Cell Biol* 28(17): 5381-5390.
- Zhao, X. and G. Blobel (2005). "A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(13): 4777-4782.