

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**ESTUDIO DE ADAPTADORES MONOMÉRICOS
EN EL TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A
VACUOLAS LISOSOMALES EN *GIARDIA*
*LAMBLIA***

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
QUÍMICAS

POR

LIC. EN QUÍMICA CONSTANZA FELIZIANI

DIRECTORA: DRA. MARÍA CAROLINA TOUZ

Laboratorio de Microbiología e Inmunología

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

INIMEC- CONICET- U.N.C.



CÓRDOBA, 2015



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA CAROLINA TOUZ

COMISIÓN DE TESIS:

DRA. DIANA MASIH

DR. JOSÉ LUIS BOCCO

DR. JOSÉ LUIS DANIOTTI

*Gracias a las personas más importantes en mi vida,
que siempre me apoyaron y brindaron toda su ayuda,
con todo mi cariño esta Tesis se las dedico a ustedes:*

Mamá

Papá

Sofi

Caco

Yoyo

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta Tesis Doctoral son muchas las personas e instituciones, a las que me encantaría agradecerles por su apoyo, amistad, consejos, ánimo y compañía, porque fueron los pilares fundamentales en diferentes momentos durante en el desarrollo de este trabajo y me ayudaron para poder culminar este proyecto.

Quiero empezar agradeciendo a “Las Jefas del Labmi”, quienes en un primer momento depositaron su confianza en mí y me aceptaron para realizar el Practicanato Profesional y luego me dieron la posibilidad de llevar a cabo esta Tesis de Doctorado y formar parte de este maravilloso grupo de trabajo. En especial, mis agradecimientos a Caro, mi Directora, por su dedicación, apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para motivarme y guiar mis ideas con su experiencia, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación profesional y personal. También mi más sincero reconocimiento para Andrea por su importante aporte, por compartir sus conocimientos y participar activamente en el desarrollo de esta Tesis. ¡Gracias a las dos por ser como son!, por su amabilidad, generosidad, comprensión y los tantos consejos dados en estos años, que me permitieron crecer en el ámbito científico y como persona.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer más agradable el día a día, y hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio más entretenido y distendido para investigar. Muchas gracias a la “Primera Generación del Labmi” Romi, Ceci V., Ceci M., y Nahuel, fue un placer haberlos conocido y compartir con ustedes tantos momentos lindos, experimentos, charlas en las mesadas, mates, almuerzos y los “after lab”. También por las discusiones científicas y las otras no tanto, por su comprensión, contención y ayuda en momentos difíciles. Pero por sobre todas las cosas, gracias por su amistad, ¡los quiero mucho y los voy a extrañar! En especial, quiero agradecerle a “la Doc. Romi” por ser mi primera maestra en la mesada, por transmitirme toda su experiencia, ayudarme y aconsejarme. A Ceci Vranych “mi dbf”, por su generosidad infinita y su ayuda incondicional con los experimentos, por prestarme su oreja en momentos buenos y malos, por todas esas miradas cómplices en la mesada, por entenderme, aconsejarme, ¡porque sabes que te adoro y te voy extrañar! También a Lore, Nati y Gon, que si bien compartimos muy pocos meses, quiero darles las gracias por las discusiones científicas y las charlas con mate de por medio en este corto tiempo.

Mi reconocimiento para toda la gente linda del IMMF: jefes, becarios, técnicos y secretarios, por su amabilidad, generosidad y por hacerme sentir en este Instituto como en mi

casa. En especial a los laboratorios de los Dres. Bollo, Cambiaso, Carrer, Cáceres, Paglini, Diaz Añel, Lorenzo y López por facilitarme desinteresadamente aparatos, reactivos o protocolos y contribuir en este Trabajo de Tesis. En particular a Majo Virgolini, Franquito Mir, Carlita Cisterna, Flor Dadam, Flor Sanchez, Nacho Jausoro, Mariano Bisbal, Laura Gastaldi, Sole Ferreras, Guille Fernandez, Lujan Maseroni, Anahí Bignante, Flor Heredia, Vicky Rozes y Bela Palandri.

De manera especial quiero agradecerles a mis queridas amigas del Ferreyra, Majo, Elena, Flor y Lujan, por todas las charlas compartidas en los pasillos, las risas, los mates ricos y los no tan ricos, por sus consejos sinceros, comprensión y contención en el momento justo. ¡Agradezco infinitamente haberlas cruzado en este camino!

A Gonzalo Cuasollo y Cecilia Sampedro por su asistencia técnica en Microscopía, muchas gracias por transmitirme sus conocimientos con gentileza y paciencia.

A la Dra. Beverly Wendland, del Departamento de Biología de la Universidad Johns Hopkins, de Baltimore, porque sin conocerme me dió la posibilidad de realizar una pasantía en su laboratorio, por su ayuda generosa y su valiosa contribución a este Tesis. Particularmente mi reconocimiento a Joanna Sowiak, por ayudarme desde el primer día con mis experimentos, por su generosidad, amabilidad y contención, agradezco haberte conocido y valoro mucho tu amistad.

A la Dra. Adriana Lanfredi-Rangel del Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ de Salvador de Bahía, por permitirme llevar a cabo mis experimentos en su laboratorio, por compartir conmigo su conocimiento y gran experiencia en Inmuno-electro Microscopía en *Giardia*, otorgando un aporte fundamental a este Trabajo. También muchas gracias por haberme integrado a tu familia, haciendo más amena mi estadía.

Al Dr. Javier Valdez del CIQUIBIC, por permitirme terminar con los experimentos de levaduras en su laboratorio, por facilitarme reactivos, aparatos y protocolos y contribuir así a la finalización de esta Tesis.

A la comisión asesora, Dra. Diana Masih, Dr. José Luis Bocco y Dr. José Luis Daniotti por su seguimiento en estos 5 años y por la ayuda brindada a través de sugerencias o comentarios que lograron mejorar la calidad de este Trabajo de Tesis. También al Dr. Antonio Uttaro por su trabajo como evaluador externo y todas las sugerencias aportadas.

Mi reconocimiento a la Universidad Nacional de Córdoba, en especial a mi querida Facultad de Ciencias Químicas por darme la oportunidad de estudiar, ser un profesional y hacer un posgrado.

En lo personal, quiero agradecer por el amor y la contención de mi familia y amigos quienes fueron fundamentales durante estos 5 años:

A mis padres, Graciela y José, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por haberme apoyado en cada momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante, pero más que nada, por su amor. ¡Muchísimas gracias por todo! este trabajo ha sido posible gracias a ustedes.

A mis hermanos, Sofía y Franco, por estar conmigo y ayudarme siempre, por todos sus consejos y cariño, ¡simplemente gracias, los quiero mucho! También mi agradecimiento para mi cuñada, Vicky, por su gran aporte en todo lo relacionado al diseño, que fue fundamental para la presentación de esta Tesis.

Mi agradecimiento especial a Yoyo, mi compañero incondicional, por tenerme paciencia, confiar en mí, apoyarme siempre y alegrarte con mis logros. Muchas gracias por todos tus consejos en el momento justo. ¡Gracias por enseñarme cada día a ser mejor persona, te amo!

A mis amigas de la Facu: Juli, Ivi, Adri, Mari y Vicky por haber transitado conmigo este camino, por compartir esta experiencia juntas, por aconsejarme, contenerme y motivarme, ¡muchas gracias por el aguante, las adoro!

A TODOS USTEDES, ¡MUCHÍSMAS GRACIAS!

Esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento recibido, mediante subsidios y becas, por las siguientes instituciones:



ÍNDICE

PUBLICACIONES	1
PRESENTACIONES A CONGRESOS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	6
SUMMARY	7
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	9
<i>GIARDIA</i> , LA CLASIFICACIÓN	9
GIARDIASIS, LA ENFERMEDAD	12
BIOLOGÍA CELULAR	14
CICLO DE VIDA	14
EL QUISTE	15
EL TROFOZOÍTO	16
MORFOLOGÍA DEL TROFOZOÍTO	16
SUPERFICIE CELULAR	17
CITOESQUELETO	17
SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS	18
-RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	18
-VACUOLAS PERIFÉRICAS	19
-APARATO DE GOLGI	19
TRANSPORTE VESICULAR DE PROTEÍNAS	20
CLATRINA Y LAS PROTEÍNAS ADAPTADORAS	22
LA SUPERFAMILIA DE ADAPTADORES MONOMÉRICOS ENTH/ANTH/VHS	26
IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO ENTH	27
LOS DOMINIOS ENTH Y ANTH UNEN FOSFATIDILINOSITOL FOSFATO (PI3)	28
FUNCIÓN DE LOS MOTIVOS ENTH Y ANTH	29
ROLES ADICIONALES EN LA ENDOCITOSIS DE PROTEÍNAS QUE POSEEN EL MOTIVO ENTH O ANTH	31
FUNCIÓN ADICIONAL EN EL TRANSPORTE DESDE LA TGN HACIA LOS ENDOSOMAS/LISOSOMAS DE PROTEÍNAS PORTADORAS DEL DOMINIO ENTH	33
UNIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS A DOMINIOS E/ANTH	34
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
CAPÍTULO 2: IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA ENTH EN <i>G. LAMBLIA</i>	39
INTRODUCCIÓN	39
RESULTADOS	39
<i>GIARDIA</i> POSEE UNA PROTEÍNA RELACIONADA CON LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA ENTH	39
GLENTHP COMO MIEMBRO DE LA FAMILIA ENTH	44
GLENTHP SE OBSERVA EN EL CITOPLASMA Y EN LOS NÚCLEOS EN TROFOZOÍTOS DE <i>G. LAMBLIA</i>	44
GLENTHP INTERACCIONA CON CLATRINA	44
GLENTHP SE UNE A FOSFOINOSITOLES ESPECÍFICOS	47

GLENTHP PRESENTA CARACTERÍSTICAS DE EPSINA CLÁSICA PARTICIPANDO EN LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR.....	52
GLENTHP INTERACCIONA CON UBIQUITINA.....	52
GLENTHP INTERACCIONA CON AP-2.....	53
GLENTHP PARTICIPA EN LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR DE LDL.....	55
GLENTHP POSEE TAMBIÉN CARACTERÍSTICAS DE EPSINAR PARTICIPANDO EN TRANSPORTE DE PROTEÍNAS DESDE EL SITIO DE DIRECCIONAMIENTO HACIA LAS PVS.....	57
GLENTHP INTERACCIONA CON γ AP-1.....	58
GLENTHP PARTICIPA EN EL TRANSPORTE DESDE RE HACIA LAS PVS.....	59
CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GLENTHP ALTERA LA HOMEOSTASIS DE LAS PVS.....	60
LA FUNCIÓN DE GLENTHP ES CRÍTICA PARA EL CRECIMIENTO DE <i>GIARDIA</i>	62
GLENTHP ES TRANSPORTADA DENTRO Y FUERA DEL NÚCLEO DEPENDIENDO DE SU CAPACIDAD DE UNIR PIS.....	64
CONCLUSIONES PARCIALES.....	66
CAPÍTULO 3: ESTUDIO FUNCIONAL DE GLENTHP EN CÉLULAS DE LEVADURAS.....	68
INTRODUCCIÓN.....	68
FUNCIÓN DE GLENTHP EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	68
CICLO BIOLÓGICO DE <i>S. CEREVISIAE</i>	68
MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA ENTH/ANTH/VHS EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	70
RESULTADOS.....	71
GLENTHP SE EXPRESA CORRECTAMENTE EN <i>S. CEREVISIAE</i>	71
ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE GLENTHP COMO EPSINA CLÁSICA EN <i>S. CEREVISIAE</i>	72
GLENTHP NO ES CAPAZ DE COMPLEMENTAR CÉLULAS <i>ENT1ΔENT2Δ</i>	72
LAS MUTANTES GLENTH _{N107YP} Y GENTH _{N107Y} NO LOGRARON RESCATAR CÉLULAS <i>ENT1ΔENT2Δ</i> ..	75
GLENTHP NO INTERFIERE CON LA FUNCIÓN NORMAL DE ENT1/2.....	77
-LOCALIZACIÓN DE STE3 EN CÉLULAS SALVAJES.....	77
-POLIMERIZACIÓN DE ABP1 EN CÉLULAS SALVAJES.....	79
ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE GLENTHP COMO EPSINAR EN <i>S. CEREVISIAE</i>	81
LA EXPRESIÓN DE GLENTHP NO RESTABLECE LA LOCALIZACIÓN DE GFP-Cps1 EN EL LUMEN VACUOLAR DE CÉLULAS <i>ENT3ΔENT5Δ</i>	81
GLENTHP NO PARTICIPÓ EN LA MADURACIÓN FACTOR- α EN CÉLULAS <i>ENT3ΔENT5Δ</i>	82
GLENTHP PARTICIPA COMO UN ADAPTADOR NO-FUNCIONAL EN <i>S. CEREVISIAE</i>	85
-LA EXPRESIÓN DE GLENTHP AFECTÓ EL TRANSPORTE INTRACELULAR DE GFP-Cps1 EN CÉLULAS SALVAJES.....	86
-LA EXPRESIÓN DE GLENTHP INTERFIRIÓ EN LA MADURACIÓN DEL FACTOR- α EN CÉLULAS SALVAJES.....	86
CONCLUSIONES PARCIALES.....	87
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL.....	89
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES FINALES.....	98
CAPÍTULO 6: MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
CAPÍTULO 2.....	103
6.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS (IN SILICO).....	103
6.2 ORGANISMOS Y CULTIVO IN VITRO.....	103
6.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN EN <i>GIARDIA LAMBLIA</i>	104

6.3.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	104
6.3.2 EXPRESIÓN DE GLENTHP Y GLENTHK75AP EN <i>GIARDIA LAMBLIA</i>	105
6.3.3 DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GLENTHP EN <i>GIARDIA LAMBLIA</i>	107
6.3.4 CORTE DEL VECTOR E INSERTO UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	107
6.3.5 LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE CORTE	108
6.3.6 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES <i>XL-BLUE</i>	108
6.3.7 TRANSFORMACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	108
6.3.8 CHEQUEO DE COLONIAS POR PCR.....	108
6.3.9 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO.....	109
6.4 TRANSFECCIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>GIARDIA LAMBLIA</i> CEPA <i>WB/1267</i>	109
6.5 PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	109
6.6 PCR EN TIEMPO REAL.....	110
6.7 GENERACIÓN DEL ANTICUERPO POLICLONAL (ACP) ANTI-CLATRINA (GLCHC) EN <i>GIARDIA LAMBLIA</i>	111
6.7.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS	111
6.7.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Tx/6xHis- GLCHC.....	111
6.7.3 INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DEL AC POLICLONAL	112
6.8 INMUNOFUORESCENCIA (IF).....	112
6.9 ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN CUANTITATIVO (QCA: DEL INGLÉS QUANTITATIVE COLOCALIZATION ANALYSIS).....	113
6.10 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	114
6.11. INMUNOTRANSFERENCIA.....	114
6.12 ENSAYOS DE DOT-BLOT	114
6.13 ENSAYOS DE DOBLE HIBRIDO EN CÉLULAS DE LEVADURAS (YTH)	115
6.14 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP).....	116
6.15 ENSAYO BIOQUÍMICO DE INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA (PIP STRIPS™)	117
6.16 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	117
6.17 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PI3,4,5P ₃ Y PI4P	118
6.17.1 ESTIMULACIÓN CELULAR.....	118
6.17.2 DETECCIÓN DE PI3,4,5P ₃ Y PI4P	118
6.18 ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE BODIPY-LDL EN CÉLULAS TRANSGÉNICAS	118
6.19 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ÁCIDA ENDÓGENA MEDIANTE EL EMPLEO DEL SUSTRATO ELF 97.....	119
6.20 INMUNO-ELECTRO MICROSCOPIA (IEM)	120
6.21 CURVAS DE CRECIMIENTO.....	120
6.22 INHIBICIÓN DE LA FOSFATIDIL INOSITOL- 3- QUINASA (PI3K)	120
CAPÍTULO 3:	121
6.23 CEPAS Y VECTORES	121
6.24 EXPRESIÓN DE GLENTHP EN CÉLULAS DE LEVADURAS.....	123
6.25 ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN FENOTÍPICA EN CÉLULAS LETALES.....	125
6.26 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL MOTIVO ENTH	126
6.27 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES PARA SDS-PAGE E INMUNOTRANSFERENCIA.....	126
6.28 ENSAYOS DE TRANSPORTE DE PROTEÍNAS Y MICROSCOPÍA	127
CÉLULAS UTILIZADAS	127
FLUORESCENCIA	127
6.29 ENSAYO DEL FACTOR α	128
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	130

Parte de los resultados de este Trabajo de Tesis dieron origen a:

PUBLICACIONES

- **Feliziani C.**, Valdez Taubas J., Wendland B. and Touz M.C. "The expression of the giardial ENTH-protein GLENTHp produces an Ent3/Ent5p dominant-negative phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*". En preparación.
- **Feliziani C.**, Zamponi N., Gottig' N., Rópolo A.S., Lanfredi-Rangel A., Touz M.C. "The giardial ENTH protein participates in lysosomal protein trafficking and endocytosis". BBA-Molecular Cell Research 2015 Jan 6;1853(3):646-659
- Rivero M.R., Jausoro I., Bisbal M., **Feliziani C.**, Lanfredi-Rangel A., Touz M.C. "Receptor-mediated endocytosis and trafficking between endosomal-lysosomal vacuoles in *Giardia lamblia*." Parasitol Res 2013.
- Rivero M.R., Miras S.L., **Feliziani C.**, Zamponi N., Quiroga R., Hayes S.F., Rópolo A.S., and Touz M.C. "Vacuolar protein sorting receptor in *Giardia lamblia*". PLoS ONE 2012;7(8):e43712.
- **Feliziani C.**, Merino M.C., Rivero M.R., Hellman U., Pistoiresi-Palencia M.C., Rópolo A.S. "Immunodominant proteins α -1 giardin and β -giardin are expressed in both assemblages α and β of *Giardia lamblia*". BMC Microbiology 2011, 11:233.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- 2014. **Feliziani C.**, Zamponi N., Gottig' N., Rópolo A.S., Lanfredi-Rangel A., Touz M.C. "The giardial epsin-like protein possess a dual *epsin-epsinR* role in clathrin-mediated trafficking". Comunicación oral. L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. SAIB. Noviembre 2014. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- 2014. **Feliziani C.**, Zamponi N., Gottig' N., Rópolo A.S., Lanfredi-Rangel A., Touz M.C. "The giardial epsin-like protein possess a dual *epsin-epsinR* role in clathrin-mediated trafficking". Póster. X Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Noviembre 2014. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- 2014. **Feliziani C.**, Rópolo A.S., Wendland B., Touz M.C. "Functional conservation of the *Giardia lamblia* epsin-like protein in *Sacharomyces cerevisiae*". Póster. X Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Noviembre 2014. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- 2014. Touz M.C., Rópolo A.S., **Feliziani C.** "A Giardial ENTH Protein Regulates Vacuolar Homeostasis and Reveals a Bifunctional Role in Clathrin-Mediated Trafficking". Comunicación

oral. ICOPA2014 - 13th International Congress of Parasitology 2014. Agosto 2014. México DF, México.

- 2012. **Feliziani C.**, Zamponi N., Miras S., Lanfredi-Rangel A., Touz M.C. “Epsin-like protein: a novel clathrin associated protein in *Giardia lamblia*.” Comunicación oral. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. SAIB. 29 de octubre – 1 de noviembre. Mendoza, Argentina.
- 2012. **Feliziani C.**, Zamponi N., Miras S., Rópolo A.S., Lanfredi-Rangel A., Touz M.C. “A novel monomeric adaptor protein in *Giardia lamblia* with a dual epsin-like function”. Póster. GRC-Host parasite interaction. Salve Regina University. Junio 2012. Newport, RI, USA.
- 2011. **Feliziani C.**, Zamponi N., Miras S., Touz M.C. “Clathrin-associated protein in *Giardia lamblia*”. Póster. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. SAIB. 30 de octubre – 2 de noviembre. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.
- 2011. **Feliziani C.**, Miras S., Zamponi N., Touz M.C. “ENTH protein characterization in *Giardia lamblia*”. Póster. IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Noviembre 2011. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- 2010. **Feliziani C.**, Touz M.C., Ropolo A.S. “Study of molecules involved in the protein trafficking to lysosome-like vacuoles in *Giardia lamblia*”. Póster. XXIV Reunión Científica Anual. Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. SAP. Octubre 2010. Ascochinga, Córdoba. Argentina.
- 2009. **Feliziani C.**, Merino C., Touz M.C., and Ropolo A.S. “Generation and characterization of monoclonal antibodies specific to *Giardia lamblia* lysosome-like organelles”. Póster. XXIII Reunión Científica Anual. Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. SAP. Octubre 2009. Córdoba, Argentina.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-FAA:** ácido 5-fluoroantranílico (del inglés *5-Fluoroanthranilic Acid*).
- A:** Alanina.
- aa:** aminoácido.
- Abp1:** proteína Abp1 (del inglés *Actin binding protein 1*).
- Ac:** Anticuerpo.
- Acm:** Anticuerpo monoclonal.
- Acp:** Anticuerpo policlonal.
- AcPh:** enzima fosfatasa ácida (del inglés *Acid Phosphatase*).
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- ADNc:** Ácido Desoxirribonucleico copia del ARN.
- ANOVA:** análisis de varianza (del inglés *Analyse of variance*).
- ANTH:** dominio ANTH (del inglés *AP180 N-Terminal Homology Domain*).
- APs:** proteínas adaptadoras (del inglés *Adaptor Proteins*).
- ARN:** Ácido Ribonucleico.
- ARNdc:** Ácido Ribonucleico doble cadena.
- ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero.
- ARNt:** Ácido Ribonucleico de transferencia.
- BiP:** proteína BiP (del inglés *Immunoglobulin heavy chain-Binding Protein*).
- BLASTp:** programa BLASTp (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool protein*).
- BODIPY:** colorante fluorescente BODIPY (del inglés *Boron-dipyrromethene*).
- BSA:** albúmina sérica bovina (del inglés *Bovine Serum Albumin*).
- CALM:** proteína CALM (del inglés *Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia*).
- CCs:** cubiertas de clatrina (del inglés *Clathrin Coat*).
- CCVs:** vesículas recubiertas de clatrina (del inglés *Clathrin Coating Vesicles*).
- CDC:** Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (del inglés *Centers for Disease Control*).
- CHC:** cadena pesada de clatrina (del inglés *Clathrin Heavy Chain*).
- CLASP:** proteínas de direccionamiento asociadas a clatrina (del inglés *Clathrin Associated Sorting Proteins*).
- Cps1:** proteína Carboxipeptidasa S 1.
- CT:** número de ciclo de la PCR en el cual la cantidad de producto amplificado cruza el umbral establecido (del inglés *Cycle Threshold*).
- CWPs:** proteínas de la pared del quiste (del inglés *Cyst Wall Proteins*).
- DAPI:** marcador fluorescente de núcleo (del inglés *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*).
- DIC:** microscopía de contraste de interferencia diferencial (del inglés *Differential Interference Contrast microscopy*).
- DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- DO:** Densidad Óptica.
- E:** ácido glutámico.
- EF-1 y 2:** factor de elongación 1 y 2 (del inglés *Elongation Factor 1 and 2*).
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal Growth Factor*).
- EGFR:** receptor de factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*).
- ELF 97:** sustrato ELF 97 (del inglés *Enzyme-Labeled-Fluorescence*).
- EMR:** Endocitosis Mediada por Receptor.
- ENac:** canal de sodio epitelial (del inglés *Epithelial Na channel*).
- ENTH:** dominio ENTH (del inglés *Epsin N-Terminal Homology Domain*).
- Epsina:** proteína que interacciona con Eps15 (del inglés *Eps15 Interacting*).
- EpsinaR:** proteína relacionada a epsina (del inglés *Epsin Related*).

ERES: sitios de salida del retículo endoplasmático (del inglés *ER-Exit Sites*).

ESCP: cisteína proteasa específica de enquistamiento (del inglés *Encystation-Specific Cysteine Protease*).

ESVs: vesículas específicas de enquistamiento (del inglés *Encystation-Specific Vesicles*).

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*).

GDB: base de datos del genoma de *Giardia* (del inglés, *Giardia Database*).

GDH: Glutamato Dehidrogenasa.

gENTH: dominio ENTH de *Giardia*.

GFP: proteína fluorescente verde (del inglés *Green Fluorescent Protein*).

GGAs: proteínas de unión al factor de ribosilación de ADP (del inglés *Golgi-localized, Gamma-ear-containing, ARF-binding proteins*).

GIDRP: proteína dinamina de *Giardia* (del inglés *Giardia lamblia Dynammin-Related Protein*).

GIENTHp: proteína ENTH de *Giardia* (del inglés *Giardia lamblia ENTH protein*).

GST: Glutatión S-Transferasa.

HA: epitope de hemaglutinina.

HAT: Hipoxantina-Aminopeptera-Timina.

HIP1: proteína HIP1 (del inglés *Huntingtin-Interacting Protein 1*).

HIS: Histidina.

HRP: peroxidasa de rábano (del inglés *Horseradish Peroxidase*).

HT: Homogenato de Trofozoítos.

IEM: Inmuno-Electro Microscopía.

IF: Inmunofluorescencia.

Ig: Inmunoglobulina.

IP: Inmunoprecipitación.

K: Lisina.

kDa: Kilodalton.

-L/-T: medio de crecimiento de levaduras carente de leucina y triptófano.

LB: medio de cultivo para bacterias Luria-Bertoni.

LDL: lipoproteína de baja densidad (del inglés *Low-Density Lipoprotein*).

LF: lactoferrina.

LFpep: péptidos de lactoferrina.

LiAc: acetato de litio.

LRP: receptor de lipoproteínas, relacionados a receptores de LDL (del inglés *Lipoprotein Receptor-related Protein*).

Ly294002: inhibidor de fosfatidil inositol quinasas.

M: coeficiente de solapamiento de Manders para el análisis de colocalización cuantitativa.

MP: Membrana Plasmática.

MRD: dominio rico en metionina (del inglés *Methionine-Rich Domain*).

MVB: cuerpo multivesicular (del inglés *Multivesicular Body*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

ORF: marco abierto de lectura (del inglés *Open Reading Frame*).

P: Prolina.

pb: pares de bases.

PBS: solución amortiguadora de fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polimerase Chain Reaction*).

PDIs: Proteínas Disulfuroisomerasas.

PI: fosfatidil inositol (del inglés *Phosphatidylinositol*).

PI3,4,5P₃: fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (del inglés *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*).

PI3K: enzima fosfatidil inositol 3 quinasa (del inglés *Phosphatidylinositol 3-Kinase*).

PI4,5P₂: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*).

PI4P: fosfatidil inositol 4 fosfato (del inglés *Phosphatidylinositol 4-phosphate*).

PIK: enzima fosfatidil inositol quinasa (del inglés *Phosphoinositide Kinases*).

PLZF: proteína PLZF (del inglés *Promyelocytic Leukemia Zn²⁺ Finger*).

PVs: Vacuolas periféricas (del inglés *Peripheral Vacuoles*).

Q: Glutamina.

QCA: análisis de colocalización cuantitativo (del inglés *Quantitative Colocalization Analysis*).

QDO: medio de crecimiento de levaduras carente de cuatro aminoácidos (del inglés *media Quadruple Dropout*).

RE: Retículo Endoplasmático.

RT-PCR: transcripción reversa del ARN seguida de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Retrotranscription-PCR*).

SAM: Solución Amortiguadora de Muestra.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*).

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

SNAP: programa SNAP (del inglés *Screening for Non-Acceptable Polymorphisms*).

T: Treonina.

TBS: solución amortiguadora de Tris-salino (del inglés *Tris Buffered Saline*).

TDO: medio de crecimiento de levaduras carente de tres aminoácidos (del inglés *media Triple Dropout*).

Tet: tetraciclina.

TGN: red trans del Golgi (del inglés *Trans-Golgi Network*).

TRP: Triptófano.

Ub: proteína Ubiquitina.

URA: Uracilo.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

VSPs: proteínas variables de superficie (del inglés *Variant Specific-Proteins*).

YNB: medio sintético YNB, para el crecimiento de levaduras (del inglés *Yeast Nitrogen Base*).

YPD: medio estándar YPD, para el crecimiento de levaduras (del inglés *Yeast Extract Peptone Dextrose*).

YTH: ensayos de doble híbrido en levadura (del inglés *Yeast Two Hybrid*).

Zn²⁺: Zinc.

RESUMEN

En este Trabajo de Tesis, hemos identificado un solo gen en *Giardia* que codifica una proteína que contiene el dominio conservado ENTH, el cual define a la familia de adaptadores monoméricos del tipo epsina. Este módulo está presente tanto en epsina como en las proteínas relacionadas a epsina (epsina R), cuyas funciones en la mayoría de las células eucariotas están relacionadas a la endocitosis y el transporte de proteínas desde el Golgi hacia los endosomas, respectivamente. En este estudio, encontramos que GIENThp (del inglés *Giardia lamblia* ENTH *protein*) está presente en el citosol y, de la misma manera que epsina, se asocia con la subunidad alfa de la AP-2, clatrina y ubiquitina, interactúa fuertemente con PI3,4,5P₃ y participa en la endocitosis mediada por receptor. También hallamos que GIENThp se une a la subunidad gamma de AP-1 y PI4P y está implicada en el tráfico desde el sitio de direccionamiento hacia las vacuolas lisosomales o PVs, tal como las proteínas del tipo epsinaR. Observamos asimismo que la alteración en la función de GIENThp afecta gravemente el crecimiento trofozoítos, mostrando además una acumulación inusual de material electrodensito en las PVs, lo que indica que GIENThp podría estar implicada en el mantenimiento de la homeostasis de estas vacuolas.

Por otra parte, debido a que muchos componentes de la maquinaria endocítica son estructural y funcionalmente conservados entre los organismos eucariotas, es que se utilizó el sistema de levaduras para explorar las similitudes como así también las particularidades de GIENThp como un miembro de la familia ENTH. En este Trabajo de Tesis, investigamos también si la doble función de GIENThp como epsina y epsinaR es conservada, utilizando como modelo la levadura *S. cerevisiae* que expresa dos homólogos de epsina, Ent1 y Ent2, y dos ortólogos de epsinaR, Ent3 y Ent5. Encontramos que la expresión de GIENThp (o solo su dominio de ENTH) no complementó el crecimiento de las levaduras en la cepa mutante *ent1Δent2Δ* ni restauró el defecto en el transporte vesicular en *ent3Δent5Δ*. Sin embargo, hallamos que la proteína en estudio actúa como una proteína no funcional dominante de Ent3/5 en la cepa de tipo salvaje, observando un defecto en la localización CPS1 y en la maduración de la feromona de apareamiento, el factor- α . Así, el hallazgo de que GIENThp actúa como una proteína dominante negativa de epsinaR en células de levadura, refuerza los datos filogenéticos que muestran que GIENThp pertenece a la subfamilia epsinaR, la cual estaba presente en todos los organismos eucariotas previo a su evolución en diferentes taxas.

SUMMARY

In this work, we have identified a single gene in *Giardia* encoding a protein containing an ENTH domain that defines monomeric adaptor proteins of the epsin family. This domain is present in the epsin or epsin-related (epsinR) adaptor proteins, which are implicated in endocytosis and Golgi-to-endosome protein trafficking, respectively, in other eukaryotic cells. We found that GIENThp (for *Giardia lamblia* ENTH protein) is localized in the cytosol and, like epsin, was associated with the alpha subunit of AP-2, clathrin and ubiquitin, strongly interacted with PI3,4,5P₃, and was involved in receptor-mediated endocytosis. It also bonded the gamma subunit of AP-1 and PI4P, and was implicated in ER-to-PV trafficking, like epsinR proteins. Alteration of the GIENThp function severely affected trophozoite growth showing an unusual accumulation of dense material in the lysosome-like peripheral vacuoles (PVs), indicating that GIENThp might be implicated in the maintenance of PV homeostasis.

Because many components of the endocytic machinery are structurally and functionally conserved between eukaryotes, the yeast system was used to explore the similarities as well as the particularities of GIENThp as a member of the epsin family. The yeast *S. cerevisiae* expresses two homologs of epsin, Ent1 and Ent2, and two orthologs of epsinR, Ent3 and Ent5. Although the expression of GIENThp (or its ENTH domain alone) neither complemented growth in *ent1Δent2Δ* mutant nor restored GFP-CPS1 vacuolar protein trafficking defect in *ent3Δent5Δ*, it resulted in an Ent3/5 dominant non-functional phenotype in a wild type strain. This phenotype is linked to a defect in CPS1 localization and α -factor mating pheromone maturation. The finding that GIENThp acts as a dominant negative protein epsinR in yeast cells reinforce the phylogenetic data showing that GIENThp belongs to the epsinR subfamily present in eukaryotes prior to its evolution in different taxa.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

Una característica que define a las células eucariotas es la compartimentalización de su citoplasma en distintas organelas asociadas a membrana. Con el objetivo de mantener estos compartimentos, las células han desarrollado mecanismos para asegurar que las proteínas específicas sean dirigidas a organelas determinadas. Así, la compartimentalización subcelular se convirtió en un rasgo esencial en estos organismos, permitiendo la interrelación correcta de ciertos componentes intracelulares y posibilitando que las reacciones ocurran de manera eficiente y ordenadas [4]. En este sentido, se conoce que en la mayoría de los organismos eucariotas, los lípidos y las proteínas son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) y alcanzan la organela de destino una vez que han sido seleccionados y dirigidos desde el aparato de Golgi, que es el punto de clasificación más importante en la vía secretora. Además, dentro de los compartimentos intracelulares, los endosomas y lisosomas forman parte del sistema central de la célula desempeñando papeles multifuncionales, ya que están involucrados en los procesos de fagocitosis, autofagia, endocitosis, reciclado y degradación [5, 6].

En este escenario, el éxito en el transporte selectivo de proteínas entre organelas posee especial relevancia en organismos parásitos, debido a que está involucrado en procesos vitales, específicos de éstos, como es el caso de la nutrición, el mantenimiento del equilibrio osmótico y la excreción y secreción de moléculas, entre otros, otorgándole una gran capacidad para adaptarse al medio y tomar ventaja ante su hospedador.

Giardia lamblia es un parásito de gran importancia no sólo porque es el causante de una enfermedad muy frecuente, la giardiasis, sino también porque es un organismo tempranamente divergente en la evolución [7]. Esta característica hace de éste un excelente modelo para el estudio de diferentes procesos celulares en eucariotas, ya que muchos de los hallazgos que se obtengan en este modelo biológico permitirían hacer inferencias acerca del comportamiento que podrían tener los mismos fenómenos en organismos más complejos.

En este Trabajo de Tesis, se estudiará el transporte de proteínas a vacuolas lisosomales, llevado a cabo a través de adaptadores monoméricos en el parásito protozoario *Giardia lamblia*.

GIARDIA, LA CLASIFICACIÓN

Giardia fue descrita por primera vez en 1681 por el fundador de la microscopía moderna, el científico holandés *Anton Van Leewenhoek* quién utilizando un microscopio compuesto, que él mismo había inventado, observó al parásito en su propia materia fecal. Posteriormente, en el año

1859, este organismo fue descrito detalladamente por *Vilem Dusan Lambl*. Sin embargo, no fue sino hasta 1882 que el género *Giardia* fue reconocido como tal por *Johann Kunstler* [8]. Estudios sistemáticos basados en genética, estructura y bioquímica, revelaron que *Giardia* corresponde al Filum *Metamonada*, Subfilum *Trichozoa*, Superclase *Eopharyngia*, Clase *Trepomonadea*, Subclase *Diplozoa*, Orden *Giardiida* y Familia *Giardiidae* [9].

Dentro de los protozoarios, *G. lamblia* pertenece al grupo de los diplomonádidos, organismos de ambientes anaeróbicos o microaerófilos, descritos como verdaderos “fósiles vivientes” por la presencia de un código genético diferencial, la ausencia de una mitocondria aeróbica y de un aparato de Golgi típico. Además, conserva ciertas características propias de bacterias y arqueobacterias, como por ejemplo la presencia de enzimas metabólicas bacterianas. A través de estudios de comparación de ARN nucleolares pequeños de Arqueas y eucariotas unicelulares, se ubicó taxonómicamente a *Giardia* dentro de la rama *Excavata*, cerca del punto de divergencia entre bacterias y eucariotas. Estas características sumadas a análisis filogenéticos de los genes que codifican la subunidad menor de los ribosomas, la ATPasa vacuolar y los factores de elongación *EF-1* y *EF-2* (del inglés *Elongation Factor 1 and 2*) [10,11, 12], han sido utilizadas para definir a este parásito como una célula eucariota tempranamente divergente [13]. Sin embargo, para otros autores, estos hallazgos reflejan la adaptación a un ambiente microaerófilo más que a una divergencia temprana en la evolución [14-16]. En la actualidad, aún es tema de discusión si *G. lamblia* debe ser considerada como una célula eucariota ancestral y simple o como un ejemplo de eucariota complejo derivado de eventos de evolución reductiva. No obstante, la simplicidad y reducción de los sistemas eucariotas estándares presentes en este parásito acrecientan su importancia como un sistema modelo para el estudio de la maquinaria macromolecular de eucariotas.

Para poder comprender mejor la patogénesis y la epidemiología de la infección, resultaba crítica la apropiada clasificación de las diferentes especies de este parásito. Por este motivo, inicialmente se dividió al género *Giardia* en base al hospedador original del patógeno. Sin embargo, parásitos morfológicamente idénticos eran obtenidos a partir de diferentes especies animales, lo que sugería la necesidad de complementar los estudios para una clasificación más adecuada. Así, por ensayos de microscopía óptica y electrónica, se identificaron seis especies con características celulares y formas diferentes (**TABLA 1.1**) [17].

TABLA 1.1: ESPECIES DE *GIARDIA* DE ACUERDO A LOS HUÉSPEDES INVOLUCRADOS.

ESPECIES DE <i>GIARDIA</i>	HOSPEDADORES
<i>G. agilis</i>	anfibios
<i>G. ardeae</i> y <i>G. psittaci</i>	aves
<i>G. muris</i>	ratas y ratones
<i>G. microti</i>	ratón de campo
<i>G. lamblia</i>	hombre y otros mamíferos

Debido a la diversidad de hospedadores que infecta *G.lamblia*, algunos autores especularon que las características morfológicas en las que se basaba su clasificación enmascaraban en realidad a las características genéticas y de diversidad [18] , por lo que se generó una nueva nomenclatura que agrupa a genotipos cercanos en grupos genéticos o ensamblajes (TABLA 1.2), demostrándose por estudios moleculares que la mayoría de los genotipos presentaban diferentes preferencias por los hospedadores [19, 20].

TABLA 1.2: GRUPOS GENÉTICOS DE *GIARDIA* Y SUS HOSPEDADORES

GRUPO	HOSPEDADORES
A	Humanos, Perros, Gatos, Ovinos, Porcinos, Chinchillas, Bovinos, Caballos, Castores, Alpaca
B	Humanos, Perros, Ratas, Ratones, Chinchillas, Castores
C	Perros
D	Perros
E	Bovinos, Porcinos, Ovinos
F	Gatos
G	Ratas
H	Focas, Gaviotas

La diversidad en el genotipo entre los grupos se refleja también en diferencias biológicas. Por ejemplo, la cepa aislada denominada GS que pertenece al grupo B es más patogénica en seres humanos y crece más lentamente en cultivos axénicos que la cepa WB perteneciente al grupo A [21,22]. Además, la mayoría de los estudios inmunológicos *in vivo* se llevan a cabo utilizando el Grupo B (cepa GS), ya que infecta tanto a humanos como a ratones adultos [21, 23], mientras que para los estudios *in vitro* se utiliza generalmente el Grupo A (cepa WB).

El proyecto genoma de *Giardia* (GDB, <http://www.giardiadb.org/giardiadb/>) provee información sobre la secuencia génica de la cepa de *G. lamblia* WB (perteneciente al linaje A), de la cepa GS (perteneciente al linaje B) y la cepa P15 (perteneciente al linaje E). En el presente Trabajo de Tesis, todos los estudios se llevaron a cabo utilizando la cepa WB del Grupo A.

GIARDIASIS, LA ENFERMEDAD

La enfermedad producida por *G. lamblia*, denominada como giardiasis, puede ser asintomática o causar un cuadro clínico variable desde un ligero malestar abdominal hasta diarreas agudas o crónicas y síndrome de mala absorción [13]. Las manifestaciones de la infección con *Giardia* son muy variadas y dependen de factores como la virulencia de la cepa infectante, la dosis, la edad del hospedador y sus características nutricionales e inmunológicas al momento de la infección [24]. Además, la duración de la infección fluctúa entre los distintos hospedadores, por lo que el período de incubación varía entre 9 a 15 días. Los síntomas predominantes de la giardiasis aguda son dolor abdominal, diarrea, náuseas y pérdida de peso [17,13]. Si bien en la mayoría de los casos la infección se resuelve espontáneamente, una proporción de entre el 30-50% de los pacientes pueden desarrollar giardiasis crónica; presentando cuadros clínicos de diarreas intermitentes, acompañadas de debilidad, dolor de cabeza, deshidratación, pérdida continua de peso, anorexia y mala absorción, prolongándose estos síntomas por un período entre dos a tres años [25, 17]. En estos casos, la infección afecta la capacidad del cuerpo para absorber grasas, lactosa, vitamina A y vitamina B12, lo que comúnmente conduce a la pérdida de peso y puede causar desnutrición, especialmente en infantes [26]. En los casos más severos, la malabsorción de nutrientes influye en el desarrollo físico e intelectual del individuo, pudiendo causar un retardo en el crecimiento en los niños, aún en ausencia de síntomas gastrointestinales [27]. Asimismo, dentro de las enfermedades que pueden desarrollarse durante o después de la infección con *Giardia* han sido reportadas la urticaria, colecistitis, pancreatitis y síndrome de Chron [28, 17].

Esta infección parasitaria es cosmopolita, siendo uno de los principales agentes causantes de diarrea a nivel mundial. Se ha encontrado que en países en desarrollo donde los recursos sanitarios son deficientes, alrededor de 200 millones de personas presentan síntomas de giardiasis, detectándose además, medio millón de nuevos casos por año [17, 29, 30]. Particularmente en América Latina, se ha descrito que aproximadamente el 20% de la población rural presenta esta enfermedad [31]. En nuestro país, una recopilación de estudios aislados reveló que entre el 25 y 50% de los infantes argentinos son parasitados por *G. lamblia* [32]. Por otra parte, en países desarrollados es causa frecuente de diarrea en guarderías infantiles, individuos institucionalizados, mochileros, homosexuales y en individuos inmunodeprimidos.

Hace algunos años en Estados Unidos, *Giardia* ha sido clasificada como agente de bioterrorismo categoría B por el CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades), debido a que se disemina fácilmente, causa cifras de morbilidad moderadas e índices de mortalidad bajos y requiere de capacidad diagnóstica profesional para la adecuada vigilancia de la enfermedad [33]. Este parásito es también considerado como un posible agente de bioterrorismo ya que puede transmitirse a través del agua, puede ser genéticamente manipulado y es posible reproducir su ciclo vital totalmente *in vitro* [33].

Otro dato relevante consiste en la inclusión de *Giardia*, en el año 2004, dentro de la "Iniciativa de las enfermedades desatendidas" establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), dado que su prevalencia está estrechamente ligada a países pobres y a la falta de conocimiento de los mecanismos moleculares de la enfermedad [29].

Estos antecedentes ilustran la gran importancia a nivel médico y veterinario que posee el parásito en estudio. Lo que explica la relevancia de realizar estudios moleculares, de bioquímica y biología celular, obteniendo información valiosa sobre la biología de *Giardia*, la epidemiología y la interacción huésped-parásito, para generar un enfoque integral de la giardiasis.

Hasta el presente, el control de esta parasitosis se encuentra limitado al tratamiento quimioterapéutico a través de medicamentos derivados de la familia del 5-nitroimidazol como el metronidazol (Flagyl®), el mebendazol/trinisazol (TRUcompuesto®) y la furasolidona (Furoxone®) que funcionan generando radicales libres tóxicos para las células [34]. Si bien estas drogas son efectivas en un 85% y 95% para resolver la enfermedad, presentan diversos efectos colaterales como el sabor metálico, molestia abdominal, dolor de cabeza [35] e incluso se han informado efectos carcinogénicos en animales de experimentación [36]. Otras drogas de uso común como el benzimidazol y albendazol, desestabilizan el citoesqueleto del parásito [37]. Si bien estos medicamentos resultan económicos y parcialmente efectivos para el tratamiento de la giardiasis, su utilización ha sido cuestionada debido a los efectos colaterales observados en los pacientes y por la generación de cepas resistentes a largo plazo en reiterados casos clínicos [38]. Por estos motivos, surge la necesidad de desarrollar herramientas promisorias para el control de la giardiasis, mediante la búsqueda de moléculas que sirvan de blanco para el diseño de agentes terapéuticos más efectivos y seguros.

BIOLOGÍA CELULAR

La amplia distribución y la capacidad de poder infectar diferentes vertebrados han alentado durante años el estudio del ciclo biológico de *Giardia*, con el objetivo de bloquear su transmisión. Durante su ciclo de vida, *G. lamblia* experimenta cambios bioquímicos y morfológicos importantes que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales hostiles [39]. Este parásito atraviesa por dos formas o estadios diferentes; dentro del intestino delgado del hospedador vive y prolifera el trofozoíto, que es la forma celular activa que coloniza y parasita las células del intestino delgado (FIG. 1.1 PANEL IZQUIERDO), mientras que fuera del ambiente nutricional que le provee el hospedero, el parásito vive como quiste, una estructura resistente de muy baja actividad metabólica que constituye la forma de diseminación a otros hospedadores susceptibles (FIG. 1.1 PANEL DERECHO) [17].

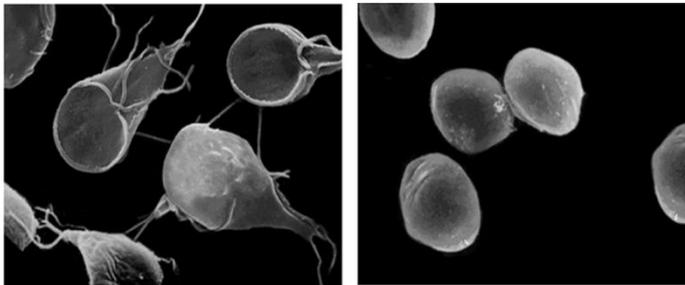


FIGURA 1.1: TROFOZOÍTOS Y QUISTES DE *G. LAMBLIA*. Microscopía electrónica de barrido mostrando a la izquierda un grupo de trofozoítos y a la derecha de quistes de *Giardia lamblia*.

Giardia no necesita de un huésped intermediario ni posee reproducción sexual [17], motivo por el cual, su ciclo de vida es tan simple que actualmente es posible reproducirlo enteramente *in vitro* (cultivo axénico), imitando los estímulos fisiológicos característicos del hospedador [40]. Esta herramienta representa un instrumento de gran utilidad para poder resolver los diferentes interrogantes que se plantean en el estudio de la giardiasis.

CICLO DE VIDA

La infección por *Giardia* ocurre mediante la ingestión del quiste, que se encuentra en aguas o alimentos contaminados o por vía fecal-oral. Debido a la exposición al contenido ácido del estómago, se reblandece la pared quística que finalmente se rompe por la acción de las proteasas del duodeno, liberándose los trofozoítos, en un proceso denominado **desenquistamiento** (FIG. 1.2 A.B.C) [41].

Los trofozoítos no emergen del quiste sino hasta llegar al intestino delgado, ya que de otra forma serían destruidos por el medio ácido estomacal [42]. Los parásitos emergentes se dividen, por fisión binaria, en dos trofozoítos iguales que se adhieren (a través del disco ventral) y colonizan específicamente el epitelio del yeyuno. Así, la infección puede permanecer por

semanas, meses e incluso años [43]. Resulta crucial la adhesión del parásito a la superficie de las células intestinales, para que se lleve a cabo la división celular. A través de movimientos progresivos (tendiendo a rotar alrededor de su eje longitudinal), los trofozoítos se desprenden de las células del epitelio intestinal adhiriéndose a la superficie de otro, resultando este ciclo de adhesión-disociación necesario para asegurar la colonización del epitelio intestinal del hospedador [44].

Luego de un período de tiempo variable, algunos de estos parásitos descienden por el tracto intestinal y, ante un cambio en la composición del medio ambiente en las porciones más bajas del yeyuno, se dispara su diferenciación a quiste o **enquistamiento** (FIG. 1.2 C.D.A). Finalmente, los quistes son eliminados junto con las heces y de esta manera el parásito completa su ciclo de vida y se encuentra disponible para infectar a un nuevo hospedador o reinfectar al mismo [45].

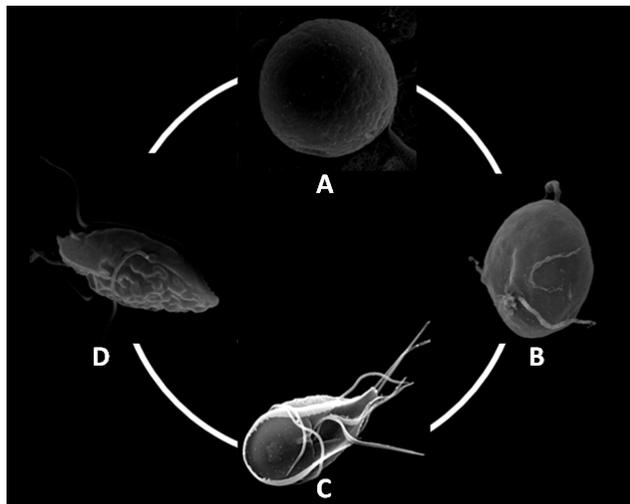


FIGURA 1.2: CICLO BIOLÓGICO DE *GIARDIA LAMBLIA*. De los quistes (A), a través de un proceso de desenquistamiento (B) que comienza en el estómago, se liberan los trofozoítos (C). Éstos, se duplican en el intestino delgado (fundamentalmente en el yeyuno) y a medida que descienden por el intestino son inducidos a enquistarse (D). Los quistes formados son finalmente eliminados con las heces cerrando el ciclo vital del parásito.

EL QUISTE

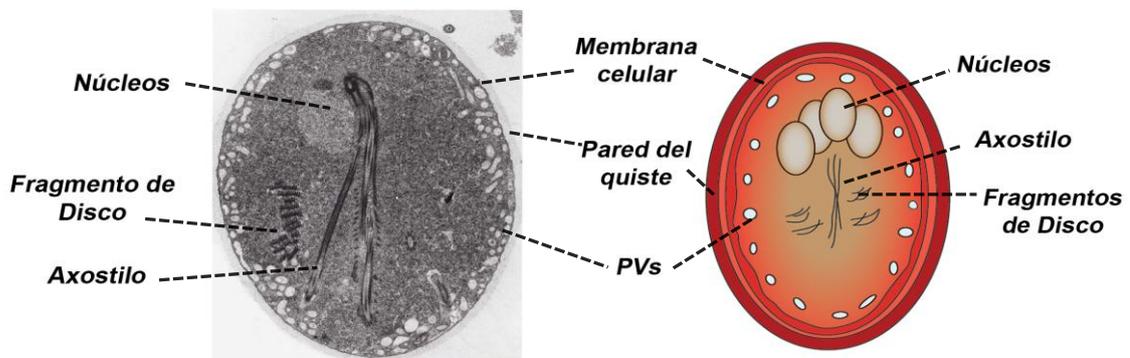


FIGURA 1.3: EL QUISTE DE *GIARDIA*. A la izquierda se muestra una electro-microscopía (EM) y a la derecha una representación esquemática del quiste de *G. lamblia*, donde se observan los cuatro núcleos, axostilo, las PVs, los fragmentos de disco, membrana celular y pared del quiste.

El quiste de *Giardia* presenta forma elipsoidal, mide entre 9 y 12 μm de largo por 5 a 8 μm de ancho (FIG.1.3). Debido a que el quiste es la forma latente del trofozoíto en su citoplasma se encuentran todos los componentes celulares desensamblados que, durante el proceso de desenquistamiento, permiten la generación de dos trofozoítos viables que colonizarán el intestino del hospedador [46]. Se caracteriza por la presencia de una pared externa rígida, adosada a la MP, constituida por proteínas de la pared del quiste y filamentos de carbohidratos [47, 48]. La pared del quiste está formada por una capa externa filamentosa de aproximadamente de 0,5 nm de espesor que envuelve una doble membrana interna, separadas entre sí por el espacio periplásmico [48]. Esta pared hace que el quiste sea selectivamente permeable, otorgándole resistencia a condiciones ambientales adversas y permitiéndole persistir en agua fresca, resistir desinfectantes y atravesar el estómago de los hospedadores. Esto se debe a que la red filamentosa impide el pasaje de grandes moléculas, mientras que las membranas controlan la entrada de las pequeñas [17].

EL TROFOZOÍTO

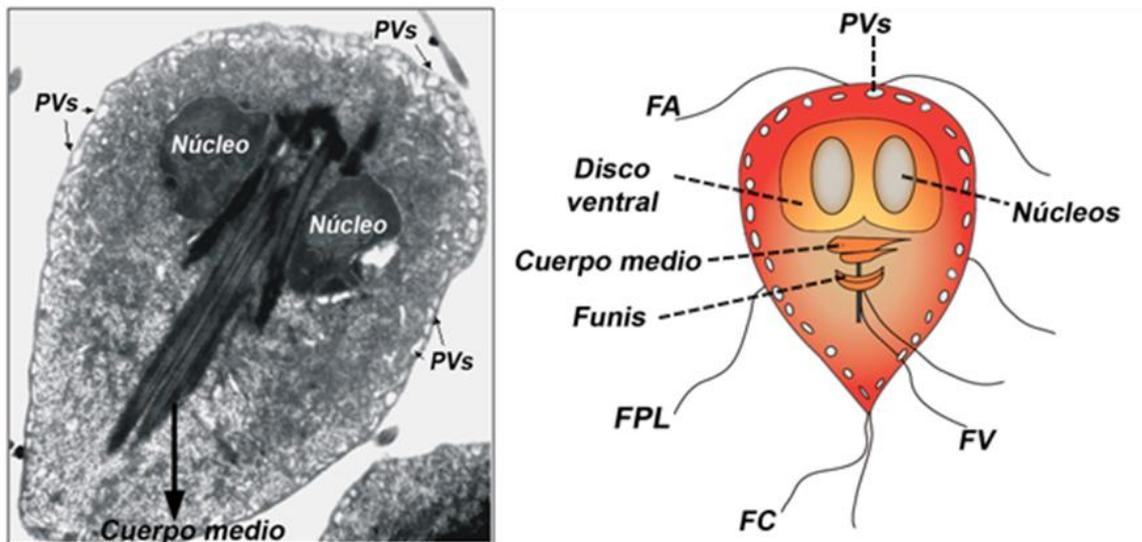


FIGURA 1.4: EL TROFOZOÍTO DE *GIARDIA*. A la izquierda se muestra una EM (vista ventral). A la derecha, se representa esquemáticamente el trofozoíto conteniendo dos núcleos, las vacuolas periféricas (PVs), el disco ventral, funis y los cuerpos medios. Los flagelos están organizados en cuatro pares; FA anteriores, FPL posterolaterales, FV ventrales y FC caudales.

MORFOLOGÍA DEL TROFOZOÍTO

La forma vegetativa del parásito posee morfología periforme, siendo el único protozooario que presenta simetría bilateral (FIG.1.4). El trofozoíto mide entre 9 y 15 μm de largo y entre 5 y 9 μm de ancho. Además, exhibe una cara posterior convexa y la anterior cóncava. Posee dos

núcleos ovoides y diploides con envoltura nuclear y nucléolos [17]. Los núcleos localizan anteriormente, son simétricos y se sitúan a cada lado de la línea media, con respecto al eje longitudinal. Ambos núcleos son transcripcionalmente activos [42, 49] y contienen la misma cantidad de ADN y el mismo número de genes y cromosomas (cinco principales), aunque algunos estudios sugieren diferencias entre ellos [13].

SUPERFICIE CELULAR

La superficie del trofozoíto de *Giardia* (incluyendo los flagelos y el disco ventral) se encuentra completamente cubierta por una envoltura constituida por los antígenos de superficie, que son proteínas ricas en cisteínas denominadas *VSPs* (del inglés *Variant-Specific Surface Proteins*) [50, 51]. Éstas son proteínas integrales de membrana que cubren la superficie del parásito formando una verdadera interfase entre éste y el medio extracelular [50, 51] y se encuentran involucradas en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador [17, 52].

CITOESQUELETO

El citoesqueleto de *Giardia* está formado por estructuras microtubulares y constituye un factor determinante en la virulencia del parásito, ya que participa en funciones como locomoción, adhesión celular, mantenimiento de la morfología celular y replicación. Como se muestra en la **FIGURA 1.4**, incluye cuatro pares de flagelos, un disco ventral, un cuerpo medio y una estructura denominada funis [44]. Los flagelos y el disco ventral se componen de proteínas típicas del citoesqueleto, como las α y β tubulinas y proteínas ácidas con un alto contenido de hélices α , conocidas como giardinas (α , β , γ , δ giardinas), que son características de las especies de *Giardia*. Los cuatro pares de flagelos (**FIG. 1.4**) se extienden desde los gránulos basales ubicados en el polo anterior entre los dos núcleos y emergen adquiriendo las posiciones anterior, posterior-lateral, caudal y ventral. Su función es otorgarle motilidad al parásito, permitiéndole moverse dentro de la cavidad intestinal [53].

El disco ventral o adhesivo (**FIG. 1.4**) es una estructura cóncava, con un ancho de 0,4 μ m, que media la unión mecánica no sólo a la pared intestinal sino también a la superficie del recipiente utilizado para el cultivo axénico. Está constituido por proteínas contráctiles como α -tubulina, β -tubulina, actina, α -actinina, miosina, tropomiosina [54] y giardinas [55]. Así, el parásito se fija a las microvellosidades intestinales a través de la contracción y la presión negativa que generan estas proteínas dentro del disco ventral (**FIG 1.5**) [17]. Esta organela tiene un rol muy importante en la supervivencia del parásito, ya que esta adhesión a la pared del intestino delgado le

permite captar los nutrientes necesarios y evitar ser transportados por los movimientos peristálticos.

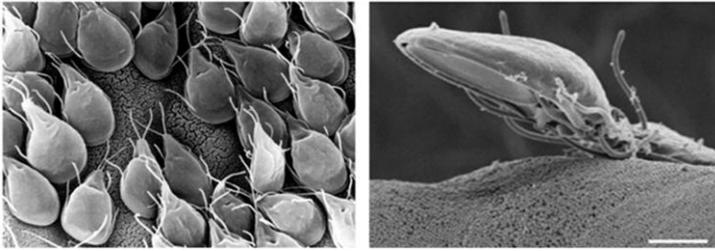


FIGURA 1.5: ADHESIÓN DE LOS TROFOZOÍTOS AL EPITELIO. Se exponen imágenes de microscopía electrónica de barrido. A la izquierda, se observan los trofozoítos adheridos al epitelio de la pared celular. A la derecha, se muestra cómo el trofozoíto se adhiere a las células del epitelio. Barra: 2 μ M

A lo largo de la línea media del trofozoíto se encuentra una estructura microtubular única del género *Giardia*, conocida con el nombre de cuerpo medio (Fig. 1.4). Su morfología ayuda a definir diferentes especies, utilizándose como herramienta taxonómica. Aunque su función es todavía desconocida se ha sugerido que podría estar relacionada a la progénesis del disco ventral [56, 57].

El funis es una estructura compuesta de dos bandas de microtúbulos y axonemas, que se asemeja al axostilo de otros parásitos y emerge de los axonemas de los flagelos caudales extendiéndose hasta la porción posterior de la célula. Actualmente, se propone que esta estructura es la responsable del movimiento caudal lateral de *G. lamblia* [58].

SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS

G. lamblia presenta un sistema endomembranoso atípico [59, 60], caracterizado por la presencia de RE y vacuolas periféricas (PVs: del inglés *Peripheral Vacuoles*) y por la ausencia de otras organelas típicas de eucariotas superiores como por ejemplo endosomas, lisosomas, mitocondrias, peroxisomas y un aparato de Golgi morfológicamente reconocible.

-RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO:

El compartimento mejor caracterizado es el RE, el cual se extiende desde las membranas de la envoltura nuclear, bilateralmente a lo largo del cuerpo celular. Otra particularidad observada es que *G. lamblia* carece de RE rugoso, estando los ribosomas distribuidos en el cuerpo celular del trofozoíto. La existencia del RE fue claramente demostrada con el hallazgo de GRP78/BiP, una chaperona residente de esta organela en eucariotas superiores [61-63] y de tres Proteínas DisulfuroIsomerasas (PDIs), que son enzimas que también se encuentran en el RE, formando los puentes disulfuro en las proteínas recientemente sintetizadas [64, 65].

-VACUOLAS PERIFÉRICAS:

Las PVs miden aproximadamente 300 nm, se encuentran ubicadas inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (MP) (Fig. 1.4) [17, 52] y están presentes durante todo el ciclo de vida de *Giardia*. Su naturaleza ácida fue demostrada por la internalización de naranja de acridina [52, 66] y, a través del análisis de pulso-caza con peroxidasa de rábano, se evidenció una marca temprana y persistente en las vacuolas sugiriendo que no hay distinción entre vesículas tempranas y tardías como ocurre en otros organismos eucariotas [52]. Por otro lado, las características lisosomales de estas PVs se evidenciaron por la presencia y actividad de diversas enzimas hidrolasas, tales como fosfatasa ácida o AcPh (del inglés *Acid Phosphatase*), proteinasas y RNasas [67-70]. Finalmente, su potencial rol en la endocitosis fue sugerido luego de observar que estas vacuolas concentran ferritina exógena, luciferina amarilla y LDL fluorescente y quilomicrones a través de su receptor, LRP (del inglés *Lipoprotein Receptor Protein*) [52, 71]. Es por las características observadas que se ha postulado que las PVs cumplirían simultáneamente funciones de endosomas y lisosomas, teniendo que coordinar específicamente ambas acciones para efectuar exitosamente los procesos de endocitosis [52] y de degradación de proteínas [60], así como los de fusión con la MP y secreción de proteínas durante el enquistamiento [69] y desenquistamiento [70].

Si bien hasta el momento las PVs se habían caracterizado como estructuras individuales que funcionan de manera independiente, resultados recientes de nuestro grupo mostraron que moléculas como LDL, cuya endocitosis es mediada por receptor, pero no dextrano, que es endocitado por fase fluída, se mueven lateralmente entre las PVs. Sería posible entonces especular acerca de la existencia de una vía de diversificación de las PVs en las que, en lugar de existir un mecanismo de maduración concatenado, puedan sucederse procesos de fusión/escisión laterales entre grupos de PVs adyacentes, determinando la coexistencia de diferentes poblaciones de las mismas [72, 73].

-APARATO DE GOLGI:

En *G.lamblia*, la existencia o no de un aparato de Golgi ha sido históricamente foco de controversias. Existen trabajos que apoyan la teoría de la formación transitoria de un aparato de Golgi durante el proceso de enquistamiento, a través de la adquisición de una organización sustancialmente diferente a la visualizada en eucariotas superiores [74, 75]. Sin embargo, otros autores postulan que la selección y el direccionamiento de proteínas depende de los sitios de salida del RE (también llamados ERES, del inglés *ER-Exit Sites*) y que las vesículas específicas del enquistamiento (ESVs: del inglés *Encystation Specific Vesicles*), que poseen morfología esférica y participan en la secreción regulada de proteínas de la pared del quiste, podrían estar actuando

como un compartimento similar al aparato de Golgi durante la diferenciación a quiste de los trofozoítos [76-78].

TRANSPORTE VESICULAR DE PROTEÍNAS

Las células eucariotas han adquirido un elaborado sistema membranoso interno que le permite que los diferentes compartimientos subcelulares puedan comunicarse entre sí a través de vesículas de transporte que emergen por gemación de un compartimiento y se fusionan con otro específico, logrando así que el tráfico intracelular se encuentre altamente organizado. En la ruta biosintética-secretora las proteínas son transportadas desde el RE hacia la MP o a los lisosomas, mientras que en la vía endocítica las moléculas son incorporadas mediante vesículas formadas a partir de la MP, conducidas a los endosomas tempranos y vía endosomas tardíos a los lisosomas (FIG. 1.6).

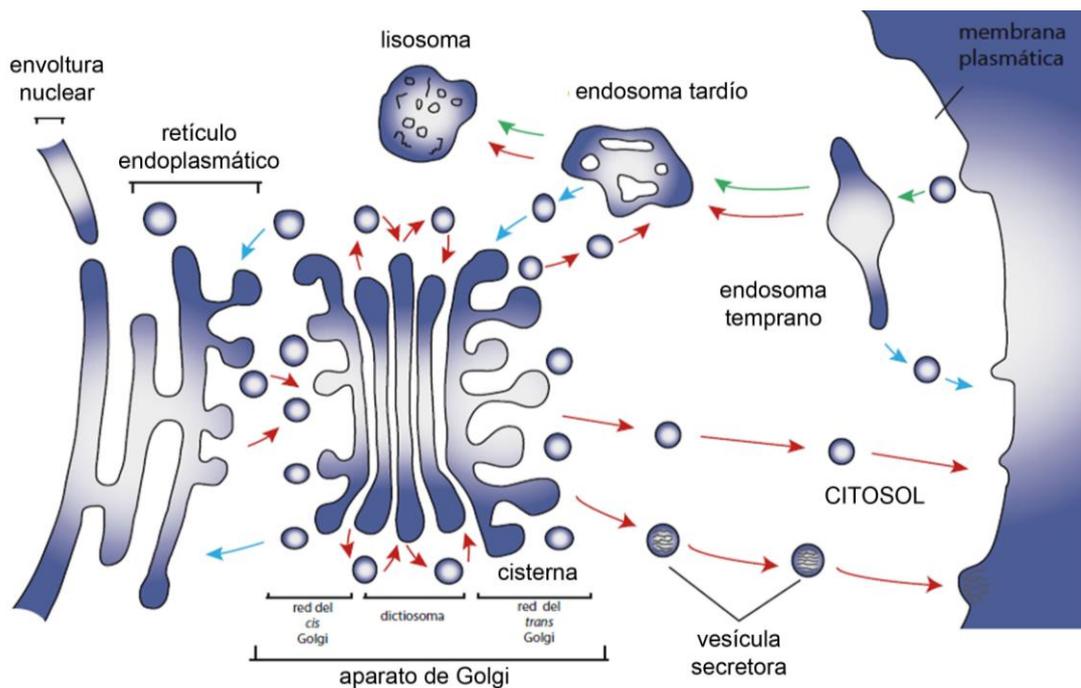


FIGURA 1.6. COMPARTIMIENTOS INTRACELULARES DE UNA CÉLULA EUCARIOTA IMPLICADOS EN LA RUTA BIOSINTÉTICA-SECRETORA Y ENDOCÍTICA. En la ruta biosintética-secretora (flechas rojas) las proteínas son transportadas desde el RE hacia la MP o (vía endosomas tardíos) a los lisosomas. En la ruta endocítica (flechas verdes) las moléculas son incorporadas mediante vesículas formadas a partir de la MP, conducidas a los endosomas tempranos y, vía los endosomas tardíos, a los lisosomas. Muchas moléculas endocitadas son recuperadas de los endosomas tempranos y devueltas a la superficie celular para ser reutilizadas. De forma similar, algunas moléculas son recuperadas de los endosomas tardíos y dirigidas al aparato de Golgi mientras algunas son recuperadas del Golgi y transportadas al RE. Estas rutas de recuperación se muestran con flechas celestes. Adaptado de [84].

Dentro de la vía secretora, las proteínas pueden ser secretadas de una célula a través de una ruta regulada o constitutiva. En las vías reguladas, determinadas proteínas de la cara trans del Golgi (TGN: del inglés *Trans-Golgi Network*) son almacenadas en vesículas de secreción, las cuales no se fusionan con la MP liberando su contenido sino hasta recibir una señal extracelular específica. En la ruta de secreción constitutiva, en cambio, hay un transporte vesicular continuo de las proteínas sintetizadas en el RE desde la TGN a la MP (FIG. 1.7).

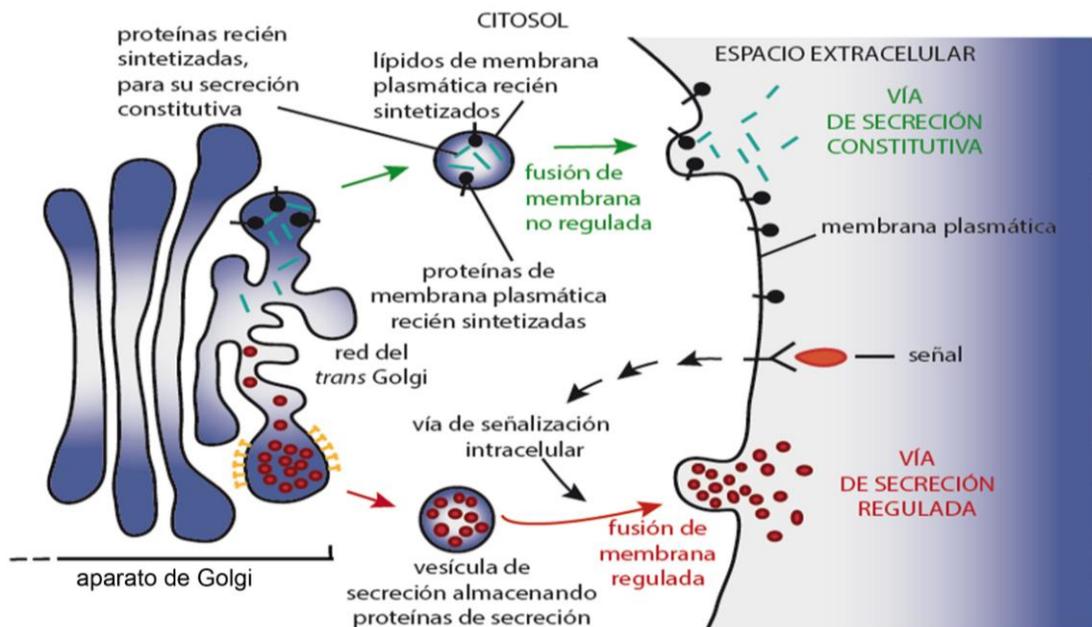


FIGURA 1.7 RUTA DE SECRECIÓN REGULADA Y CONSTITUTIVA. Muchas proteínas solubles son segregadas continuamente de la célula a través de la *ruta de secreción constitutiva*. Esta vía también nutre a la membrana plasmática con proteínas y lípidos acabados de sintetizar. Las células especializadas en la secreción también disponen de una *ruta de secreción regulada*, mediante la cual determinadas proteínas de la TGN son conducidas en vesículas de secreción, donde las proteínas son empaquetadas y concentradas hasta que una señal extracelular estimula su secreción. Adaptado de [84].

Durante más de treinta años, los laboratorios dedicados al estudio de la estructura subcelular de *Giardia* han proporcionado pruebas definitivas sobre la existencia de mecanismos específicos de transporte, distribución y secreción de proteínas en este parásito, aún en presencia de un sistema endosomal/lisosomal simplificado, constituido por las PVs y en ausencia de un aparato de Golgi morfológicamente discernible. En este sentido, han sido descritas detalladamente tres vías bien definidas de secreción de proteínas. Así, la existencia de la ruta constitutiva se evidenció a través del transporte continuo hacia la MP y la liberación al medio externo de las proteínas VSPs [79-81]. Por otro lado, se sabe que la secreción regulada sólo se

manifiesta en el enquistamiento, durante el procesamiento y transporte de los constituyentes de la pared del quiste [59, 82, 83]. Además, resultados recientes en nuestro grupo de trabajo mostraron la primera evidencia de que este parásito presenta también un sistema de selección y direccionamiento de proteínas específicas desde el RE hacia las PVs, utilizando un mecanismo de transporte conservado [52, 69]. En conjunto, estos antecedentes ponen de manifiesto que, a pesar de poseer una organización intracelular de complejidad muy reducida, los trofozoítos de *Giardia* tienen un sistema eficiente de transporte capaz de dirigir numerosas proteínas cargo a su destino utilizando diferentes vías específicas de transporte vesicular.

CLATRINA Y LAS PROTEÍNAS ADAPTADORAS

Las vesículas recubiertas de clatrina (CCVs: del inglés *Clathrin Coating Vesicles*), son vesículas de transporte que han sido ampliamente caracterizadas en una gran variedad de células eucariotas y que median la entrega de moléculas cargo hacia los compartimentos endosomal/lisosomal (FIG. 1.8).

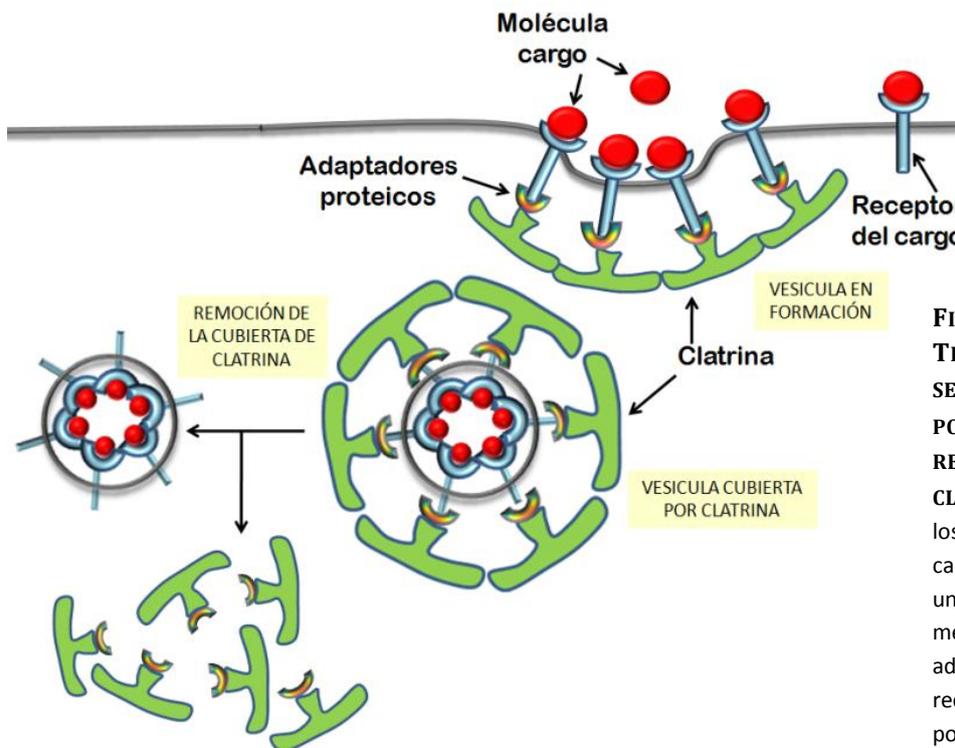


FIGURA 1.8: TRANSPORTE SELECTIVO MEDIADO POR VESÍCULAS REVESTIDAS CON CLATRINA. Una vez que los complejos receptor-cargo se posicionan en una misma zona de la membrana, los adaptadores proteicos reconocen señales en la porción citosólica de los receptores transmembrana y reclutan moléculas de clatrina para mediar la internalización en vesículas cubiertas por

Estas vesículas están cubiertas por una capa que se compone de proteínas de andamiaje, clatrina y varias proteínas adaptadoras (APs: del inglés *Adaptor Proteins*) oligoméricas y monoméricas (FIG. 1.9). Las APs reconocen señales de clasificación específicas que están presentes en los dominios citosólicos de proteínas transmembrana, produciendo la acumulación de estas proteínas en las CCVs.

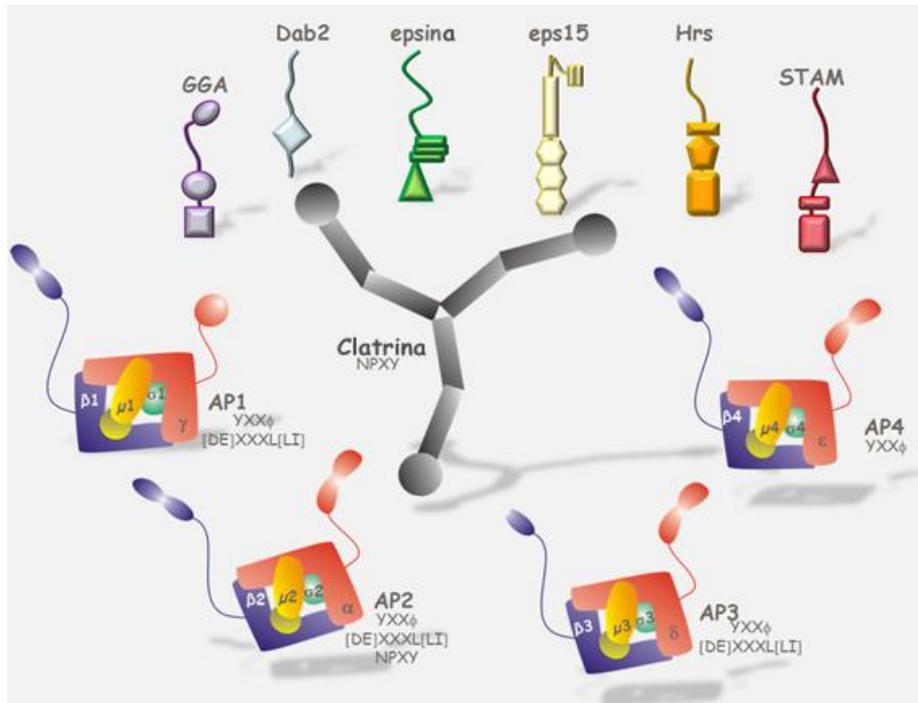


FIGURA 1.9: CLATRINA Y PROTEÍNAS ADAPTADORAS. La cadena pesada de clatrina puede interactuar con APs monoméricos (GGA, Dab2, epsina, eps15, Hrs, STAM) o tetraméricos (AP1-4). Adaptado de [100].

El principal componente de las vesículas recubiertas, es la propia proteína clatrina, que conforma un complejo proteico heterohexamérico altamente conservado en la evolución, el cual está constituido por tres cadenas pesadas de 190 kDa y tres cadenas livianas de 23 o 25 kDa, que juntas forman una estructura altamente organizada denominada "trisquelion" [85]. La geometría inusual del trisquelion permite el ensamblado de estructuras poliédricas regulares, denominadas "Cubiertas de Clatrina" (CCs: del inglés *Clathrin Coat*) que, luego de dirigir la deformación de la membrana, dan lugar al inicio del proceso de direccionamiento a través de las CCVs. Así, las CCs se asocian del lado citosólico de las vesículas de transporte, que emergen desde la MP, la TGN y los endosomas (FIG. 1.8) [86]. Si bien la formación de CCVs sigue una secuencia de pasos coordinados y su organización se ha asociado al tráfico mediado por vesículas [87], recientemente, se ha identificado una nueva clase de transportadores de proteínas que también se encuentran recubiertos con clatrina, aunque estas estructuras presentan una morfología diferente con una conformación túbulo-vesicular [88]. Además, se describió que estos transportadores podrían permitir la comunicación específica y el desplazamiento a mayores distancias, ya que van desde el área yuxtannuclear hasta los endosomas, localizados en la periferia celular.

En el genoma de *Giardia*, se identificó una secuencia correspondiente al ortólogo de la cadena pesada de clatrina (G1CHC), con un marco abierto de lectura que codifica una proteína de 1871 aminoácidos [89]. Asimismo, mediante el análisis de su secuencia, se reveló la presencia de tres repeticiones tipo clatrina, localizadas en el extremo C-terminal y una hélice, presente en la porción N-terminal, acorde con los motivos ya encontrados en esta familia de proteínas [90]. Por el contrario, no ha sido posible identificar un ortólogo a la cadena liviana de clatrina en este parásito y quizás esto se deba al hecho de que estas cadenas comparten muy baja homología de secuencia entre las distintas especies. Por otra parte, el análisis de la expresión G1CHC mostró que clatrina se expresa de manera similar en los dos estadios del ciclo de vida del *Giardia* y que su localización se encuentra en estrecha relación con las PVs en trofozoítos [91-94]. Si bien diversos grupos de investigación han proporcionado evidencias de la posible función de clatrina durante el proceso de endocitosis [73, 91, 95, 96], aún no ha sido posible visualizar en este parásito el ordenamiento propio “tipo enrejado” de las CCVs ni las depresiones emergentes revestidas de clatrina. En su lugar, fue posible observar depresiones revestidas atípicas en la MP, las cuales se encontraban asociadas de manera inusual a las PVs, lo que sugiere que, en *Giardia*, clatrina podría estar adquiriendo una disposición diferente, adaptándose a las características propias de esta célula [52]. Asimismo, se ha planteado que, tal como fue previamente demostrado a través de ensayos *in vitro*, clatrina se organice en una matriz hexagonal dando lugar a la formación de túbulos en lugar de vesículas [97]. Otra característica inusual de la vía secretora de *Giardia* es la presencia de una red túbulo-vesicular del RE que aparentemente se extiende y contacta con las PVs en la periferia de la célula [98], aunque se informó recientemente que las membranas del RE no invaden el espacio ocupado por las PVs [99]. Por lo tanto, una explicación que reconcilia estas observaciones podría ser que al menos parte del tráfico dependiente de clatrina en el parásito implica la formación de túbulos que se extenderían desde los sitios de salida del RE por el citoplasma hasta contactarse con las PVs situadas distalmente.

En las células eucariotas, la asociación de clatrina a las membranas no es un proceso espontáneo ya que la proteína no posee afinidad por las membranas biológicas. Es por esto que tanto el reclutamiento de clatrina como la captura de las proteínas transmembrana requieren de la participación de APs y factores que actúan como elementos accesorios asociados a clatrina (FIG. 1.9) [100]. De esta manera, quedó establecido que el tráfico de proteínas lisosomales es mediado por APs tetraméricos (AP-1-4) y/o monoméricos [como por ejemplo: proteínas de unión al factor de ribosilación de ADP (GGAs), ARH, Dab2, epsina, eps15, Hrs y STAM1] [100, 101]. Así, se encontró que las CCVs participan en la endocitosis mediada por receptor, en donde las vesículas que emergen desde la MP contienen el adaptador polimérico AP-2 y los monoméricos AP180,

epsina, eps15, intersectina 1 y Dab2, entre otros [102]. Por el contrario, las CCVs que intervienen en el transporte vesicular desde la TGN a endosomas requieren la acción de AP-1 y GGA1-3 [103]. En lo que respecta a AP-3, este complejo se encuentra en CCVs asociados con los endosomas, pero también es capaz de funcionar en ausencia de clatrina [104]. Otro tipo de CCV, que también se encuentra asociado con los endosomas, contiene el AP monomérico Hrs pero no posee adaptadores multiméricos [100]. Finalmente, el cuarto complejo AP, AP-4, ha sido descrito como miembro de una vesícula sin recubierta de clatrina que se encuentra asociada con la TGN [102]. Cabe destacar que el mecanismo mediante el cual las APs se asocian a membrana y reconocen la proteína a unir, depende específicamente de cada una de las diferentes vías de transporte.

Dentro de las APs multiméricas, se ha demostrado que los complejos AP-1, AP-2, AP-3 y AP-4 están constituidos por cuatro subunidades o adaptinas: dos subunidades mayores (γ , α , δ , o ε y $\beta 1-4$), una subunidad media ($\mu 1-4$) y una menor ($\sigma 1-4$), que desempeñan funciones específicas dentro del complejo. En general, las subunidades mayores están involucradas en la unión a membrana diana y reclutamiento de proteínas accesorias, mientras que a las subunidades pequeñas se les ha atribuido principalmente un rol en la estabilización estructural del complejo [101, 105]. Las subunidades μ , en particular, son las que reconocen señales de direccionamiento del tipo FXNPXY, YXX ϕ (donde X es cualquier aminoácido y ϕ es un aminoácido hidrofóbico) o señales ricas en dileucinas, presentes en el dominio citosólico de proteínas transmembrana, mediando así la captura selectiva de estas proteínas dentro de vesículas de transporte [105].

En el genoma de *G. lamblia*, se identificaron ortólogos de las subunidades que componen los complejos AP-1 y AP-2 (dos subunidades mayores, una media, y una subunidad menor de cada complejo). La colocalización de AP-1 con proteínas lisosomales, su interacción con GICHC, junto con la observación de que el tráfico de proteínas de membrana e hidrolasas solubles es dependiente de AP-1, mostró que este complejo participa en el transporte anterógrado de proteínas específicas (desde el RE hacia las PVs) en *Giardia* [96]. Por otro lado, AP-2 se encuentra localizada en las PVs y en la MP de trofozoítos, participa en la endocitosis mediada por receptores (EMR) y es crucial en la internalización de lipoproteínas [73]. AP-1 no es crítica para la supervivencia de los trofozoítos en cultivo sino que es necesaria para la formación de quistes [96]. En contraste, AP-2 es fundamental para el crecimiento y la supervivencia de *Giardia*, ya que se encuentra involucrada en la endocitosis de moléculas esenciales (por ejemplo, lípidos exógenos) [73] y en la fragmentación de las ESVs en pequeñas vesículas de transporte que contienen proteínas de la pared del quiste durante el enquistamiento [73]. Estos resultados obtenidos en nuestro laboratorio, nos llevaron a suponer que este organismo conserva un grupo muy reducido de proteínas implicadas en el tráfico endosomal/lisosomal, con la participación de dos de los

cuatro complejos de APs, AP-1 y AP-2, pero no de proteínas adaptadoras monoméricas (FIG. 1.10). Sin embargo, hemos encontrado en el genoma de *Giardia* una proteína (GIENTHp) que contiene un dominio N-terminal de ENTH conservado y podría pertenecer a la superfamilia de proteínas adaptadoras monoméricas ENTH/ANTH/VHS que participan en el tráfico de proteínas desde el Golgi a los endosomas, entre los endosomas y en el proceso de endocitosis en eucariotas superiores [106, 107].

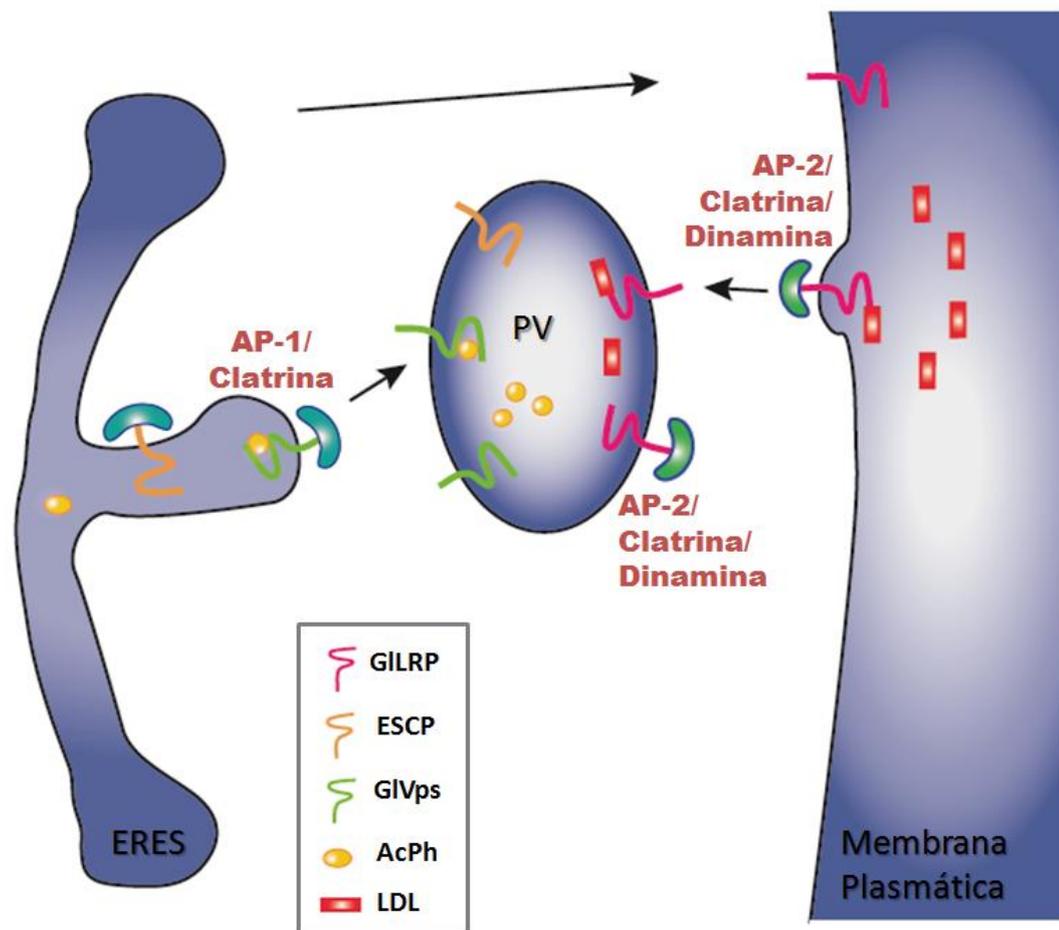


FIGURA 1.10: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL TRÁFICO DE PROTEÍNAS LISOSOMALES EN TROFOZOÍTOS DE *G.LAMBLIA*. La clasificación de proteínas en *Giardia* se inicia en los sitios de salida del RE (ERES). La proteína transmembrana ESCP asociada a AP-1 es dirigida a las PVs, a través de CCVs. Siguiendo la misma vía, la hidrolasa soluble AcPh se asocia al receptor GIVps y a AP-1 para ser transportada a las PVs. Desde la membrana plasmática, AP-2 interviene en la endocitosis de LDL (mediada por su receptor GILRP) hacia a las PVs. Las proteínas citosólicas, clatrina y dinamina, se localizan mayoritariamente alrededor de las PVs.

LA SUPERFAMILIA DE ADAPTADORES MONOMÉRICOS ENTH/ANTH/VHS

Como mencionamos anteriormente, la gemación de la MP mediada por clatrina conduce a la formación de vesículas endocíticas, que internalizan los nutrientes, receptores y otras proteínas de la superficie celular [108, 109], y también interviene en el tráfico de proteínas desde la TGN hacia el sistema endosomal/lisosomal [110, 111]. Si bien varios estudios han revelado la presencia de una maquinaria molecular compleja que subyace a la formación y función de las CCs y CCVs en la MP [112, 113], poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estos eventos en la TGN.

Recientemente, han sido identificados dos nuevos módulos proteicos altamente relacionados, los cuales se denominan dominio ENTH (del inglés *Epsin N-Terminal Homology*) y ANTH (del inglés *AP180 N-Terminal Homology*), presentes en proteínas que participan en el transporte mediado por clatrina [2], los cuales se describirán en los próximos párrafos.

IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO ENTH

Uno de los miembros mejor caracterizado de la familia ENTH es la proteína epsina1, la cual fue descubierta inicialmente en 1998 en virtud de su unión a otro factor auxiliar, Eps15, por lo que se decidió llamarla “la proteína que interacciona con Eps15” o en una forma abreviada “epsina” (del inglés *Eps15 Interacting*) [114]. Posteriormente, se mostró que epsina y sus isoformas (epsina2a, epsina2b, epsina3), las cuales se conocen como proteínas del tipo epsina clásica (Fig. 1.11), se expresan en todos los vertebrados, se encuentran en muchas células y tejidos y especialmente en células secretoras activas. Por otro lado, se identificó otra proteína relacionada a epsina, denominada paralelamente epsinaR (del inglés *Epsin Related*) [115], entoprotina [116], o Clint [117]. Así, la familia ENTH en mamíferos quedó constituida por proteínas epsina clásica (epsina1/2/3) y epsinaR y todas poseen en común la presencia del dominio N-terminal altamente conservado.

El dominio ENTH se identificó a través del alineamiento de la secuencia de epsina1 con otras proteínas de diferentes organismos, donde se obtuvo una región conservada de ~150 residuos, los cuales se encuentran en el extremo N-terminal de epsina1 y se denominó como ENTH (del inglés *Epsin N-Terminal Homology*). Además, se encontró que éste es altamente conservado en organismos tan diversos como levaduras, plantas, ranas y humanos [118, 119]. Posteriormente, mediante cristalografía de rayos X se demostró que el dominio de ENTH de epsina1 posee una estructura globular compacta, compuesta por ocho hélices α que están conectados por bucles de longitud variable [120, 121]. Dentro de este motivo, los aminoácidos más altamente conservados se pueden clasificar en dos clases: (i) residuos internos que están involucrados en el ensamblaje de la proteína y son necesarios para su integridad estructural y (ii)

los residuos accesible para los solventes que podrían estar implicados en las interacciones proteína-proteína [120]. Estructuralmente, este dominio es similar al motivo VHS, el cual fue identificado por primera vez como una región homóloga, presente en el N-terminal, en Vps27, Hrs y STAM [122]. Hrs, y su homólogo de levadura Vps27, han sido implicados en la endocitosis, mientras que STAM se describió como una molécula adaptadora de transducción de señales implicada en la citoquinesis [123]. El dominio VHS también está presente en otras proteínas de mamíferos que participan en la regulación del transporte de membrana al sistema endosomal-lisosomal [122, 124, 125]. Además, algunas proteínas que poseen motivos VHS o ENTH comparten algunos de sus compañeros de unión (por ejemplo Eps15 y clatrina) [126, 127, 128].

LOS DOMINIOS ENTH Y ANTH UNEN FOSFATIDILINOSITOL FOSFATO (PIs)

El módulo más altamente relacionado con el ENTH se conoce con el nombre de ANTH [129-131]. Estos dos dominios son tan similares que varias proteínas que poseen ANTH fueron designadas originalmente como portadoras del ENTH. El módulo ANTH ha sido estudiado principalmente en AP180, una proteína de unión a clatrina, específica del cerebro y que estimula el agregado de clatrina durante el reciclaje de las vesículas sinápticas [132].

Un avance importante para comprensión de la función de los dominios E/ANTH se inició con la observación de que ambos unen fosfatidilinositol fosfato (PIs). Sin embargo, si bien los dos módulos exhiben preferencia por fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ($PI_{4,5}P_2$) [129-131], los mecanismos implicados en esta unión son diferentes. En este sentido, a través de resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X, se reveló que $PI_{4,5}P_2$ se une al dominio ENTH de las proteínas del tipo epsina clásica a través de residuos básicos. Por el contrario, la interacción con el motivo ANTH de AP180 es mediada por un fragmento rico en residuos de lisina. De hecho, la secuencia alrededor de esta región $(K/G)A(T/I)_x_6(P/L/V)KxK(H/Y)$ se conserva en todos los dominios ANTH y está ausente en ENTH, por lo que se ha sugerido que podría representar una secuencia consenso que permitiría definir a los miembros de la familia ANTH [129-131]. Estas diferencias contribuyen a la clasificación de los dominios ENTH y ANTH como módulos distintos, a pesar de sus similitudes estructurales. Es interesante señalar que el dominio relacionado VHS es también un módulo de unión a fosfolípido pero, a diferencia de los anteriores, su interacción con la membrana se genera en sitios enriquecidos en PI_3P [133].

Respecto a la proteína epsinaR, se describió que ésta contiene el dominio conservado ENTH y carece del módulo ANTH con secuencias ricas en residuos lisina. Además, a través de comparaciones de secuencias y del modelado estructural de los dominios ENTH de epsinaR y epsina1, se reveló que poseen diferente especificidad en unión con PIs. De hecho, se demostró

por ensayos de superposición en nitrocelulosa y de unión a liposomas que el ENTH de epsinaR prefiere PI4P en lugar de PI4,5P₂ [134].

FUNCIÓN DE LOS MOTIVOS ENTH Y ANTH

Se conoce que las proteínas portadoras del dominio ENTH o ANTH divergen sustancialmente en la secuencia fuera de estos motivos. Sin embargo, muchos de ellos contienen secuencias que son indicativas de roles funcionales en los eventos dependientes de clatrina (Fig. 1.11).

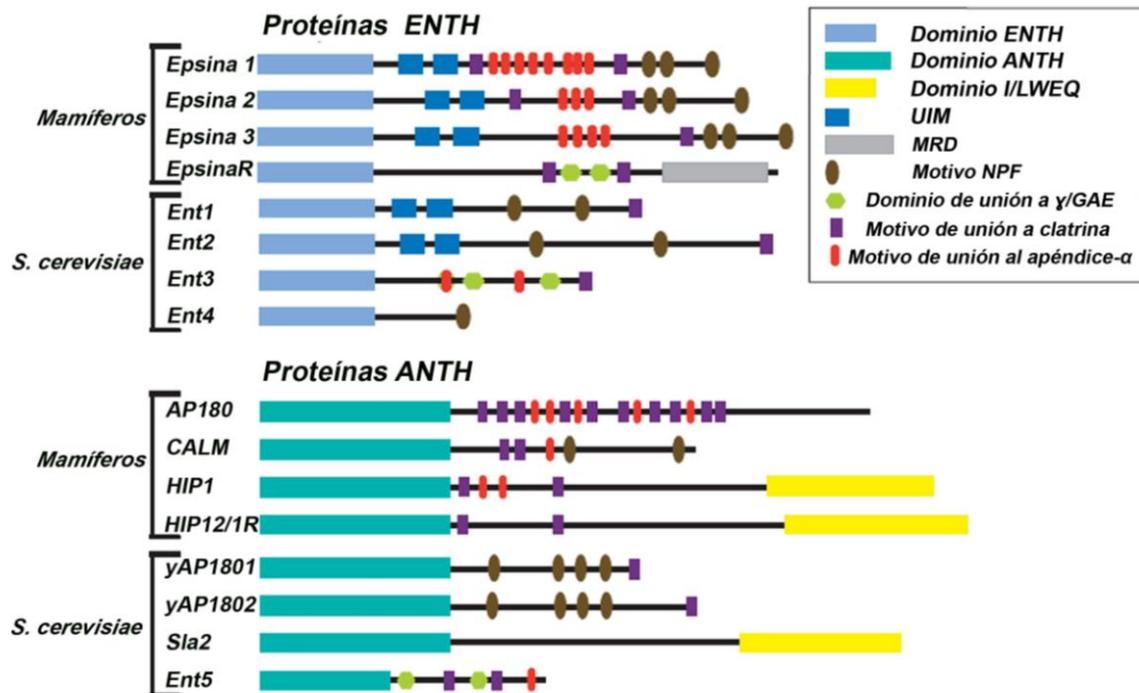


FIGURA 1.11: PROTEÍNAS E/ANTH Y SUS DOMINIOS. Se representan proteínas que poseen motivos ENTH o ANTH. En la región C-terminal, contienen motivos peptídicos cortos y dominios que median las interacciones con otras proteínas. I/LWEQ, permite la unión con actina. El motivo de interacción con ubiquitina (UIM) es un sitio de consenso (EDEXLxxAxxxSxxE/D) que media la interacción con proteínas ubiquitinadas. Los motivos NPF unen a proteínas que poseen el dominio Eps15 homólogo (EH). En la proteína epsinaR, dentro de la región C-terminal, se encuentra un dominio rico en metionina (MRD), cuya función es desconocida. El sitio de unión al apéndice γ /GAE posee una secuencia consenso [D/E][G/A]_[0-1]F[G/A][D/E] ϕ , donde ϕ es cualquier aminoácido hidrofóbico. Los motivos de unión a clatrina abarcan múltiples secuencias que se unen al dominio terminal de la cadena pesada de clatrina, incluyendo motivos DLL y cajas de clatrina de tipo I y II. El segmento de unión a la apéndice α de AP-2 incluye los motivos DPW, DPF y FxDxF. Adaptado de [2].

En el caso de epsina1 y AP180 estas regiones incluyen secuencias de unión a clatrina, AP2, dominios EH y proteínas ubiquitinadas (Fig. 1.11). Estos antecedentes sugerían que las proteínas que contienen los dominios E/ANTH parecían estar íntimamente asociadas con la vía endocítica. Sin embargo, estudios recientes han identificado proteínas nuevas que contienen E/ANTH y que

participan en el transporte mediado por CCVs entre la TGN y los endosomas. En este sentido, epsinaR comparte poca homología en la secuencia, con cualquier proteína del tipo epsina clásica, fuera del dominio de ENTH, pero contiene dos dominios de unión a clatrina, sitios de interacción con AP-1 y con GGA2, en su región C-terminal (FIG. 1.11) [127, 135-137]. Además, el análisis de inmunofluorescencia indicó que epsinaR localiza principalmente en la TGN y, en menor proporción, en las membranas del sistema endosomal [115-117, 134]. Por lo tanto, esta proteína parece ser un nuevo componente del transporte mediado por clatrina en la TGN y endosoma y proporciona la primera evidencia de que las proteínas que contienen ENTH también poseen un rol interaccionando con las membranas internas.

Otra prueba de esa función en las proteínas E/ANTH está relacionada con la identificación en células de levadura de Ent3 y Ent5, que son proteínas ortólogas a epsinaR y portadoras de los motivos ENTH y ANTH, respectivamente (FIG. 1.11). Recientemente, se describió que estas dos proteínas interaccionan con clatrina, GGA2 y AP-1 y que están presentes en la TGN y endosomas tempranos [138]. En la actualidad, se conoce que los dominios E/ANTH pueden ser considerados como elementos universales en la nucleación de las cubiertas de clatrina, ya sea en la MP o en las membranas internas.

Generar la curvatura de la membrana ha sido considerada la función más importante del dominio de ENTH (FIG. 1.12) [129, 139]. Este módulo tiene una estructura α -helicoidal compacta que le permite unirse específicamente a los PIs que se encuentran en ciertas regiones de las membranas. Es así que las proteínas del tipo epsina clásica se unen a través de este dominio a PI(4,5)P₂, que está enriquecido en determinados parches de la MP, mientras que epsinaR interacciona con PI4P, presente en la membrana de la TGN. Previamente, ha sido reportado que la

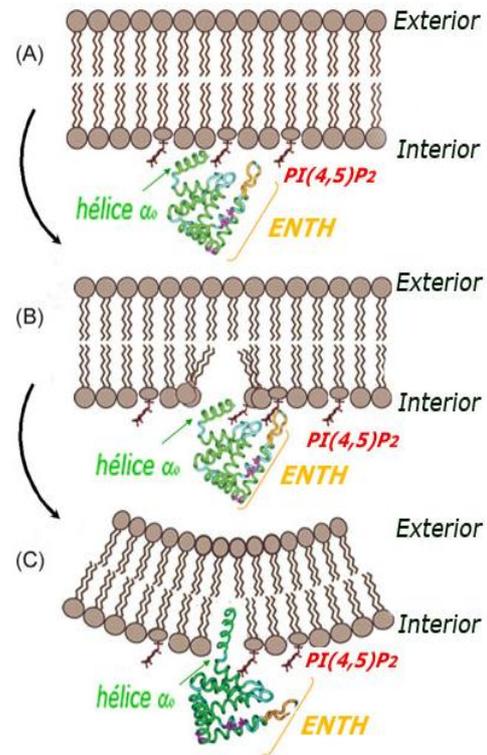


FIGURA 1.12: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FUNCIÓN EPSINA EN CURVATURA DE LA MEMBRANA. (A) Ciertos microdominios de la membrana plasmática se encuentran enriquecidos en PI(4,5)P₂, los cuales son los puntos de acceso para la endocitosis mediada por clatrina. La unión de PI(4,5)P₂ al dominio ENTH es el primer paso en la inflexión de la membrana. A continuación, residuos no estructurados vinculados a la región NH₂-terminal, forman una hélice α anfipática, llamada hélice α_0 , desalineada respecto al eje súper helicoidal del dominio de ENTH. (B) La hélice α_0 se inserta en el cara interna de la membrana plasmática, deformando la estructura de los lípidos, para lograr así aliviar la tensión de flexión. (C) La inserción de la hélice α_0 induce la curvatura de la membrana, proporcionando un mecanismo que facilita este proceso que es demandante de energía. Adaptado de [107].

unión de PIs al dominio ENTH induce la formación de una hélice anfipática (hélice α_0), presente en el extremo NH₂-terminal, que se inserta en la capa interna de la bicapa lipídica e induce la curvatura de la membrana (FIG. 1.12). Mientras que las proteínas epsina clásica llevan a cabo esta función en la MP, las proteínas epsinaR producen la flexión de la membrana de la TGN [129]. Debido a que esta función no está presente en AP180, es posible identificar una distinción importante entre los motivos ENTH y ANTH, que consiste en la generación de la hélice α_0 , dentro del dominio de ENTH. Si bien se conoce que el dominio ANTH de AP180 no es capaz de insertarse en la membrana, se ha informado que el ensamblado de clatrina en presencia de este motivo genera CCs que son más uniformes en tamaño que las producidas con la sola intervención de epsina, lo que sugiere que el dominio ANTH puede contribuir a la regulación del tamaño del enrejado de clatrina [129]. Todos los datos recopilados hasta el momento, sugieren que los motivos E/ANTH tienen funciones fundamentales y complementarias en la formación de las CCs y CCV.

Tanto AP180 como los miembros de la familia ENTH estimulan el ensamblado de los trisquelios de clatrina solubles en las jaulas de clatrina, sin embargo, se ha descrito que las regiones de las proteínas que participan en la actividad de montaje están situados fuera del dominio E/ANTH [132, 140, 141]. Por lo tanto, un modelo atractivo es aquel en que las proteínas que contienen los módulos E/ANTH están ancladas a la membrana a través de su interacción con PIs, dejando a sus regiones C-terminales extendidas y disponibles para reclutar los demás componentes, catalizar el ensamblado de clatrina y clasificar las proteínas a transportar [116, 141, 142]. Debido a que los parches de clatrina formados por los miembros de la familia ENTH se invaginan, mientras que el enrejado inducido por ANTH es plano [129], es que estos datos sugieren que el ensamblaje de clatrina puede no ser suficiente para estimular la invaginación de la membrana y, por lo tanto, los miembros de la familia ENTH juegan un papel importante generando la deformación de la membrana (FIG. 1.12)

ROLES ADICIONALES EN LA ENDOCITOSIS DE PROTEÍNAS QUE POSEEN EL MOTIVO ENTH O ANTH

En el sentido más estricto, un adaptador es definido por dos propiedades: primero, por su habilidad para unir moléculas cargo y segundo, por su capacidad para interactuar con clatrina. En este sentido, varias proteínas E/ANTH, incluyendo epsina, AP180, CALM (del inglés *Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia*), HIP1 (del inglés *Huntingtin-Interacting Protein 1*) y HIP12/HIP1R, estimulan el ensamblaje de clatrina uniéndose a esta proteína y reclutando los componentes de la CCs a las membranas (FIG. 1.13) [116, 132, 140-145]. Además, un creciente conjunto de evidencias sugiere que las proteínas E/ANTH funcionan también como adaptadores de cargos específicos, uniéndose a las señales de clasificación presentes en las porciones

citósolicas de las proteínas transmembrana y reclutando de esta manera a las proteínas a endocitar en los sitios de formación de las CCVs (Fig. 1.13).

Por otra parte, en lo que respecta a la familia de proteínas ENTH, las proteínas del tipo epsina clásica en mamíferos (epsina1/2/3) y en levaduras (Ent1/2), poseen inmediatamente después de dominio ENTH y hacia el C-terminal, dos o tres copias de UIMs, los cuales intervienen en la unión a las proteínas de membrana ubiquitinadas, concentrándolas de esta manera en las CCVs [146, 147]. Se conoce que la ubiquitinación es un regulador clave de la señal de endocitosis de las proteínas presentes en la superficie celular [148] y que AP-2 es necesario para el reclutamiento de solamente una determinada clase de cargos a las CCVs [102]. Es posible entonces, que las proteínas E/ANTH sean las responsables de concentrar proteínas a transportar de una manera independiente de AP-2. Otra alternativa, propone que las dos clases de adaptadores podrían funcionar cooperativamente para reclutar las moléculas cargo a las CCVs ya que varias proteínas E/ANTH se unen a AP-2 [149, 150].

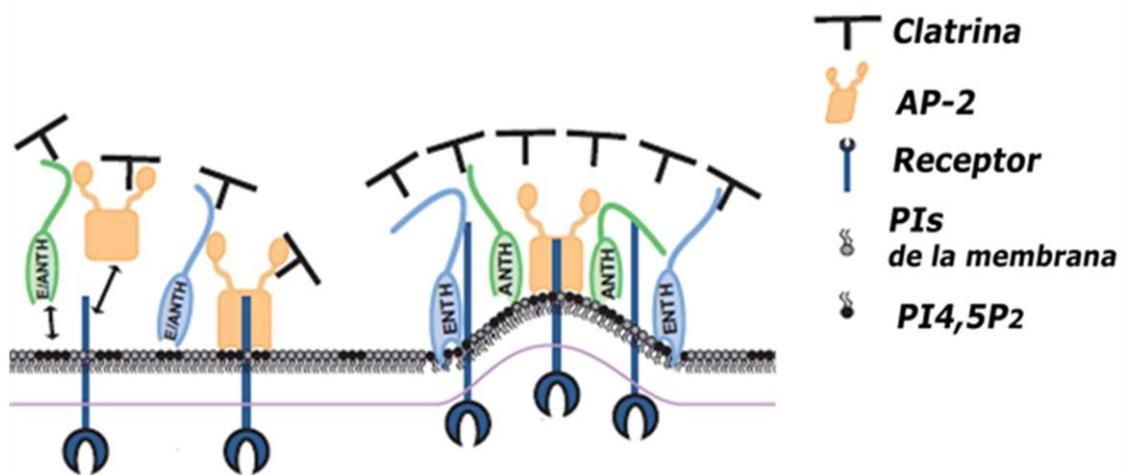


FIGURA 1.13: LA PROTEÍNAS E/ANTH ACTÚAN EN LA FORMACIÓN DE CCs Y CCVs. A la izquierda se muestra como las proteínas E/ANTH se unen a PI4,5P₂, los cuales se puede generar mediante la acción secuencial de quinasas, en microdominios específicos dentro de la reserva general de los PIs de membrana (gris claro). Las proteínas E/ANTH se unen a su vez a otras proteínas endocíticas. Además, otros componentes de la CCs, incluyendo AP-2, también pueden asociarse directamente a PI4,5P₂. Los receptores transmembrana se unen al complejo AP-2 a través de motivos de internalización específicos presentes en sus dominios citoplásmicos. Estas interacciones cooperativas conducen a la nucleación de las capas de clatrina en la membrana plasmática. A la derecha, se observa cómo a través de sus regiones C-terminales, varias proteínas E/ANTH estimulan el ensamblaje de clatrina, conduciendo a la formación de los CCVs. Por otra parte, la hélice α_0 se inserta en la membrana plasmática, lo que lleva a su deformación y curvatura. Adaptado de [2].

FUNCIÓN ADICIONAL EN EL TRANSPORTE DESDE LA TGN HACIA LOS ENDOSOMAS/LISOSOMAS DE PROTEÍNAS PORTADORAS DEL DOMINIO ENTH

El rol funcional del dominio de ENTH de epsinaR es menos conocido si se lo compara con la gran cantidad de bibliografía disponible sobre las proteínas del tipo epsina clásica. Ensayos *in vitro* revelaron que epsinaR tiene preferencia por PI4P [134] y se mostró que este PI está presente en las membranas del aparato de Golgi de mamíferos, donde se une a AP-1 [151]. Además, se ha observado que cuando se provoca una disminución de PI4P, se genera una reducción del reclutamiento de AP-1 al Golgi, interrumpiéndose de esta manera el transporte mediado por este AP multimérico [151]. Asimismo, se informó que el reclutamiento conjunto de epsinaR y AP-1 a los sitios enriquecidos con PI4P en la membrana de la TGN, podría aumentar la afinidad de estas dos proteínas adaptadoras entre sí y de su interacción con PI4P (**FIG. 1.14**). Por lo tanto, una combinación de interacciones entre proteínas y lípidos parece ser necesario para dirigir a epsinaR hacia su correcta ubicación. En la **FIGURA. 1.14** se muestra un modelo de las interacciones que lleva a cabo epsinaR en la TGN, donde se propone que la unión del dominio de ENTH a PIs, y la de la región C-terminal con otras proteínas adaptadoras, resulta esencial para reclutar la proteína a la TGN. Así, a través de interacciones con AP-1, GGA2 y clatrina, epsinaR podría estimular la formación de las CCVs en la proximidad de GGAs y AP-1, las cuales se unen a los dominios citoplasmáticos de los receptores, permitiendo así la concentración de estas proteínas transmembrana en la CCVs nacientes.

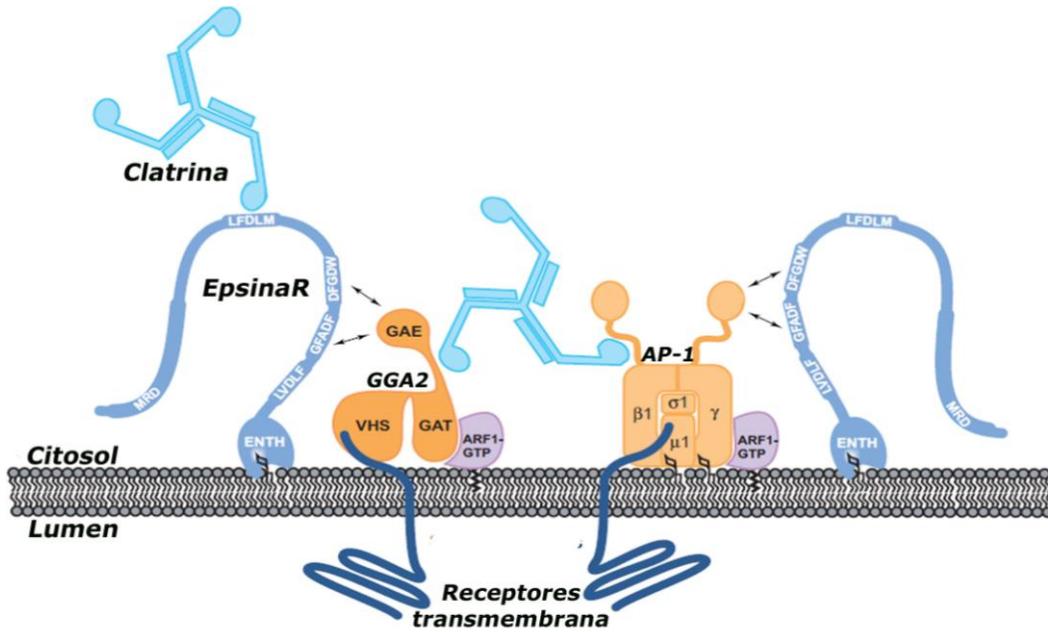


FIGURA 1.14: INTERACCIONES DE EPSINAR EN LA RED TRANS DEL GOLGI. Los APs AP-1 y GGA2 son dirigidos a la membrana a través de interacciones con ARF1-GTP, donde se unen a motivos peptídicos presentes en las colas citoplasmáticas de los receptores transmembrana. AP-1 se compone de cuatro subunidades distintas: γ , $\beta 1$, $\mu 1$ y $\sigma 1$. Las adaptinas γ y $\beta 1$ contienen una región C-terminal globular, que se conoce como un dominio apéndice. La unión a PI4P también contribuye a la concentración de AP-1 en la membrana. GGA2 es un AP monomérico que contiene los dominios VHS, GAT y GAE (apéndice y adaptina). Los dominios apéndice están ligados a los adaptadores a través de motivos flexibles. Ambos APs reclutan a los trisquelios de clatrina a la membrana de la TGN, a través de motivos de unión de clatrina. La región no estructurada C-terminal de epsinaR está involucrada en las interacciones con GGA2 y AP-1 a través del motivo de unión del dominio apéndice γ /GAE, con la secuencia GFADF y DFGDW. Además, epsinaR también se une al dominio terminal de la cadena pesada a través de clatrina mediante los motivos de unión: LVDLF y LFDLM, contribuyendo al montaje de esta proteína. Por otra parte, el dominio ENTH está implicado en la producción de la curvatura de la membrana insertándose en la bicapa lipídica. Adaptado de [2].

UNIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS A DOMINIOS E/ANTH

Como mencionamos, la unión a los PIs le permite a las proteínas que poseen los dominios E/ANTH llevar a cabo su función en las membranas. Sin embargo, muchas de ellas están presentes también en el citosol, lo que sugiere que podrían poseer roles adicionales que no estarían directamente relacionados con la formación de las CCVs. Se conoce que, además de ser similares a los motivos VHS, los dominios E/ANTH están estructuralmente relacionados con un segmento repetido *armadillo*, presente en β -catenina y a la unidad repetitiva HEAT de la β -karyoferina [120]. Tanto las repeticiones *armadillo* como las HEAT, son módulos de interacción de proteínas [121]. Por lo tanto, los dominios E/ANTH pueden tener propiedades de unión adicionales que le permitan interactuar con otras proteínas diferentes a las involucradas en el transporte vesicular. De hecho, ensayos de doble híbrido en levaduras utilizando el dominio ENTH de epsina1, reveló que ésta es capaz de interactuar con la proteína PLZF (del inglés *Promyelocytic*

Leukemia Zn²⁺ Finger), la cual previamente había sido descrita como un factor de transcripción [120]. Además, se reportó que esta interacción se produce *in vivo* y que PLZF puede dirigir a epsina1 al núcleo [120]. Asimismo, luego del tratamiento de células con leptomicina, que es un inhibidor de la exportación nuclear, se observó una acumulación de epsina1 y CALM en el núcleo [121]. Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que epsina1 podría funcionar como un regulador transcripcional, a través de su dominio de ENTH.

Recientemente, se determinó que los módulos E/ANTH aislados de varias especies, son capaces de unirse a tubulina y microtúbulos [121, 152]. Si bien existe una gran cantidad de información que ha revelado la presencia de vínculos complejos entre la maquinaria endocítica y el citoesqueleto de actina [153, 154], el papel de los microtúbulos en este proceso de transporte es menos claro.

Estos antecedentes en conjunto, insinúan múltiples roles para los dominios E/ANTH como módulos que permiten no sólo la unión a lípidos sino también a proteínas.

De todo lo expuesto, surgieron diversos interrogantes que dieron origen a este Trabajo de Tesis, algunos de ellos son: *¿posee Giardia proteínas adaptadoras monoméricas involucradas en el transporte de proteínas a vacuolas lisosomales? ¿Cuál es la maquinaria celular mínima con la que dispone el parásito para llevar a cabo el tráfico vesicular? Estas proteínas, ¿poseen funciones conservadas a las descritas en otros organismos eucariotas? Y, finalmente, ¿se pueden extrapolar estos datos para inferir el comportamiento de estos procesos en células eucariotas más evolucionadas?*

Para responder a estos interrogantes se llevaron a cabo diversos ensayos de bioquímica, biología celular y molecular. Así, en el **CAPÍTULO 2** se describen tanto las características principales como la función de la proteína adaptadora monomérica, GIENThp, en *G. lamblia*; mientras que en el **CAPÍTULO 3**, se analiza si la proteína de interés posee un rol conservado, utilizando como modelo de estudio el sistema de levaduras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este Trabajo de Tesis consiste en estudiar las proteínas involucradas en el transporte de moléculas desde la MP y el sitio de direccionamiento hacia las vacuolas lisosomales en *Giardia lamblia*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 CARACTERIZAR A LA PROTEÍNA ADAPTADORA MONOMÉRICA, GLENTHP, EN G. LAMBLIA.

- 1.1 Identificar a la proteína portadora del dominio ENTH, caracterizando estructuralmente este módulo conservado.
- 1.2 Estudiar la expresión y localización subcelular de GLENTHp en trofozoítos transfectados.
- 1.3 Determinar si GLENTHp interacciona con las proteínas que participan en la endocitosis y/o transporte vesicular, analizando si la proteína en estudio interviene en estos procesos.
- 1.4 Examinar si GLENTHp altera la homeostasis de las vacuolas lisosomales y/o el crecimiento celular.

2 CARACTERIZAR FUNCIONALMENTE A GLENTHP UTILIZANDO LA LEVADURA COMO SISTEMA MODELO.

- 2.1 Analizar si GLENTHp, o su dominio ENTH, son capaces de rescatar células de *Saccharomyces cerevisiae* que carecen de los genes Ent1/2.
- 2.2 Explorar la acción de GLENTHp en células de *Saccharomyces cerevisiae* privadas de Ent3/5.

CAPÍTULO 2:

IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA ENTH EN *G. LAMBLIA*

CAPÍTULO 2: IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA ENTH EN *G. LAMBLIA*

INTRODUCCIÓN

El lumen de cada uno de los compartimentos que participan en la ruta biosintética-secretora y en la endocítica, están en comunicación permanente entre sí mediante las numerosas vesículas de transporte que continuamente emergen por gemación de una membrana y se fusionan con otra.

En *Giardia lamblia*, el transporte vesicular de proteínas desde o hacia a las vacuolas periféricas (PVs), requiere de la participación de moléculas que regulen su transporte, entre ellas, las proteínas adaptadoras (APs) tanto oligoméricas como monoméricas y el coatómero clatrina. Estudios previos en nuestro laboratorio identificaron y caracterizaron las APs poliméricas AP-1 y AP-2. Sin embargo, hasta el presente trabajo, la presencia de APs monoméricas no habían sido descritas en este parásito.

RESULTADOS

GIARDIA POSEE UNA PROTEÍNA RELACIONADA CON LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA ENTH

El proyecto de secuenciación del genoma de *Giardia* se finalizó en el año 2007 y, desde entonces, la información difundida por el Banco de Datos del Genoma de *Giardia* (GDB) ha permitido realizar análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos, además de diversos estudios bioinformáticos. Así, mediante la realización de un cuidadoso escrutinio en esta base de datos, se identificó una secuencia de aminoácidos que codifica para una proteína a la que denominamos GIENThp (del inglés *Giardia lamblia ENTH protein*) (GL50803_3256) y que presenta en la región N-terminal un dominio altamente conservado en todas las proteínas que forman parte de la familia ENTH.

Dado que al menos un miembro de esta familia de proteínas está presente en todo el linaje eucariota, se decidió realizar un alineamiento múltiple de las secuencias del dominio ENTH de *G. lamblia* (gENTH) con el mismo dominio de las proteínas epsina y epsinaR, ya descritos en otros organismos (Fig. 2. 1). Este análisis demostró que gENTH comparte un ~25% de identidad en la secuencia con el dominio ENTH de epsina1 de *Homo sapiens* (HsENTH), ~31% de identidad con

el de epsinaR de *Homo sapiens* (HsENThr) y ~30% de identidad con el dominio ENTH de epsina1 de *Rattus norvegicus* (RnENTH) (FIG. 2. 1).

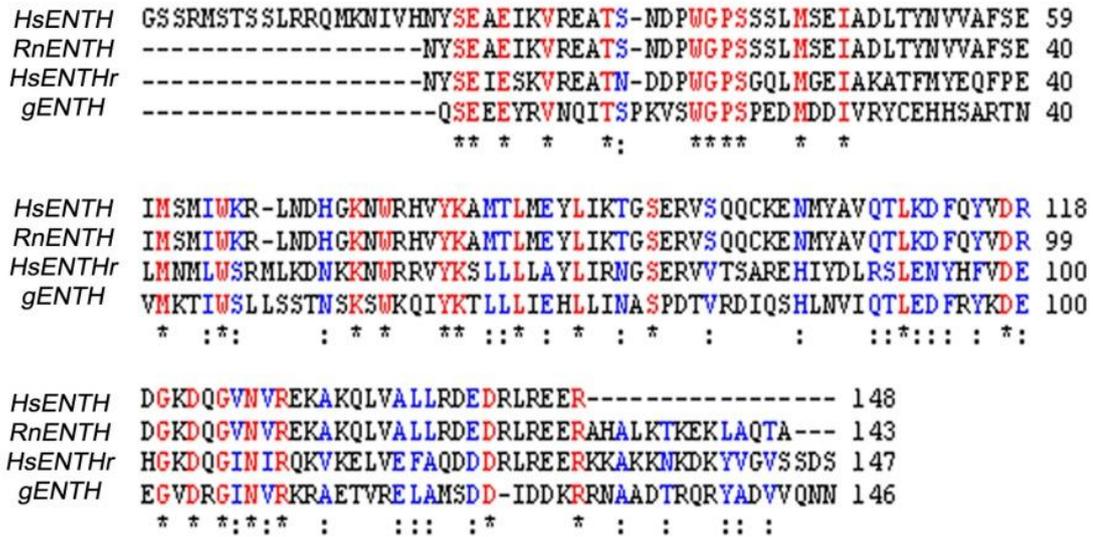


FIGURA 2.1: GIARDIA POSEE UNA PROTEÍNA CON DOMINIO ENTH CONSERVADO. Se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del motivo ENTH de epsina1 de humano (HsENTH), epsina1 de rata (RnENTH), epsinaR de humano (HsENThr) y ENTH de *Giardia* (gENTH). Residuos estrictamente conservados se destacan en rojo y con asterisco (*) mientras que los aminoácidos conservados en al menos 2 de las 4 secuencias se muestran en azul y dos puntos (:).

Puesto que *Giardia* se separó del linaje eucariota temprano en la historia evolutiva, se decidió llevar a cabo un análisis comparativo más exhaustivo del dominio N-terminal de los miembros de la familia ENTH, ahora utilizando los datos publicados para organismos filogenéticamente similares a *Giardia* como *Plasmodium falciparum* (Pf), *Trypanosoma cruzi* (Tc), *Trypanosoma brucei* (Tb), *Leishmania major* (Lm), *Toxoplasma gondii* (Tg), *Cryptosporidium parvum* (Cp), *Trichomona vaginalis* (Tv) y *Spiroplasma salmonicida* (Ss) y el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr). Este alineamiento arrojó diferentes grados de conservación entre las secuencias, aunque similares a las que se encontraron entre el dominio gENTH y el de *Homo sapiens* y *Rattus norvegicus*, con un promedio de 27% de homología entre las secuencias analizadas (FIG. 2. 2 A-B).



B

	gENTH	TcENTH	TbENTH	LmENTH	TgENTH	CpENTH	CrENTH	SsENTH	TvENTH	PfENTH
gENTH	100%									
TcENTH	23%	100%								
TbENTH	25%	73%	100%							
LmENTH	24%	57%	52%	100%						
TgENTH	25%	27%	24%	24%	100%					
CpENTH	23%	20%	20%	18%	45%	100%				
CrENTH	23%	35%	36%	33%	31%	25%	100%			
SsENTH	27%	24%	20%	22%	26%	20%	23%	100%		
TvENTH	23%	29%	27%	32%	30%	27%	26%	21%	100%	
PfENTH	16%	17%	16%	16%	30%	33%	18%	18%	19%	100%

FIGURA 2.2: ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS ENTH ENTRE CÉLULAS EUCARIOTAS TEMPRANAMENTE DIVERGENTES EN LA EVOLUCIÓN. Se grafica el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del motivo ENTH de *Giardia lamblia* (gENTH), *Trypanosoma cruzi* (TcENTH), *Trypanosoma brucei* (TbENTH), *Leishmania major* (LmENTH), *Toxoplasma gondii* (TgENTH), *Cryptosporidium parvum* (CpENTH), *Spironucleus salmonicida* (SsENTH), *Chlamydomonas reinhardtii* (CrENTH), *Trichomona vaginalis* (TvENTH) y *Plasmodium falciparum* (PfENTH). En cada columna del alineamiento, los aminoácidos idénticos se representan sombreados con negro y los aminoácidos similares están sombreados en gris. **(B)** En la tabla se describe el porcentaje de identidad en la secuencia entre cada par de ENTH dominios posibles.

Posteriormente, se analizó la homología de estructura terciaria de la secuencia ENTH primaria encontrada para GIENThp y de esta manera poder relacionar la estructura homóloga encontrada con su posible función en el parásito. Así, se obtuvo la estructura 3D de gENTH y se comparó con su contraparte de mamíferos debido a que esta proteína había sido previamente cristalizada (código Q9Y6I3). La predicción arrojó una estructura α -helicoidal compuesta de 7 α -

hélices que presenta 100% de homología con la estructura del dominio de ENTH de epsina1 de humano (HsENTH) (FIG. 2.3). El análisis de la secuencia de GIENThp compuesta de 405 aminoácidos no mostró la presencia de péptido señal.

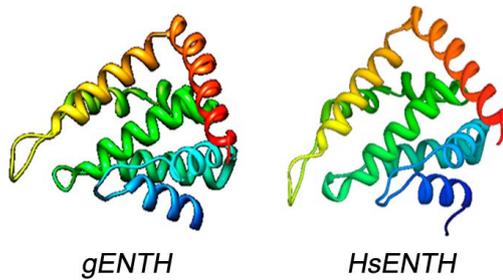


FIGURA 2.3: ESTRUCTURA 3D DEL DOMINIO ENTH. Se muestra el diagrama de cintas de los dominios ENTH de *Giardia* (gENTH) y de humano (HsENTH). El dominio gENTH fue construido usando HsENTH como modelo. HsENTH se une a PI4,5P₂, según la resolución por difracción de rayos X (1.70 Å). Los dominios ENTH están compuestos por 7 hélices α (Swiss-Model repository, UniProt AC: Q9Y6I3).

Debido a que ha sido descrito que los miembros de la familia ENTH poseen, en la región subsiguiente al dominio amino-terminal, varios motivos cortos a través de los cuales pueden interactuar con diferentes proteínas involucradas en el transporte vesicular mediado por clatrina, resultó de interés identificar si estos dominios conservados estaban presentes GIENThp. Tal como se expuso previamente, las proteínas epsina clásica contienen hacia el extremo carboxi-terminal tres motivos para interactuar con ubiquitina (UIM), múltiples repeticiones DPW, que median la interacción con el apéndice α de AP-2, dos secuencias de consenso para la unión a la cadena pesada de clatrina (cajas clatrina) y tres repeticiones NPF requeridas para la unión a Eps15, intersectina y otras proteínas que contienen el dominio EH [146,155,156,157]. Por otra parte, las proteínas epsinaR no contienen repeticiones NPF ni UIM, pero sí dominios de unión a clatrina, aunque estos motivos son diferentes a los descritos para epsina1-3 [115]. Además, las proteínas epsinaR presentan regiones para la unión con la subunidad γ de AP-1 y el dominio GAE (del inglés *Golgi-localized, gammaar-containing, Arf-binding*) de GGA en su región C-terminal [158] y también poseen una región rica en metionina (Met₄₂₇-Met₆₀₅), cuya función no ha sido analizada (FIG.2. 4) [117].

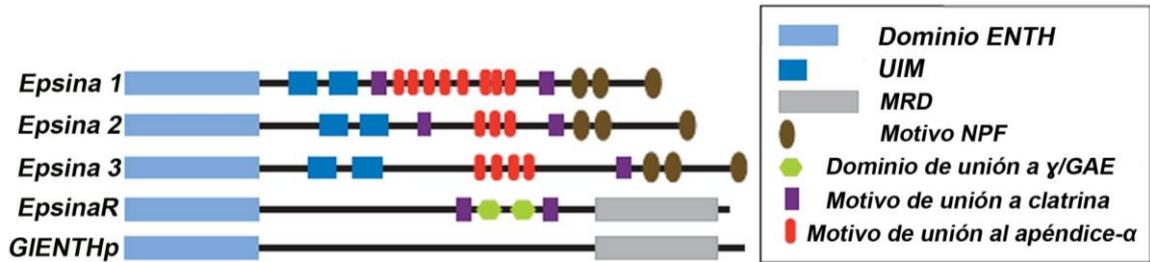


FIGURA 2.4: PROTEÍNAS DE LA FAMILIA ENTH Y SUS DOMINIOS. Se representan esquemáticamente las proteínas del tipo epsina clásica (epsina1-3) y epsinaR de mamíferos y GIENThp. Todas comparten una organización modular similar, con un dominio ENTH en la región N-terminal (en color celeste en el esquema), a través del cual interactúan con PIs, y una región C-terminal que contienen motivos peptídicos cortos y dominios que median las interacciones con otras proteínas. Particularmente, epsinaR contiene una secuencia rica en metionina cuya función aún no está claramente definida (se representa en gris). GIENThp también posee la secuencia enriquecida en metionina, aunque además posee un fragmento rico en prolina y glutamina hacia el extremo carboxilo terminal. Adaptado de [2].

Considerando estos antecedentes, se procedió con el análisis de la composición de aminoácidos de GIENThp, revelando este estudio que la proteína de interés no posee los dominios conservados UIM, DPW, cajas clatrina ni NPF, a diferencia de las proteínas epsina clásica, pero tampoco presenta los motivos de unión a γ AP-1 y proteínas GGA descritos para las proteínas epsinaR. Sin embargo, se encontró que GIENThp posee una secuencia rica en residuos metionina que contiene 32 residuos de metionina (Met₁₉₁ hasta la Met₄₀₃), 22 de los cuales están presentes en el segmento de Met₂₄₁-Met₃₅₄. La comparación de este segmento con el correspondientes en la epsinaR humana mostró que GIENThp podría presentar un segmento carboxilo enriquecido en residuos de metionina. Utilizando la misma estrategia, se encontró que la región C-terminal de GIENThp está además enriquecida en residuos prolina (P) y glutamina (Q), como ha sido descrito para epsinaR de *T. brucei* [159].

Los diversos análisis *in silico* de la secuencia de GIENThp que se llevaron a cabo, sugirieron que esta proteína única podría pertenecer a la familia de proteínas ENTH. Sin embargo, fue necesario realizar una caracterización detallada para dilucidar si GIENThp podría corresponder a una epsina clásica, a una epsinaR o, debido a la aparición temprana de *G. lamblia* en la historia evolutiva, a un miembro atípico con una función dual epsina-epsinaR.

GLENTHP COMO MIEMBRO DE LA FAMILIA ENTH

GLENTHP SE OBSERVA EN EL CITOPLASMA Y EN LOS NÚCLEOS EN TROFOZOÍTOS DE G. LAMBLIA

En eucariotas superiores, las proteínas del tipo epsina clásica se encuentran principalmente localizadas en el citoplasma y en la MP, mientras que las proteínas epsinaR están presentes en el citoplasma y aparato de Golgi. Para poder determinar la localización de GLENTHP, se generaron trofozoítos transgénicos *eglethp-ha* que contienen una copia integrada del gen *glethp* y expresan de manera estable la proteína de fusión GLENTHP-HA bajo el control de su promotor endógeno y con una etiqueta HA en la región C-terminal. Posteriormente, a través de ensayos de inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal se encontró que la proteína en estudio posee una distribución citoplasmática pero también se encuentra presente en los núcleos (Fig. 2.5).

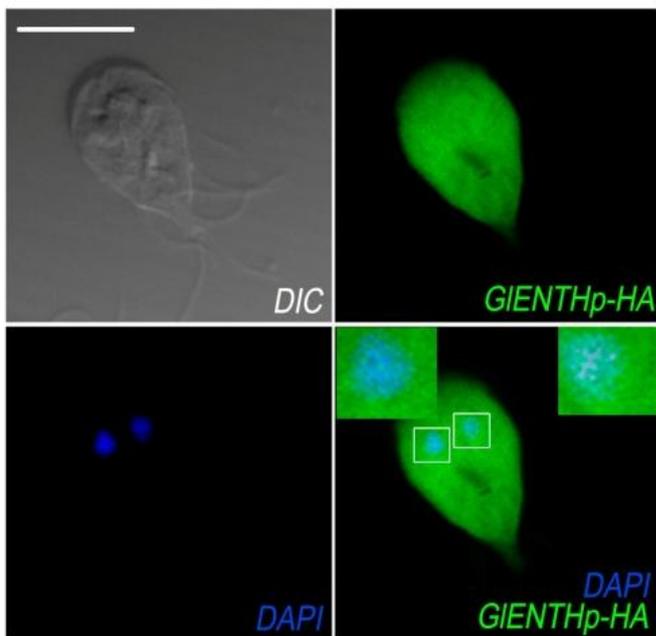


FIGURA 2.5: GLENTHP-HA ESTÁ PRESENTE EN EL CITOPLASMA Y EN LOS NÚCLEOS EN TROFOZOÍTOS TRANSFECTADOS. La proteína GLENTHP-HA (verde) se encuentra localizada principalmente en el citoplasma pero también dentro de los núcleos (azul), en trofozoítos transgénicos *eglethp-ha*. Se utilizó DAPI (diamidino-2-phenylindole) para teñir los núcleos. Zonas de colocalización entre verde y DAPI se representan en color cian en las inserciones. También se muestra la microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC). Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal. Barra: 5 μ m.

GLENTHP INTERACCIONA CON CLATRINA

Los miembros de la familia ENTH son frecuentemente denominados CLASP (del inglés *Clathrin Associated Sorting Proteins*), ya que sus regiones C-terminales unen la cadena pesada de clatrina y median el transporte vesicular dependiente de este coatómero. Así, para definir a GLENTHP como miembro de esta familia de adaptadores monoméricos, resultaba imprescindible analizar si esta proteína tenía la capacidad de unir clatrina. Para abordar este interrogante, se

realizaron diferentes ensayos que permitieron evaluar la interacción entre proteínas, como los ensayos de doble híbrido en levadura (YTH) y de coimmunoprecipitación (co-IP). En el caso del ensayo de YTH, se llevó a cabo utilizando la región C-terminal de GIΔENTHp (GIΔENTHp), ya que sería este segmento el involucrado en la interacción con clatrina. Así, el segmento C-terminal (correspondiente a los nucleótidos 141-1218) se clonó en marco de lectura con el dominio activador codificado por el vector de activación pGADT7, generando el vector pGIΔENTHp-AD. Para analizar la interacción con la cadena pesada de clatrina de *Giardia* o GICHC, se decidió dividir GICHC en 5 fragmentos. Esto permitiría no sólo facilitar su clonado, ya que la secuencia que codifica para esta proteína consta de 5616 nucleótidos, sino además la posibilidad de definir la unión a segmentos específicos. De esta manera, el primer segmento correspondió a los nucleótidos 1 al 1210, el segundo desde el 1211 hasta el 2420, el tercero desde el 3630 hasta el 4941, el cuarto desde el 4350 hasta el 5298 y el último fragmento desde el 4995 hasta el 5592, denominándose a los mismos como CHC1, CHC2, CHC3, CHC4 y CHC5, respectivamente. Estos fragmentos fueron clonados en marco de lectura con el dominio de unión a ADN codificado por el vector de unión al núcleo pGBKT7, generando los vectores pCHC1-BD, pCHC2-BD, pCHC3-BD, pCHC4-BD y pCHC5-BD. La interacción de GIΔENTHp sólo con un fragmento de clatrina (CHC4) se observó por el crecimiento de las células de levadura en medio carente de leucina, triptófano e histidina (TDO), el cual selecciona colonias que expresan proteínas interactuantes (FIG. 2.6). Mediante la utilización de un medio de alta astringencia que también carece de adenina (QDO) se demostró que la interacción directa de GIΔENTHp/CHC4 era además una interacción fuerte (FIG. 2.6). No se observaron interacciones con los fragmentos CHC1, CHC2, CHC3 o CHC5, lo que indica que la interacción GIΔENTHp/CHC4 es específica (FIG. 2.6).

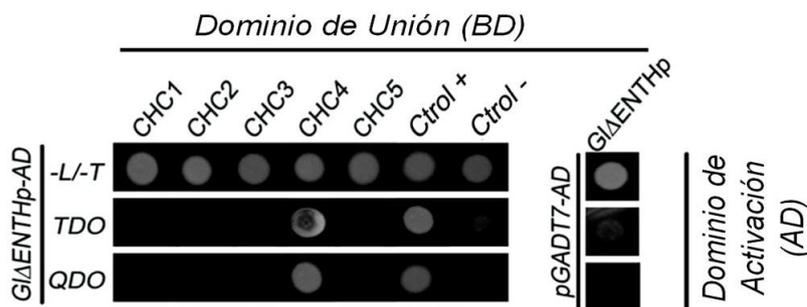


FIGURA 2.6: GLENTHP INTERACCIONA CON CLATRINA. Ensayos de YTH muestran que GIΔENTHp interacciona fuertemente con la secuencia de aa de CHC4 de la CHC de *Giardia* (las colonias crecieron en los medios selectivos TDO y QDO). Ctrl+: Control positivo de interacción proteína-proteína. Ctrl-: Control negativo de autoactivación. El control de autoactivación también incluye el par pGIΔENTHp-BD y el vector vacío pGADT7.

La asociación directa entre G1ENTHp-HA y G1CHC se confirmó por co-IP *in vivo*. Para llevar a cabo este experimento, fue necesario generar un anticuerpo policlonal (Acp) dirigido contra la proteína recombinante G1CHC, como proteína de fusión con la etiqueta tiorredoxina en el

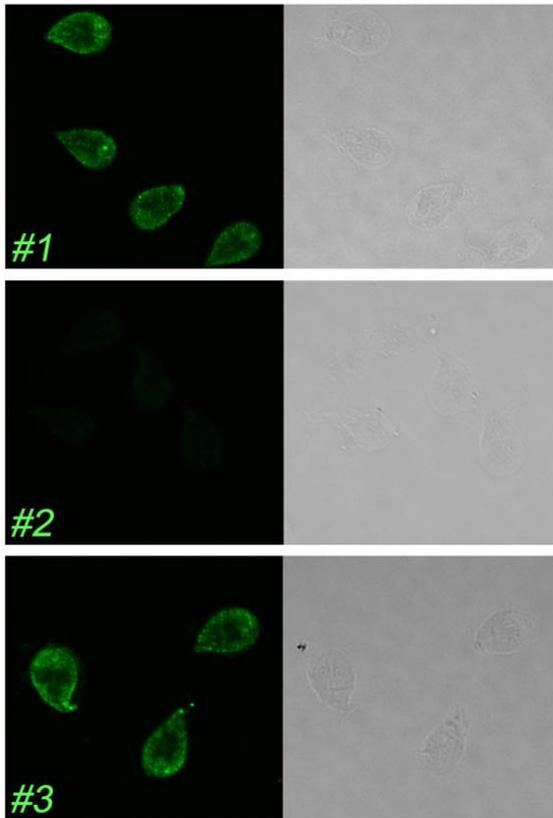


FIGURA 2.7. LOS ACP RECONOCEN PROTEÍNAS CITOSÓLICAS EN TROFOZOÍTOS SALVAJES. Luego de la inmunización, los ratones #1, #2 y #3 produjeron anticuerpos policlonales contra proteínas citosólicas de *Giardia*, como se observa en los ensayos de IF contra trofozoítos.

extremo N-terminal (Tx/6xHis-G1CHC). La proteína recombinante purificada (ver M & M, SECCIÓN 6.7.2) se utilizó para inmunizar 3 ratones de la cepa BALB/c. Luego de dos inmunizaciones, se procedió a purificar el suero de los ratones #1, #2 y #3 antes de sacrificarlos. A continuación, la especificidad de éstos fue testada mediante IF y microscopía confocal, a partir de la cual se observó que los anticuerpos de los sueros provenientes de los 3 ratones reconocían proteínas citosólicas en trofozoítos salvajes (FIG. 2.7). Posteriormente, mediante inmunotransferencia empleando un homogenato de trofozoítos salvajes, se observó que los sueros de los ratones #1 y #3 reconocían, en condiciones reductoras, una proteína de ~200 kDa, equivalente al peso molecular predicho por GDB para G1CHC (FIG. 2.8 A). Finalmente, los 3 sueros

fueron chequeados en ensayos de dot-blot utilizando homogenato total de trofozoítos salvajes y, como control, se empleó la proteína recombinante Tx/6xHis-G1CHC y vector de expresión pET-32a-m vacío. Este ensayo reveló que los sueros provenientes de los ratones #1 y #3 contenían anticuerpos policlonales con afinidad por proteínas de *Giardia* y también por Tx/6xHis-G1CHC (FIG. 2.8 B).

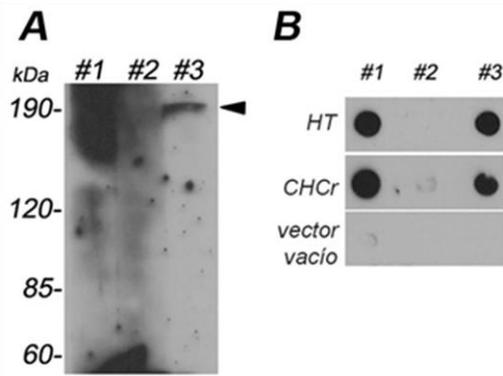


FIGURA 2.8: DETERMINACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE ACP CONTRA GLCHC. (A) El homogenato de proteínas totales de *Giardia* fue corrido en un gel de poliacrilamida al 8% y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Las bandas positivas, obtenidas luego del agregado de cada suero, se observaron por quimioluminiscencia. Los sueros de los ratones #1 y #3 reconocen una proteína de ~200 kDa coincidente con la masa molecular de GlCHC. (B) Ensayos de dot-blot muestran que el suero del ratón #1 y #3 reconoce la proteína nativa GlCHC presente en un homogenato total de *Giardia* (HT) y la proteína recombinante (CHCr). Control utilizando el vector de expresión pET-32a-m vacío no muestra reacción cruzada con ninguno de los sueros testeados

Debido a estos resultados, es que se eligió utilizar los Acp generados por el suero del ratón #3 para llevar a cabo los ensayos de co-IP. De esta manera, los trofozoítos transgénicos que sobre-expresaban GlENTHp-HA fueron lisados e incubados con el Acp anti-GlCHC producido por el ratón #3 y perlas de proteína L-agarosa. Los resultados mostraron que GlENTHp-HA expresada en trofozoítos transgénicos fue coprecipitada con clatrina, tal como se observa por inmunotransferencia (Fig. 2.9).



FIGURA 2.9: GLENTHP COINMUNOPRECIPITA CON CLATRINA. Experimentos de co-IP confirman que GlENTHp interacciona con clatrina *in vivo*. 1: GlENTHp-HA inmunoprecipitada desde células transgénicas utilizando un Acp anti-GlCHC. GlENTHp-HA fue detectada utilizando un Acp anti-HA marcado con HRP (banda de ~50 kDa). 2: Control empleando un Acp irrelevante. 3: Control usando células no transfectadas. 4: Se observa GlENTHp-HA en la muestra de inicio. Estos datos se muestran como inmunotransferencia representativa de 1 de los 3 experimentos independientes realizados.

GLENTHP SE UNE A FOSFOINOSITOLES ESPECÍFICOS

La función principal de las proteínas de la familia ENTH consiste en la interacción de su dominio N-terminal conservado con fosfoinositoles (PIs), los cuales se encuentran en microdominios específicos de membranas. Como resultado de esta interacción, se produce la deformación de la bicapa lipídica previo a la formación de las vesículas revestidas de clatrina (CCVs) [107]. Se conoce que cada uno de los miembros de la familia ENTH presenta diferente especificidad en cuanto a la unión a lípidos. Mientras que las proteínas del tipo epsina clásica reconocen PI4,5P₂, que se encuentra principalmente en la MP, las epsinaR se unen a PI4P, enriquecido principalmente en las membranas del Golgi [121]. Esto se corresponde con las

diferentes funciones que llevan a cabo los miembros de esta familia de adaptadores monoméricos [107].

A través del empleo de la técnica de resonancia magnética nuclear se han estudiado los residuos críticos del dominio ENTH de epsina involucrados en la unión a los PIs [131, 160]. Así, mediante la generación de mutantes puntuales de varios residuos de aminoácido presentes en el dominio ENTH y estudiando la afinidad de la unión a PI4,5P₂ en las mutantes generadas, encontraron que la sustitución de una lisina en la posición 76 (K76) por una alanina (A) impedía completamente la unión del dominio ENTH a PI4,5P₂ en células COS-7 [131, 160]. Encontraron además que las células que expresaban la proteína mutante K76, presentaban defectos en la internalización mediada por clatrina del factor de crecimiento epidérmico (EGF) [131, 160]. De manera similar, se describió en la ameba *Dictyostelium* que la sustitución de ese residuo lisina conservado por alanina anulaba la capacidad del dominio ENTH para unir PI4,5P₂, imposibilitando así la asociación de la proteína con la MP [131, 160] y confirmando que el residuo K76, situado en el interior de los dominios ENTH es crítico para su fuerte afinidad por PIs. Por lo tanto, el paso siguiente para avanzar en el estudio de la función del dominio gENTH consistió en identificar la presencia de este residuo conservado para poder producir la mutación, encontrándose que este aminoácido se ubicaba en la posición 75 en la secuencia de GIENThp (K75). En primera instancia se utilizó el programa SNAP (del inglés *Screening for Non-Acceptable Polymorphisms*) [161] para predecir el efecto de sustitución de K75 por A75 de gENTH, ya que este programa permite predecir los efectos funcionales que provoca la sustitución de un aminoácido puntual. Los resultados mostraron que la mutación K₇₅A sería una mutación no neutral, sugiriendo que la sustitución de este aminoácido específico podría ocasionar una alteración en la función de gENTH. Por otra parte, la sustitución “in silico” de K75 por A75 no mostró cambios en la estructura 3D del sitio ENTH.

Estas predicciones nos alentaron a realizar la sustitución de este aminoácido a fin de poder evaluar si la proteína mutada era incapaz de reconocer PIs y, si este fuese el caso, contar con la posibilidad de utilizar la sobre-expresión de esta proteína mutada para evaluar la localización y función de GIENThp en trofozoítos. Así, mediante mutagénesis sitio-dirigida sobre el vector pGIENThp-HA, se obtuvo el gen que codifica para la proteína mutada GIENTh_{K75A}-HA, que contiene la secuencia en tándem del epítopo HA en el extremo C-terminal y el promotor de tubulina. De esta manera, se obtuvieron trofozoítos transgénicos *glenthk75a* que sobre-expresan la proteína GIENTh_{K75A}-HA con la posibilidad de generar así un clon mutante de GIENThp. Ensayos de inmunotransferencia mostraron que GIENTh_{K75A}-HA se expresaba correctamente como una proteína de ~50 kDa (**Fig. 2.10 A**) y que su ARNm se expresaba 1,5 veces más que en trofozoítos

salvajes (WB/1267) y de manera equivalente a la expresión del ARNm de GIENThp en los trofozoítos transgénicos *glenth-ha* (FIG. 2.10 B).

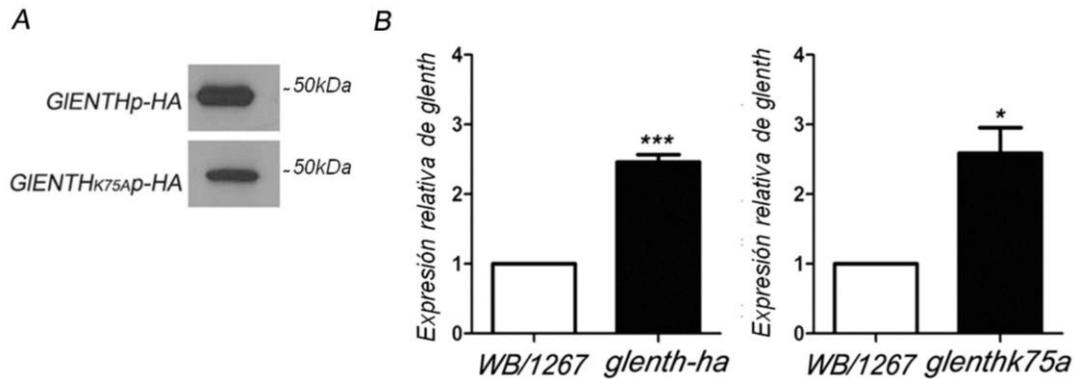


FIGURA 2.10: EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUTADA GIENTh_{K75A}-HA. (A) A través de ensayos de inmunotransferencia se muestra la expresión de GIENTh_{K75A}-HA. (B) qRT-PCR: la expresión de ARNm de GIENThp en trofozoítos salvajes (WB/1267) y transgénicos *glenth-ha* y *glenthk75a*. Se muestran diferencias significativas sobre la base de pruebas t entre los tipo salvaje y los transgénicos (**P < 0,005). Las barras de error indican la desviación estándar para experimentos con más de un ensayo.

A continuación, se testeó la habilidad de GIENThp y GIENTh_{K75A}p de interactuar con uno o más fosfolípidos mediante un ensayo bioquímico (PIP Strip, ver M & M, SECCIÓN 6.15), que consiste en la utilización de membranas hidrofóbicas a las que se le han impregnado diferentes fosfoinosítidos y lípidos biológicamente importantes (FIG. 2.11 A). Cuando se incubó el homogenato de trofozoítos transgénicos *glenth-ha* o *glenthk75a-ha* con la membrana PIP Strip y luego se reveló la presencia de las proteínas GIENThp-HA y GIENTh_{K75A}-HA mediante el agregado del Acm anti-HA marcado con HRP, se observó que GIENThp-HA se unía a PI3,4,5P₃ y PI4P mientras que GIENTh_{K75A}-HA fue incapaz de interactuar con los lípidos de la membrana (FIG. 2.11 A). Los ensayos utilizando el homogenato de la cepa salvaje WB/1267 fueron utilizados como control negativo del experimento y no mostraron señal de interacción (FIG. 2.11 A). Para corroborar este ensayo, se realizaron ensayos de co-IP empleando en este caso trofozoítos transgénicos *glenth-ha* y *glenthk75a-ha*, previamente estimulados con bilis. En este contexto, se describió que cuando se incuban trofozoítos de *Giardia* con sales biliares ocurre un incremento rápido y sostenido en la actividad de enzima fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y, consecuentemente, un aumento en la cantidad de PIs [40, 162-164; Gesumaria y Machado, comunicación personal]. Así, los ensayos de co-IP utilizando los Acm anti-PI3,4,5P₃ y anti-PI4P y el homogenato de los trofozoítos transgénicos *glenth-ha* o *glenthk75a*, confirmaron que GIENThp-HA pero no GIENTh_{K75A}p-HA era capaz de interactuar específicamente con PI3,4,5P₃ y PI4P, tal

como se reveló por inmunotransferencia utilizando el Acm anti-HA marcado con HRP (Fig. 2.11 B). El hecho de que GIENTHp-HA fue capaz de interactuar con PI4P y PI3,4,5P₃, enriquecidos en la membrana del Golgi y MP en células de mamíferos, respectivamente, sugería que GIENTHp-HA se comportaba en este parásito como un miembro de la familia ENTH. Además, debido a que la mutante GIENTH_{K75A}-HA presentó un dominio ENTH defectuoso en la unión a PIs, señalaba que el residuo conservado K75 sería crucial en la interacción de GIENTHp con PIs y, por ende a la membrana, como ocurre con otros miembros de esta familia.

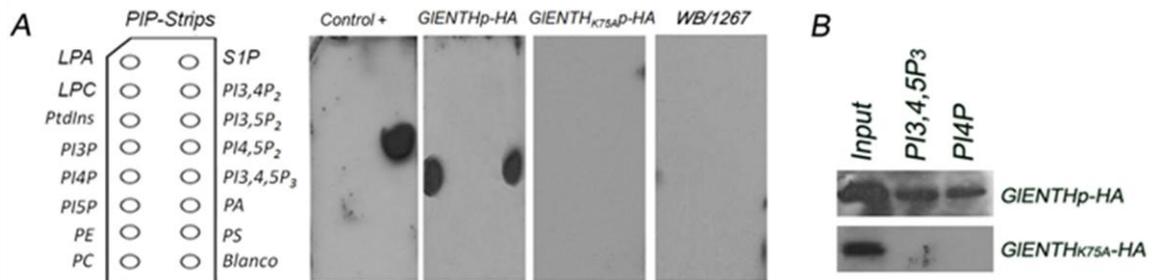


FIGURA 2.11: EL DOMINIO ENTH DE *GIARDIA* (GENTH) SE UNE A FOSFOINOSITOLES ESPECÍFICOS. (A) Trofozoítos transfectados *glenth-ha*, *glenthk75a* y salvajes *WB/1267* se lisaron y añadieron a la membrana de nitrocelulosa con lípidos adheridos (PIP Strip). Utilizando un Acm anti-HA marcado con HRP se pudo determinar que la proteína completa GIENTHp-HA interactúa con PI4P y PI3,4,5P₃ *in vitro*, mientras que GIENTH_{K75A}p-HA no interacciona con PIs. Control +: dominio PH de PLC-δ1 con un tag GST el cual se une a PI4,5P₂. El lisado de trofozoítos de la cepa salvaje (*WB/1267*), se usó como control negativo. Ácido lisofosfatídico (LPA), lisofosfatidilcolina (LPC), fosfatidilinositol (PtdIns), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), esfingosina 1-fosfato (S1P), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS). **(B)** Ensayos de IP e inmunotransferencia utilizando los Acm anti-PI3,4,5P₃ o PI4P y revelado con Ac anti-HA marcado con HRP, muestran que GIENTHp-HA, pero no GIENTH_{K75A}p-HA, interactúa con estos PIs.

Para indagar cómo era la asociación de GIENTHp a membranas, se realizaron ensayos de fraccionamiento en medio hipotónico de manera de poder observar la presencia de proteínas en la fracción citoplasmática y/o en la fracción de membranas. Así, se valoró la distribución tanto de GIENTHp-HA como de la mutante GIENTH_{K75A}p-HA para evaluar además si, efectivamente, la mutación K₇₅A en gENTH impedía la asociación de la proteína con las membranas, tal como había sido descrito para la mutante de epsina en *Dictyostelium* [131, 160]. El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo mediante la lisis celular de trofozoítos transgénicos *glenth-ha* y *glenthk75a* en un tampón hipotónico, previo a la separación por centrifugación [159]. Cuando cantidades equivalentes de cada una de las fracciones se analizaron por ensayos de inmunotransferencia, se encontró que GIENTHp-HA estaba presente principalmente en la fracción

citoplasmática (C) y en menor proporción en la población de proteínas que interactúan con membrana (M). Por otro lado, cuando se analizó la versión mutante GIENTH_{K75A}p-HA se observó a esta proteína exclusivamente en la fracción C. Como se esperaba, la proteína transmembrana VSP1267, que fue utilizada como control, quedó retenida en la fracción M (FIG. 2.12, PANEL IZQUIERDO). Los resultados de la densitometría de las bandas obtenidas a partir de tres experimentos independientes, fueron graficados, observándose con mayor claridad el porcentaje de cada proteína en las fracciones C y M (FIG. 2.12, PANEL DERECHO). Estos últimos resultados, cuando se analizan globalmente, señalan que GIENTH_p se uniría a membrana a través de su interacción con PIs específicos y que la presencia del residuo conservado K75 sería esencial para dicha interacción y para el anclaje de GIENTH_p en las membranas.

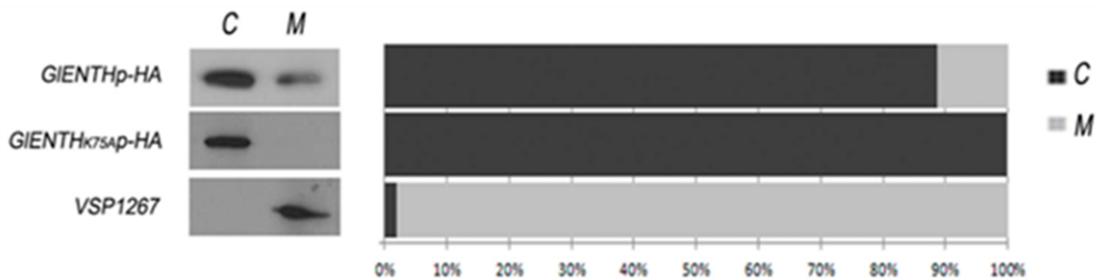


FIGURA 2.12: EL DOMINIO ENTH ES ESENCIAL EN EL ANCLAJE EN LAS MEMBRANA. Parásitos transgénicos *glenth-ha* y *glenthk75a* se lisaron bajo condiciones hipotónicas y se recuperaron las fracciones citoplasma (C) y unido a membrana (M). La proteína transmembrana VSP1267 se utilizó como control. Los datos de densitometría de cada banda para la relación entre C y M se exponen a la derecha.

No existe en la actualidad una descripción detallada acerca de la presencia de PIs en *Giardia*. Sin embargo, resultados recientes mostraron que los genes de tres quinasas fosfatidilinositol (PIK) se expresan durante todo el ciclo celular [95] y que *Giardia* es capaz de producir PI3P, PI4P y PI4,5P₂ [165; Gesumaria y Machado, comunicación personal]. Para evaluar la localización subcelular de PI3,4,5P₃ y PI4P, trofozoítos salvajes WB/1267 fueron previamente estimulados con bilis, para potenciar la síntesis de PIs, y luego evaluados mediante ensayos de IF empleando los Ac comerciales disponibles anti-PI3,4,5P₃ y anti-PI4P. Las imágenes obtenidas muestran que PI3,4,5P₃ está presente como un puntillado en todo el cuerpo del trofozoíto aunque enriquecido en zonas cercanas a la MP (región en la que se ubican las PVs) y también en los flagelos (FIG. 2.13, PANEL IZQUIERDO). Por otro lado, PI4P presenta un patrón similar a la distribución del RE con una clara acumulación en la envoltura nuclear (FIG. 2.13, PANEL DERECHO). Los resultados observados sugieren que GIENTH_p podría estar interactuando con PI3,4,5P₃ en la MP y con PI4P en el RE.



FIGURA 2.13: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PI3,4,5P₃ Y PI4P EN G. LAMBLIA. Las imágenes de IF y microscopía de epifluorescencia muestran la localización citoplasmática para PI3,4,5P₃ y PI4P en trofozoítos. La presencia de PI3,4,5P₃ en los flagelos se denota con puntas de flecha. Barras: 10 μ M.

Las características de GLENTHP encontradas hasta el momento, tales como la presencia de un dominio ENTH capaz de interactuar con PI3,4,5P₃ y PI4P, la localización citoplasmática y la interacción con clatrina, son comunes a las descritas en la mayoría de los miembros de la familia ENTH. Por lo tanto, nos preguntamos si podría existir en *Giardia* el rol conservado llevado a cabo por estas APs monoméricas en el transporte vesicular mediado por clatrina. Para responder a este interrogante se llevaron a cabo diversos ensayos que se detallan a continuación.

GLENTHP PRESENTA CARACTERÍSTICAS DE EPSINA CLÁSICA PARTICIPANDO EN LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR

La endocitosis es el proceso por el cual las células internalizan porciones de la MP para la captación de nutrientes y moléculas vitales. Este proceso le permite controlar la composición de dicha membrana, la interrelación con el medio externo y la regulación de las múltiples vías de señalización como formas de mantener la homeostasis celular. Las proteínas del tipo epsina clásica son capaces de cumplir diferentes roles en los sitios donde se inicia la endocitosis, actuando como adaptadores endocíticos uniéndose directamente al cargo ubiquitinado e interactuando con otros componentes de la maquinaria involucrada en la endocitosis, como por ejemplo con AP-2 y clatrina.

GLENTHP INTERACCIONA CON UBIQUITINA

A continuación del dominio ENTH, en la secuencia de las proteínas epsina clásica, ha sido observada la presencia de dos o tres copias de UIM [156]. Desde el descubrimiento de estos motivos, el mayor interrogante ha consistido en establecer cómo estas proteínas son capaces de unir ubiquitina (Ub). Hasta el momento, se han propuesto diferentes ideas en cuanto a la función

de estos dominios; entre ellas, se incluye la de reconocer receptores ubiquitinados para reclutar moléculas cargo específicas dentro de la vesícula endocítica en formación [146, 155].

Puesto que los resultados obtenidos hasta el momento nos daban indicios de que GLENTHp podría formar parte de la familia ENTH, el siguiente paso fue determinar si esta proteína poseía características de epsina clásica. Para identificar si la proteína en estudio era capaz de interactuar con Ub, se realizaron ensayos específicos para evaluar la asociación entre ambas proteínas. En el caso del YTH, se prosiguió tal como se describió más arriba (cuando se evaluó la interacción entre GLENTHp y GICHC) utilizando solo la región C-terminal de la proteína (GLENTHp), por lo que se empleó el vector pGLENTHp-AD. Por otro lado, la secuencia completa de Ub fue clonada en el vector pGBKT7 generando el plásmido pUb-BD. Así, el crecimiento de las colonias de levaduras en el medio de astringencia media TDO (ver M & M SECCIÓN 6.13), mostró que GLENTHp interactuaba de manera débil con Ub (FIG. 2.14 A). Esta asociación se corroboró por co-IP *in vivo*, utilizando trofozoítos *glenth-ha* y el Acp anti-Ub de *Giardia* [166], observando que GLENTHp-HA inmunoprecipitó conjuntamente con Ub (FIG. 2.14 B).

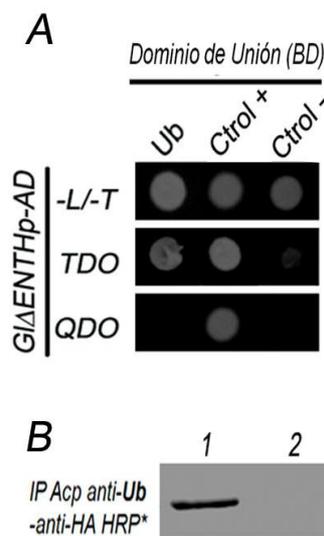


FIGURA 2.14: GLENTHP INTERACCIONA CON UBIQUITINA. (A) Mediante ensayos de YTH, se encontró una interacción débil entre GLENTHp y Ub, que se puso de manifiesto por el crecimiento de las células de levadura en medio selectivo TDO pero no en QDO. Ctrl+: Control positivo de interacción proteína-proteína. Ctrl-: Control negativo de autoactivación. **(B)** Experimentos de co-IP demuestran la interacción entre GLENTHp y Ub. 1: GLENTHp-HA coprecipitó con Ub en células transgénicas empleando el Acp anti-Ub. GLENTHp-HA fue detectada utilizando un Acp anti-HA marcado con HRP (banda de ~50 kDa). 2: Control empleando un Acp irrelevante. 3: Control usando células no transfectadas. 4: Se observa GLENTHp-HA en la muestra de inicio.

GLENTHP INTERACCIONA CON AP-2

En células de mamíferos, ha sido demostrado que las proteínas epsina clásica interactúan con el adaptador proteico AP-2 [114]. Además, se conoce que esta unión se lleva a cabo a través de una de las dos subunidades grandes de la proteína adaptadora polimérica, que se conoce con el nombre de α AP-2. Así, para extender nuestro análisis acerca de GLENTHp como una proteína del tipo epsina clásica, se decidió evaluar si interactuaba con el adaptador polimérico

AP-2. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de YTH utilizando nuevamente el vector **pGIΔENTHp-AD**, el cual se enfrentó a los vectores **pαAP-2-BD** y **pμAP-2-BD** que contienen la subunidad mayor de AP-2 (αAP-2) o la subunidad media (μAP-2), respectivamente. El resultado arrojó que GIΔENTHp interactuaba fuertemente con αAP-2, evidenciado por el crecimiento de las células de levadura en el medio TDO y QDO, pero no con la subunidad μAP-2 (FIG. 2.15 A). Restaba determinar si GIΔENTHp, además de interactuar con AP-2, era capaz de colocalizar con esta proteína, como ha sido observado en diversos estudios sobre la localización subcelular de epsina [129]. En este sentido, nuestro grupo mostró anteriormente que AP-2 se observaba en las PVs y en la MP en trofozoítos en crecimiento [73]. Así, cuando se realizaron ensayos de IF y microscopía confocal en trofozoítos que expresaban GIΔENTHp-HA endógena, se observó una co-localización parcial en regiones cercanas a la MP, en las zonas donde se encuentran presentes las PVs (FIG. 2.15 B). Para cuantificar el grado de superposición entre ambas proteínas se empleó el coeficiente de solapamiento de *Manders* (M) que varía entre 0 y 1 (para ausencia o presencia de superposición, respectivamente), como se explica en la SECCIÓN 6.9 de M & M. La superposición parcial entre AP-2 y GIΔENTHp-HA observada en las imágenes arrojó un índice de M de 0,754, lo que indica que alrededor del 75% de la marca de AP-2 (píxeles en rojo) colocaliza con GIΔENTHp-HA (píxeles en verde), independientemente de los niveles de señal.

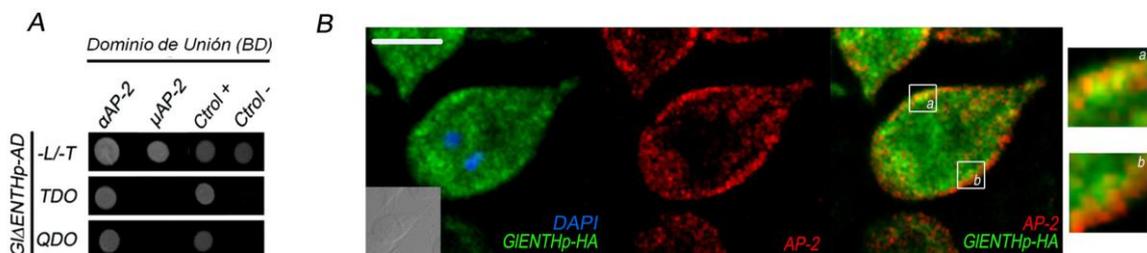


FIGURA 2.15: GIENTHP INTERACCIONA CON AP-2. (A) La subunidad α pero no la subunidad μ de AP-2 interactúa con GIΔENTHp, cuando se evaluó con el método de YTH. Para probar la interacción de las proteínas se utilizaron los medios selectivos TDO y QDO. Ctrl+: Control positivo de interacción proteína-proteína. Ctrl-: Control negativo de autoactivación. **(B)** A través de IF y microscopía confocal, se demostró que GIENTHp-HA (verde) y AP-2 (rojo) colocalizan parcialmente (GIENTHp-HA/AP-2). En las inserciones a la derecha se magnifican las regiones de la célula donde la fluorescencia verde y roja se superpone parcialmente (amarillo). Serie z 9/31: 3.2 μm. El núcleo está teñido con DAPI (azul). Se muestra como inserción la microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC). Barra: 5 μm.

GLENTHP PARTICIPA EN LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR DE LDL

La presencia del dominio de N-terminal ENTH que une fosfoinosítidos presentes en la MP, la interacción de su porción C-terminal con la subunidad α de AP-2 y GICHC y su capacidad para asociarse con Ub, sugerían que GLENTHp podría comportarse como una proteína del tipo epsina clásica. Así, resultaba clave analizar si la proteína en estudio era capaz de llevar a cabo alguna función en la endocitosis mediada por receptor, tal como ocurre en el caso de estos adaptadores monoméricos.

Aunque ha sido descrito en células de levadura que epsina participa en la internalización de muchas proteínas de la membrana, entre ellas el receptor del factor alfa (Ste2) [167, 168], hasta la fecha no se han encontrado moléculas cargo cuyo transporte sea específicamente llevado a cabo a través de epsina. Además, en células eucariotas más evolucionadas, se ha demostrado que epsina es requerida para la endocitosis de ligandos del tipo Notch [169] y también se han presentado evidencias que implican a este adaptador en la internalización el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [170] y del canal de sodio epitelial (ENac) [171]. En el caso de *Giardia* un obstáculo importante se presentó a la hora de abordar el rol de GLENTHp en la endocitosis mediada por receptor, ya que no ha sido demostrada la presencia de ninguno de estos ligandos, además de la escasa disponibilidad de marcadores específicos de las diferentes organelas de este parásito. Favorablemente, nuestro grupo de trabajo había descrito previamente que la lipoproteína de baja densidad (LDL) es endocitada, para fines nutritivos, a través de una proteína relacionada al receptor de LDL (GILRP) y de la proteína adaptadora AP-2 [73]. Por lo tanto, para estudiar si GLENTHp es capaz de llevar a cabo el rol de epsina clásica, se decidió analizar la internalización de LDL.

Para abordar este análisis funcional se utilizó además una nueva estrategia con el objetivo de disminuir la expresión de GLENTHp. Si bien regular negativamente la expresión génica en *G. lamblia* no es una tarea sencilla debido a la naturaleza poliploide de su genoma [17], una alternativa valiosa consiste en el empleo de la técnica del ARN de interferencia (ARNi), en la cual se produce el silenciamiento génico post-transcripcional debido a la expresión de ARN doble cadena homólogo (ARNdc) [172]. Nuestro laboratorio ha desarrollado una adaptación de la técnica para la depleción funcional de la expresión de genes en el parásito, que consiste en la producción de fragmentos largos de ARNdc [96, 173]. Además, se ha demostrado que estos ARNdc-largos endógenos son considerablemente más efectivos para producir la interferencia que la expresión de ARNdc-cortos endógenos u exógenos [174]. Así, para silenciar el gen de *glenth* se utilizó el vector de expresión de dsRNA (ver M & M SECCIÓN 6.3.3) en el que se clonaron nucleótidos del 1 al 778 del marco de lectura abierto (ORF) de *glenth*, generándose así el vector

pdsRNAglenth. Luego de la transfección y selección de trofozoítos transgénicos *ds-enth*, la producción del ARNdc fue inducida mediante la adición de 10 µg/mL de tetraciclina. Cuarenta y ocho horas después, se analizó el efecto del ARNdc en la expresión del RNAm de *glenth* mediante qRT-PCR revelando una inhibición de la expresión significativamente disminuida si se la compara con trofozoítos salvajes *WB/1267* (Fig.2.16).

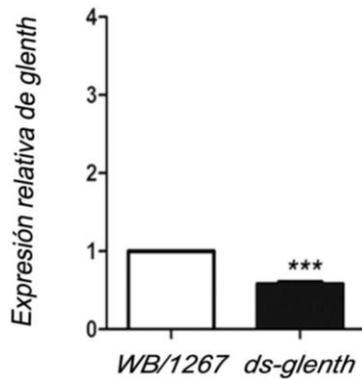


FIGURA 2.16: DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GLENTHP. Se muestran, la expresión de ARNm de GLENTHP en trofozoítos salvajes (*WB/1267*) y transgénicos *ds-glenth*, mediante qRT-PCR. Se exponen diferencias significativas sobre la base de pruebas t entre los tipo salvaje y los transgénicos (***P <0,005). Las barras de error indican la desviación estándar para experimentos con más de un ensayo.

Con la intención de establecer si GLENTHP participaba en la endocitosis mediada por receptor de LDL, los trofozoítos transfectados con los vectores *pGLENTHP-HA*, *pGLENTHP_{K75A}-HA* o *pdsRNAglenth* y los de tipo salvaje (*WB/1267*) se cultivaron hasta alcanzar la fase logarítmica. Para los experimentos de internalización, el medio de crecimiento fue reemplazado por un medio de marcado libre de suero, conteniendo Bodipy-LDL. En todos los casos, las células se mantuvieron durante 30 min a 4°C, ya que esta situación permite la unión de LDL a su receptor pero inhibe su internalización. Seguidamente, los trofozoítos se lavaron para retirar la cantidad de Bodipy-LDL no adherido y se restableció la endocitosis al retornar las células a 37°C. Después de 30 min a 37°C, los trofozoítos vivos se visualizaron por microscopía de fluorescencia. A continuación, se cuantificó la cantidad de células que mostraron localización del colorante fluorescente en las PVs en cada una de las muestras [73]. Así, las imágenes mostraron una marcada disminución en la internalización de LDL en trofozoítos *glenthk75a* y *ds-glenth* comparados con las células *WB/1267* y *glenth-ha* (Fig. 2.17 A). Como control de estos experimentos se analizó la internalización de FITC-dextrano (marcador de endocitosis de fase fluida), sin observar diferencias en la internalización de esta molécula inerte entre los diferentes tipos celulares empleados (Fig. 2.17 A, FITC-DEXTRANO). Posteriormente se cuantificó el número de trofozoítos que presentaban Bodipy-LDL en las PVs y el de trofozoítos totales y se obtuvo el porcentaje de endocitosis de LDL. Se encontró claramente que existe una reducción significativa en la endocitosis de LDL de las células *glenthk75a* y *ds-glenth* (Fig. 2.17 B). La información provista

por estos resultados, sugieren una participación activa de GLENTHp en la endocitosis de LDL mediada por receptor.

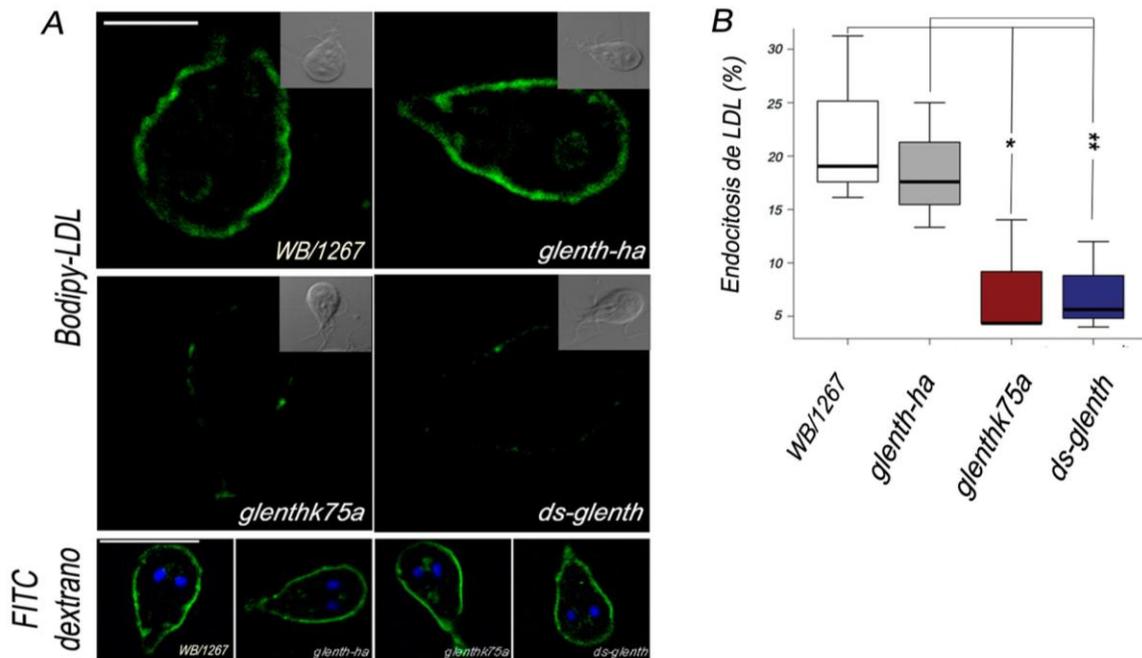


FIGURA 2.17: GLENTHP PARTICIPA EN LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR. (A) Se muestran ensayos de microscopía confocal de fluorescencia de la endocitosis de Bodipy-LDL (hasta 30 min). FITC-dextrano fue utilizado para probar la internalización por fase fluida. El ADN nuclear se marca con DAPI (azul). Barra: 10 μ m. (B) Los gráficos de box-plot muestran que la endocitosis de Bodipy-LDL disminuye en las células *glenthk75a* y *ds-glenth* comparadas con los trofozoítos *WB/1267* (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, respectivamente, utilizando ANOVA de una vía). Efectos similares se observan cuando se comparan trofozoítos *glenth-ha* y *ds-glenth* (** $p < 0,005$).

GLENTHP POSEE TAMBIÉN CARACTERÍSTICAS DE EPSINAR PARTICIPANDO EN TRANSPORTE DE PROTEÍNAS DESDE EL SITIO DE DIRECCIONAMIENTO HACIA LAS PVS

Como se menciona anteriormente, la formación de vesículas recubiertas con clatrina se encuentra bien caracterizada y se conoce que están involucradas en el transporte específico de proteínas desde la MP a los endosomas tempranos y desde el aparato de Golgi hasta los endosomas tardíos. Es de esperar entonces que, si bien poseen estructura similar, su composición sea variable, dependiendo ésta de la molécula cargo a transportar y de sus adaptadores específicos. Diferentes estudios mostraron que en el caso de las vesículas recubiertas con clatrina que se originan en la TGN, los adaptadores proteicos involucrados son AP-1, GGAs y la proteína epsinaR.

GLENTHP INTERACCIONA CON γ AP-1

Al momento de su hallazgo, se mostró que epsinaR interacciona con la subunidad mayor del adaptador multimérico (γ AP-1) y con GGAs (GGA1/2) en células COS [134]. En *Giardia*, hemos encontrado que el transporte de proteínas lisosomales desde el RE a las PVs es mediado por AP-1 y clatrina pero no por GGAs, ya que estos adaptadores monoméricos no se encuentran presentes en el genoma del parásito. A partir de estos datos, se decidió avanzar en la caracterización de la región C-terminal de GLENTHP, mediante el análisis de la posible interacción entre GLENTHP y AP-1 por ensayos de YTH, enfrentando a la versión G Δ ENTHP tanto con γ AP-1 como con la subunidad media (μ AP-1). Los resultados obtenidos mostraron que G Δ ENTHP interactúa fuertemente con γ AP-1 pero no con la subunidad μ AP-1, tal como lo demostró el crecimiento de las células de levadura en el medio QDO. (Fig. 2.18).

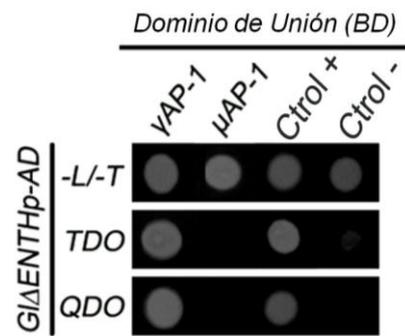


FIGURA 2.18: GLENTHP INTERACCIONA CON AP-1. Ensayos de YTH muestran que la subunidad γ AP-1 pero no la μ AP-1 interacciona con G Δ ENTHP. Para probar las interacciones proteína-proteína se utilizaron los medios selectivos TDO y QDO. Ctrol+: Control positivo de interacción proteína-proteína. Ctrol-: Control negativo de autoactivación.

Se conoce que epsinaR está presente en los sitios de direccionamiento ya que, por ejemplo, se encontró por inmuno-electro microscopía (IEM) a esta proteína en vesículas de clatrina, las cuales se encontraban en gemación desde la TGN [134]. Sin embargo, en los trofozoítos de *Giardia* no se ha visualizado un aparato de Golgi típico, con cisternas paralelas y se ha sugerido que sitios específicos del RE (llamados ERES, del inglés *ER-Exit Site*) podrían llevar a cabo un rol en el direccionamiento de proteínas hacia los diferentes compartimentos subcelulares [99]. Por este motivo, se decidió testear la localización de GLENTHP en los sitios de direccionamiento del parásito mediante ensayos de colocalización de la proteína en estudio con la chaperona residente de RE: BiP (del inglés *immunoglobulin heavy chain-Binding Protein*), ya que se demostró que esta proteína y la subunidad Sec23 del coatómero COPII colocalizan en los sitios ERES [78]. Así, mediante IF y microscopía confocal, empleando trofozoítos que expresan endógenamente GLENTHP-HA, se encontró que ambas proteínas colocalizan parcialmente en diferentes puntos del RE (Fig. 2.19), mostrando un coeficiente de M de 0,655 cuando se realizó el análisis cuantitativo de la colocalización de Bip/GLENTHP-HA.

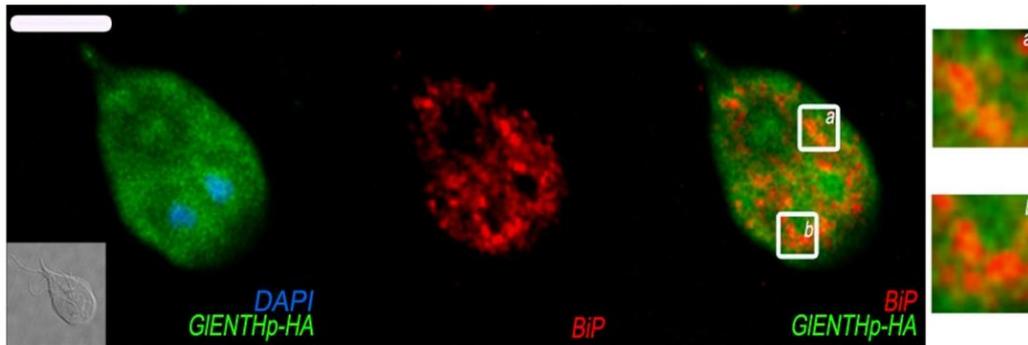


FIGURA 2.19: GIENTHP COLOCALIZA PARCIALMENTE CON BiP EN EL RE. Ensayos de IF y microscopía confocal muestran que GIENTHp-HA (verde) colocaliza parcialmente con la chaperona residente del RE BiP (rojo) en el RE (GIENTHp-HA/BiP). En las inserciones a la derecha se magnifican las regiones de la célula donde la fluorescencia verde y roja se superpone parcialmente (amarillo). Serie z 7/31: 1.2 μm . El núcleo está teñido con DAPI (azul). Se muestra como inserción la microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC). Barra: 5 μm .

GIENTHP PARTICIPA EN EL TRANSPORTE DESDE RE HACIA LAS PVS

Los resultados presentados anteriormente indicaban la participación de GIENTHP en la endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, debido a que hemos encontrado la presencia de GIENTHP en sitios específicos del RE y de que es capaz de interactuar con la subunidad γ de AP-1, clatrina y PI4P, era posible entonces que GIENTHP estuviese involucrada en el transporte de proteínas lisosomales desde el RE a las PVS y funcionar como una proteína adaptadora monomérica involucrada en dos procesos de transporte diferentes.

Para indagar esta posibilidad se analizó la activación de la hidrolasa fosfatasa ácida (AcPh: del inglés *Acid Phosphatase*) en las PVS. En nuestro laboratorio, se describió a la AcPh como una proteína soluble, la cual, luego de ser sintetizada en el RE, es transportada hacia las PVS, a través de su receptor GIVps y AP-1, dónde se convierte en una enzima activa [175]. Para este ensayo se utilizó el sustrato específico ELF 97, que es el blanco de las enzimas fosfatasas y genera un producto precipitado fluorescente verde-amarillo en el sitio de la actividad enzimática. Además, variando el pH de la solución amortiguadora se puede distinguir entre la actividad de fosfatasa alcalina (pH 7) y fosfatasa ácida (pH 5,5). Así, solamente si AcPh es correctamente dirigida a las PVS es capaz de activarse a pH ácido y ejercer su acción sobre el sustrato ELF 97 en estas organelas. Luego de realizar este ensayo enzimático, se observó que la actividad de AcPh se redujo drásticamente en los trofozoítos transgénicos *glenthk75a* y *ds-glenth*, debido a la ausencia de fluorescencia (FIG. 2.20 A, PANEL SUPERIOR), como habíamos observado anteriormente cuando se inhibía la expresión del receptor GIVps [175]. La adición de LysoTracker a estas células no mostró alteración en el pH de las PVS, descartando la posibilidad de que la pérdida de la actividad de la

enzima se corresponda a una alteración en el ambiente ácido de las PVs (FIG. 2.20 A, PANEL INFERIOR). El análisis cuantitativo del área fluorescente mostró una reducción significativa en la activación de la AcPh en los trofozoítos *glenthk75a* y *ds-glenth* en comparación con las células *WB/1267* o *glenth-ha* (FIG. 2.20 B). Estos resultados, sumados a los revelados anteriormente, demuestran que GIENTHP está involucrada en el transporte de AcPh, desde el RE hacia las PVs, llevando a cabo también un rol como proteína adaptadora del tipo epsinaR en *Giardia*.

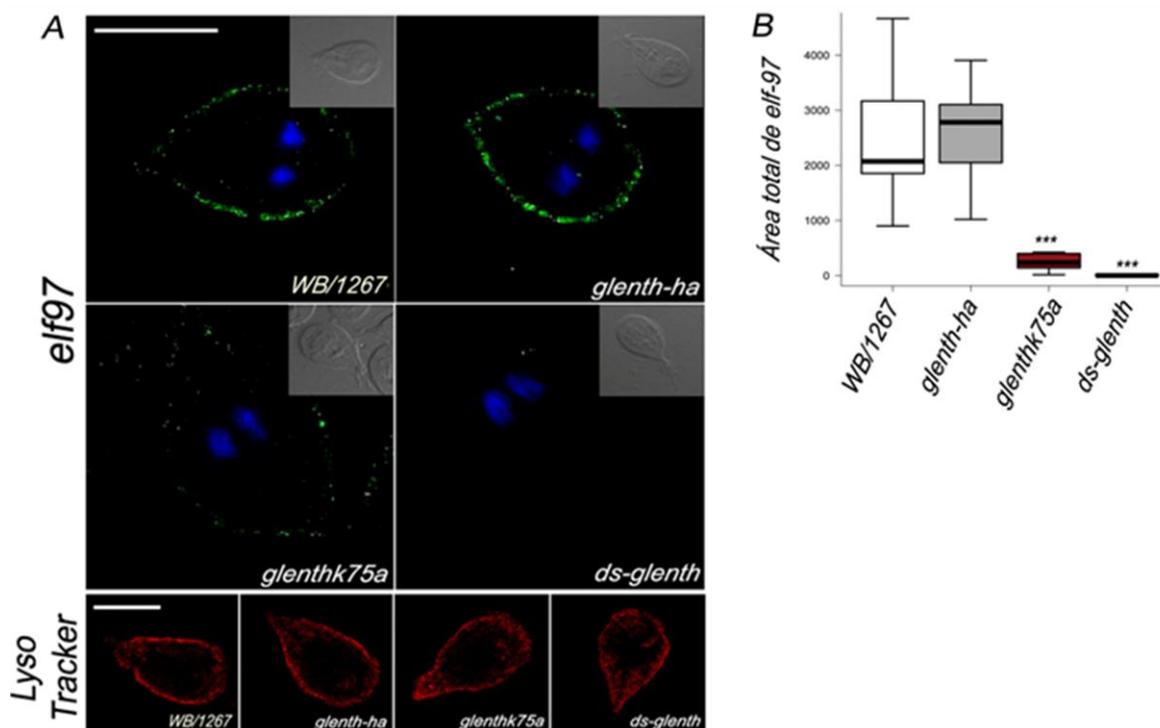


FIGURA 2.20: GIENTHP INTERVIENE EN EL TRANSPORTE DESDE EL ER HACIA LAS PVS. (A) Utilizando ELF 97 a pH 5.5, se observó una notable reducción de la actividad de la fosfatasa en trofozoítos *glenthk75a* y *ds-glenth* comparados con la cepa salvaje (*WB/1267*) y *glenth-ha*. El ADN nuclear se marca con DAPI (azul). La fluorescencia consistente de LysoTracker demuestra que la acidificación de las PVs se conserva en todas las células. Barra: 10 μ m. **(B)** Los gráficos muestran las mediciones cuantitativas de la fluorescencia de ELF 97 (actividad de la fosfatasa ácida). Se observa una disminución significativa en la fluorescencia media en células *glenthk75a* y *ds-glenth* cuando se las compara con las células *WB/1267* y *glenth-ha* (***) $p < 0.0001$, ANOVA de una vía).

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GLENTHP ALTERA LA HOMEOSTASIS DE LAS PVs

Fue descrito que en *G. lamblia*, una proteína relacionada a dinamina (GIDRP) colocalizaba con clatrina en la periferia de la célula y era necesaria para la endocitosis de las proteínas de superficie hacia las PVs en trofozoítos [91]. Por IEM e imágenes en células vivas, se revelaron drásticos cambios morfológicos, como así también el deterioro funcional del sistema endocítico en células que expresan la mutante dominante negativa de GIDRP (DRP-mut) [91]. Debido a que los resultados obtenidos mostraban que los cambios en la expresión de GLENTHp generaban alteraciones en la endocitosis mediada por receptor y en el transporte desde RE hacia las PVs, se decidió analizar si la expresión diferencial de GLENTHp ocasionaba alguna variación en la morfología del trofozoíto. Para esto, se llevaron a cabo ensayos de IEM utilizando las células de tipo salvaje y las transgénicas *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-enth*. Las PVs han sido descritas como vacuolas de forma ovalada, heterogéneas en tamaño y densidad [67, 176]. Sin embargo, a través de IEM, encontramos que los trofozoítos transgénicos con la expresión disminuída de GLENTHp (*ds-glenth*) muestran acumulación de material electrodensito en todas las PVs (FIG. 2.21 A). Un efecto similar se observó en las células *glenthk75a* que sobre-expresan la mutante GLENTH_{K75A}-HA. Por el contrario, las células *glenth-ha* que sobre-expresan GLENTHp-HA, revelan una pérdida del material electrodensito en la mayoría de las PVs analizadas, comparado con la cepa salvaje (WB/1267) (FIG. 2.21 A). A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de PVs electrodensas ("PVs llenas") y no electrodensas ("PVs vacías") observándose diferencias entre las células *ds-glenth* y el resto de los grupos (One-Way ANOVA, $p < 0,01$ y la prueba de Tukey) (FIG. 2.21 B). Se encontró además que las PVs presentes en las células mutantes *glenthk75a* eran de mayor tamaño que las observadas en la cepa salvaje (FIG. 2.21 C), similar al efecto encontrado en células de *Giardia* que expresan la mutante DRP-mut [91]. Estos estudios sugieren que GLENTHp estaría involucrada en el transporte de material hacia y/o desde las PVs, lo que podría reflejar un papel activo en la maduración de las vacuolas.

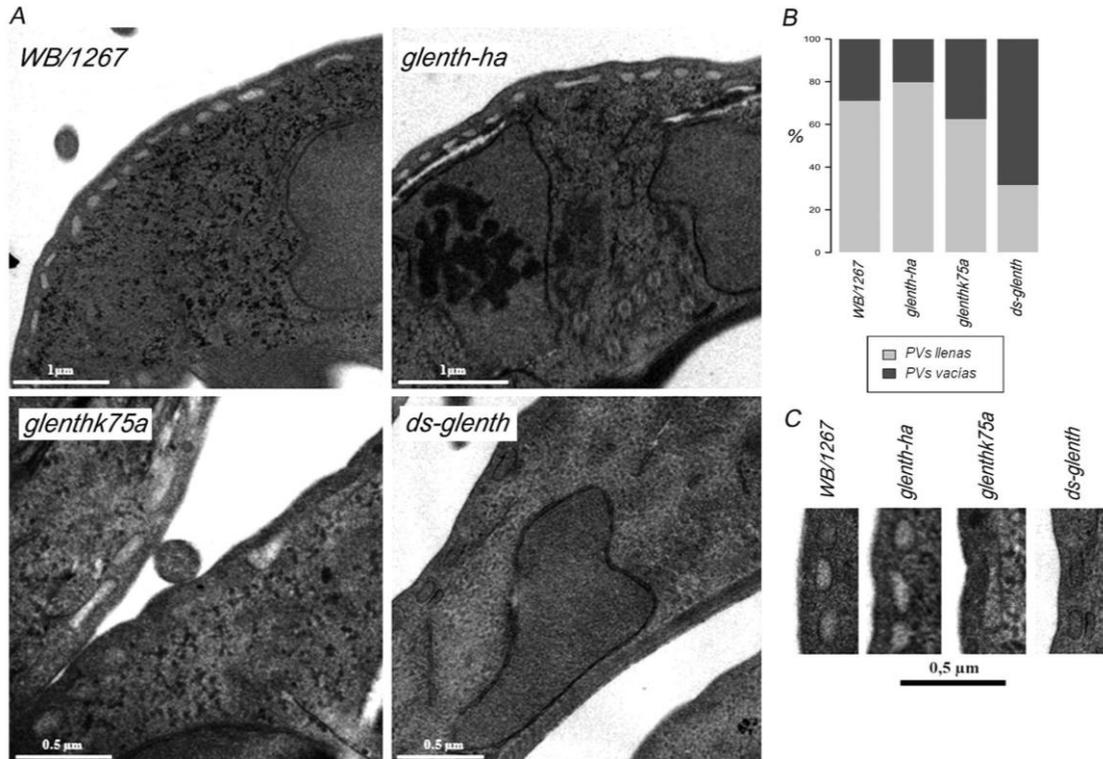


FIGURA 2.21: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GLENTHP ALTERA LA HOMEOSTASIS DE LAS PVS (A) Imágenes obtenidas a través de IEM en trofozoítos transgénicos presentan alterada la opacidad de las PVs. Las secciones transversales muestran que el interior de PVs individuales varía en electrodensidad, lo que sugiere que estas vacuolas presentan diferente contenido (*cepa salvaje*: WB/1267). Las células que sobre-expresan GLENTHP-HA (*glenth-ha*) muestran una pérdida de material electrodensito en la mayoría de las PVs analizadas. Por el contrario, los trofozoítos transgénicos *glenthk75a* y *ds-glenth* presentan una mayor acumulación de material electrodensito en todas las PVs. Las barras de escala: 0.5 μ m. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes con n=20 células. **(B)** El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la relación entre PVs que contienen material electrodensito (PVs llenas) y las PV que no contienen material electrodensito (PVs vacías). Los trofozoítos *glenthk75a* y *ds-glenth* mostraron un aumento numérico de “PVs llenas” en comparación con las células de WB/1267 y *glenth-ha*. **(C)** Se muestra una ampliación de las IEM para observar en detalle el tamaño de las PV en *glenthk75a* y la acumulación de material electrodensito en las PVs de las células transgénicas *glenthk75a* y *ds-glenth*. Las imágenes son a escala.

LA FUNCIÓN DE GLENTHP ES CRÍTICA PARA EL CRECIMIENTO DE *GIARDIA*

Las alteraciones de tamaño y composición de las PVs presentes en las células transgénicas *ds-glenth* o *glenthk75a*, se asemeja a lo encontrado en trofozoítos salvajes después de la adición del microbicida lactoferrina (LF, proteína de la familia de transferrina) o sus péptidos antimicrobianos N-terminales (LFpep) [177, 178]. Además, trofozoítos tratados con LF mostraron también un efecto drástico en el crecimiento [177]. Estos antecedentes nos alentaron a estudiar si habría alguna alteración en el crecimiento de los trofozoítos en las células *glenth-ha*, *glenthk75a* o

ds-glenth, por lo que se decidió realizar curvas de crecimiento. Debido a que la inhibición de la expresión de GIENTHp requería la inducción de *glenth* ARNdc con la adición de tetraciclina (Tet), se utilizó como control células salvajes (*WB/1267*) a la que se le agregó la misma cantidad de Tet necesaria para la inducción. Así, se encontró que el agregado de esta droga no ocasionaba una disminución significativa en el crecimiento de los trofozoítos salvajes si se los comparaba con los cultivos celulares sin Tet (FIG. 2.22). Sin embargo, este experimento mostró que las células transgénicas *ds-glenth* y *glenthk75a* causaron un severo defecto en el crecimiento, lo cual se relaciona con la PVs volviéndose más electrodensas (FIG. 2.22). Por el contrario, no se observó un efecto significativo en el crecimiento en las células *glenth-ha* (FIG. 2.22), sugiriendo un efecto correlativo entre la inhibición del crecimiento celular y la acumulación de material denso en el PVs.

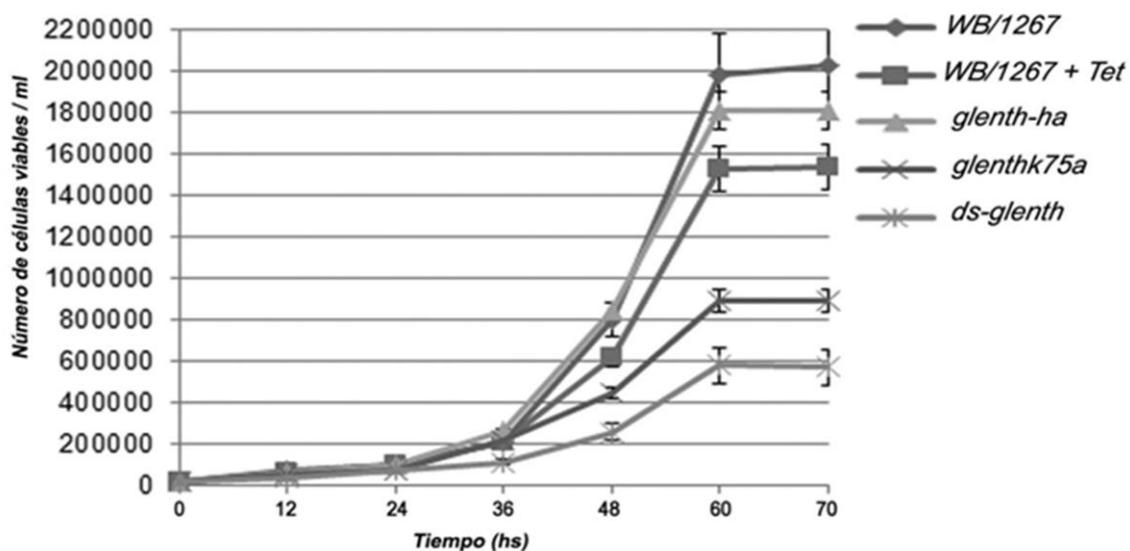


FIGURA 2.22: GLENTHP POSEE UN ROL CRÍTICO EN EL CRECIMIENTO DE GIARDIA. Curva de crecimiento de células de la cepa salvaje (*WB/1267*), *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-glenth*: a tiempo cero, $1,8 \cdot 10^5$ trofozoítos fueron inoculados en medio completo de crecimiento y el número de trofozoítos se determinó cada 12hs. Como control, se adicionó Tet a las células de la cepa salvaje (*WB/1267+Tet*) mostrando un efecto de menor importancia en el crecimiento comparada con los cultivos sin Tet. El crecimiento de los trofozoítos *ds-glenth* se reduce dramáticamente cuando es comparado con células *WB/1267* y *WB/1267+Tet*. También se observa una reducción significativa en el crecimiento de trofozoítos *glenthk75a* pero no ocurre lo mismo en *glenth-ha* si se las compa con las células salvajes. Los datos representan la media \pm s.d. para n = 16 en dos experimentos independientes

GIENTHP ES TRANSPORTADA DENTRO Y FUERA DEL NÚCLEO DEPENDIENDO DE SU CAPACIDAD DE UNIR PIs

Diversas evidencias apoyan la idea de que las proteínas involucradas en la endocitosis podrían también llevar a cabo un rol en el núcleo [120, 179]. Para el caso de epsina, se encontró que el dominio ENTH epsina1 de rata interaccionaba con el factor de transcripción PLZF (del inglés *Promyelocytic Leukemia Zn²⁺ Finger Protein*). Además, se halló que cuando se incubaba a células CHO con Leptomomicina B, un metabolito fúngico que inhibe la salida de las proteínas del núcleo, se inducía una acumulación de epsina1 en esta organela [120, 179]. Sorprendentemente, nosotros encontramos un incremento en la localización de GIENTh_{K75A}-HA en uno de los núcleos, cuando se la comparó con GIENThp-HA (Fig. 2.23 A), mediante ensayos de IF y microscopia confocal utilizando trofozoítos transgénicos *glenth-ha* y *glenthk75a*. Debido a que estos resultados sugerían la posibilidad de que el aumento de GIENTh_{K75A}-HA en el núcleo dependiera de la incapacidad de GIENTh_{K75A}-HA para unir PIs, es que se decidió incubar a células *glenth-ha* con inhibidores de fosfatidil inositol quinasas (PIK). Como se conocía que LY294002 pero no Wortmannina era capaz de inhibir la síntesis de PI3K en *Giardia* y, más aún, que el crecimiento de los trofozoítos se encontraba drásticamente disminuido en presencia de LY294002 en concentraciones desde 5 a 250 µM [180, 181], es que se eligió a este inhibidor para responder nuestro interrogante. Así, cuando las células transgénicas se trataron con LY294002, para reducir la síntesis de PI3,4,5P₃ y PI4P, se observó un incremento significativo en la localización nuclear de GIENThp-HA en las células tratadas con el inhibidor (GIENThp-HA+), cuando se las comparaba con GIENThp-HA sin tratar (Fig. 2.23 A-B). Por el contrario, no se evidenció un aumento en la localización nuclear de GIENTh_{K75Ap}-HA en cultivos transgénicos *glenthk75a* con o sin tratamiento con LY294002 (Fig. 2.23 A-B). Estos resultados fueron más claros cuando se analizó estadísticamente la localización nuclear de GIENThp en estas células (Fig. 2.23 C), sugiriendo que GIENThp podría entrar y salir continuamente del núcleo en función de la capacidad de la proteína de ser retenida en la membrana del RE o en la MP por su unión a PIs, tal como se ha observado para otras proteínas que contienen el dominio ENTH [120, 179]. Fue llamativo además que el aumento en la localización nuclear de GIENThp-HA y GIENTh_{K75Ap}-HA no se produjo de manera equitativa en ambos núcleos, sino que sólo un núcleo resultó ser positivo (Fig. 2.23 A) (Ver en la discusión).

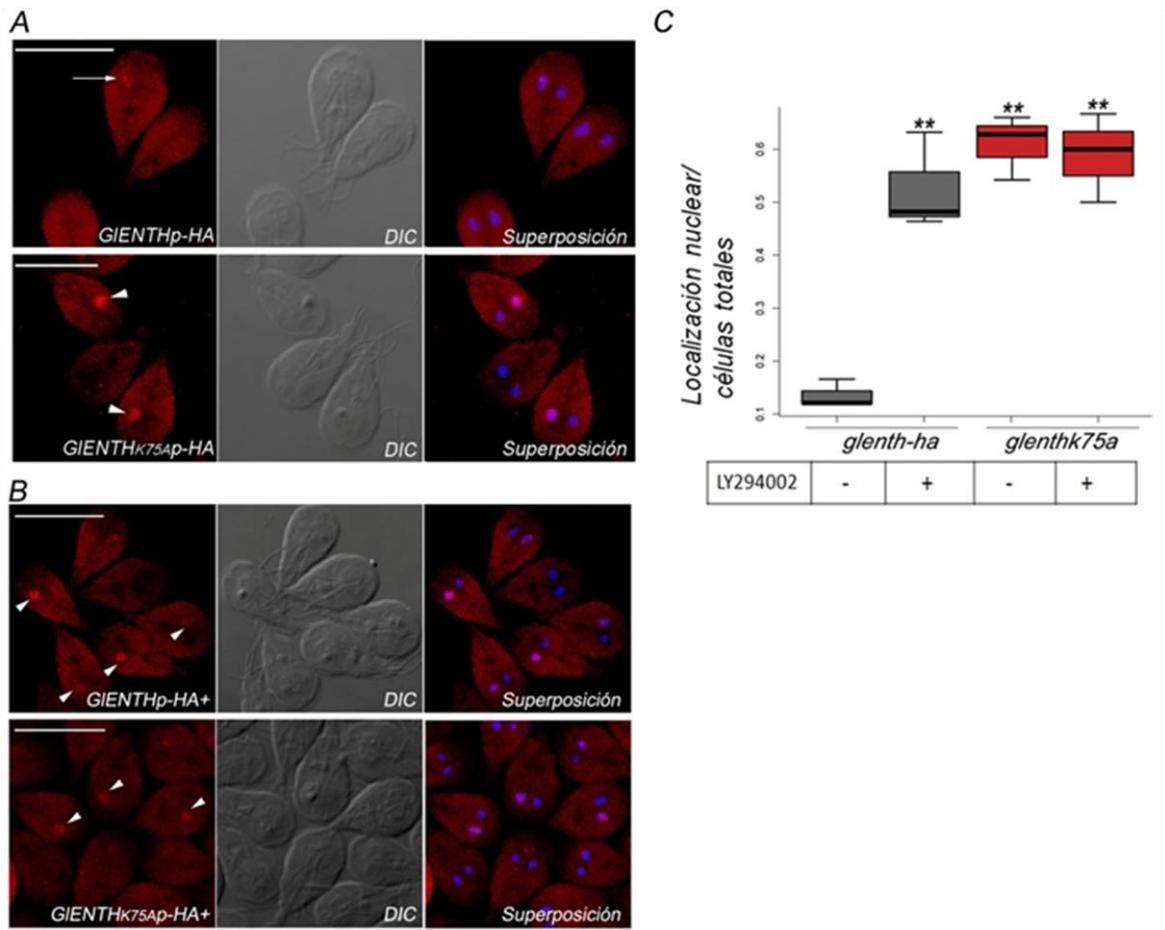


FIGURA 2.23: EL TRANSPORTE DE GIENTHP DESDE EL CITOPLASMA HACIA EL NÚCLEO Y A LA INVERSA, DEPENDE DE SU UNIÓN A PIS. (A) Ensayos de IF y microscopía confocal muestran que en parásitos transgénicos, GIENTHp-HA y GIENTH_{K75Ap}-HA localizan en el citoplasma y en el interior de uno de los núcleos (flecha y punta de flecha). Es notable la alta acumulación de GIENTH_{K75Ap}-HA en uno de los núcleos (punta de flecha). Los núcleos se tiñeron con DAPI. DIC: microscopía de contraste diferencial de interferencia. Barras: 10 μM. **(B)** A través de IF y microscopía confocal se observa que la localización nuclear de GIENTHp-HA es significativamente mayor cuando se le adicionó al medio de cultivo 30 μM de LY294002 durante 24 hs (GIENTHp-HA+). No se observan cambios significativos en la localización nuclear de GIENTH_{K75Ap}-HA en células tratadas con el inhibidor (GIENTH_{K75Ap}-HA+). Los núcleos se marcaron con DAPI. DIC: microscopía de contraste diferencial de interferencia. Barras: 10 μM **(C)** Los gráficos muestran la relación de células con localización nuclear de la proteína etiquetada con HA, referidas a las células totales, en las células *glenthp-ha* y *glenthk75a*, tratadas (+) y no tratadas (-). Al menos 1.000 trofozoítos se evaluaron, tres veces por condición. La acumulación de GIENTHp+, GIENTH_{K75Ap}-HA y GIENTH_{K75Ap}-HA+ en los núcleos es consistente y significativa (** p < 0,0001 mediante la prueba t de Student).

CONCLUSIONES PARCIALES

En este Capítulo se profundiza el rol de GIENThp en el transporte vesicular mediado por clatrina, encontrando que la proteína en estudio localiza principalmente en el citoplasma y núcleo, aunque se encuentra presente también en las PVs y sitios puntuales del RE.

De manera similar a los adaptadores de tipo epsina clásica, se evidenció que GIENThp está asociada con α AP-2, clatrina, Ub y que la proteína fue capaz de interactuar con PI3,4,5P₃, el cual se encuentra presente en la MP del parásito. También se observó que lleva a cabo un rol activo en la endocitosis de LDL mediada por receptor.

Por otro lado, se encontró una asociación directa con la subunidad gamma de AP-1 y con PI4P, presente en los sitios de direccionamiento en *Giardia*, sugiriendo que GIENThp podría también llevar a cabo un rol de epsinaR en el parásito, ya que está implicada en el transporte de la AcPh desde el RE hacia las PVs.

Se mostró que la alteración en la función de la proteína afectó gravemente el crecimiento de los trofozoítos, presentando además una acumulación inusual de material electrodensito en las PVs, lo que nos indicaría que GIENThp podría estar implicada en el mantenimiento de la homeostasis de estas vacuolas.

Además, cuando se inhibió la interacción de GIENThp con PIs, se obtuvo una acumulación de la proteína en estudio en uno de los núcleos, sugiriendo que la entrada y salida de GIENThp a esta organela depende de la capacidad de la proteína para asociarse a PIs y ser de esta manera retenida en la membrana del RE o en la MP.

Los resultados expuestos, apoyan un modelo en el que GIENThp formaría parte de la maquinaria molecular involucrada en la formación de vesículas cubiertas de clatrina participando indistintamente como un adaptador monomérico del tipo epsina y epsinaR.

CAPÍTULO 3:

ESTUDIO FUNCIONAL DE GLENTHP EN CÉLULAS DE LEVADURAS

CAPÍTULO 3: ESTUDIO FUNCIONAL DE GLENTHP EN CÉLULAS DE LEVADURAS

INTRODUCCIÓN

FUNCIÓN DE GLENTHP EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Los miembros que componen la familia ENTH son altamente conservados, aún entre organismos tan diferentes como humanos, *Xenopus*, *Drosophila*, *Arabidopsis*, levaduras y *T. brucei*. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al número de proteínas que son miembros de esta familia, que están presentes en las diferentes especies. Así, mientras que las levaduras *S. cerevisiae* y la mayoría de los vertebrados (incluyendo primates, roedores y pez cebra) contienen al menos dos parálogos de la familia de ENTH, sólo un miembro de esta familia está presente en organismos como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* y *Giardia lamblia* [182]. En el caso de *Giardia*, hemos descrito en el **CAPÍTULO 2** la presencia de una única proteína ENTH que desempeña un papel dual, actuando como epsina clásica en la endocitosis y como epsinaR en el tráfico desde el sitio de direccionamiento de proteínas en el RE hacia las PVs. Debido a que se ha encontrado que muchos componentes de la maquinaria de transporte vesicular son estructural y funcionalmente conservados entre los organismos eucariotas, es que resultó interesante utilizar el sistema de levaduras para indagar si esta doble función de GLENTHp como epsina/epsinaR puede ser conservada en hongos.

Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye el microorganismo eucariota más estudiado. Algunas de las ventajas que ofrece esta levadura como modelo biológico para la investigación son la facilidad de crecimiento y manejo en el laboratorio y el hecho de que *S. cerevisiae* posea un ciclo de vida que incluye una fase sexual, lo que permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética clásica. Todo esto, junto a que dicha levadura consta de un genoma pequeño (12 Mb), un poco mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero, hace que se simplifique el análisis genético y molecular del mismo, siendo además una ventaja el hecho de que la secuencia completa de su genoma haya estado disponible a partir del año 1996 [183].

CICLO BIOLÓGICO DE *S. CEREVISIAE*

El ciclo de vida de este organismo alterna entre dos fases, una haploide y otra diploide (**FIG. 3.1**). Las células haploides poseen dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, en el cual la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que

dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo [184].

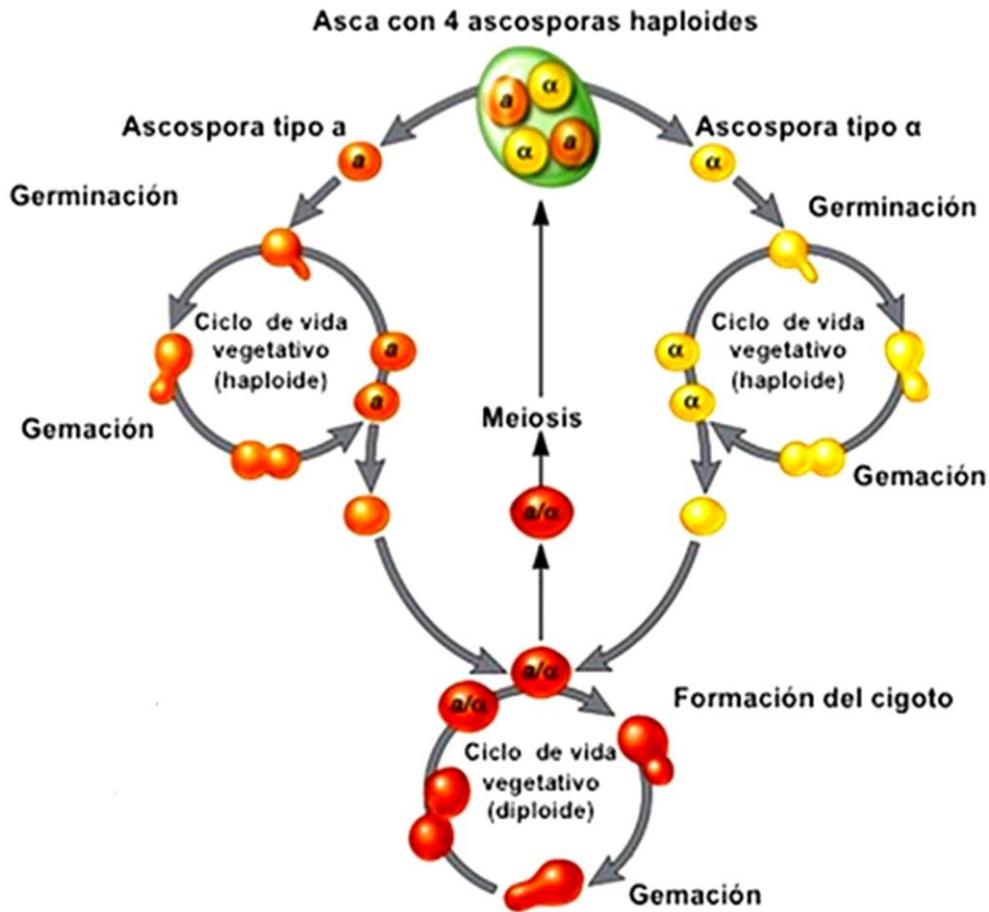


FIGURA 3.1: CICLO BIOLÓGICO DE *S. CEREVISIAE*. La levadura tiene un ciclo de vida muy sencillo que consta de una fase sexual y otra asexual. La fase asexual puede ser haploide o diploide, en donde una célula se divide por gemación. Por otra parte, *S. cerevisiae* posee dos tipos sexuales: a y α, cuando las células haploides de distinto sexo se conjugan, dan lugar a una célula diploide que puede dividirse mediante mitosis o meiosis. En ciertas condiciones las levaduras diploides esporulan realizando meiosis y formando cuatro ascosporas haploides.

Durante la fase vegetativa, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre. Posteriormente, ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células. Este ciclo puede ocurrir en cultivos de células diploides o haploides y, por tanto, se puede experimentar con cultivos estables haploides o diploides [185]. Desde el punto de vista genético, el ciclo de vida vegetativo permite el aislamiento de mutantes recesivas en un fondo haploide y el estudio de complementación de fenotipos en cepas diploides. Es decir, debido a que un organismo haploide solamente posee una

dosis de cromosomas, los efectos de dominancia-recesividad generalmente no interfieren en la expresión genética, siendo el fenotipo un reflejo directo del genotipo [185].

MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA ENTH/ANTH/VHS EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

En células de levadura, se han caracterizado las proteínas adaptadoras monoméricas Ent1 y Ent2, las cuales son proteínas esenciales y con funciones redundantes, que pertenecen a la familia ENTH [114, 147, 186]. Como se mencionó anteriormente, las características estructurales, como así también los roles en la endocitosis llevados a cabo por las proteínas del tipo epsina clásica se conservan en los diferentes organismos [142]. Es así que, al igual que los otros miembros de esta familia, Ent1 y Ent2 poseen el módulo globular conocido como dominio ENTH, a través del cual se unen a PI4,5P₂ en la MP. Además, hacia la región C-terminal contienen dos motivos de interacción con ubiquitina (UIM), dos secuencias tripeptídicas compuestas por asparagina-prolina-fenilalanina (NPF) para interactuar con dominios EH, motivos para unir clatrina (CBM), y también otras regiones con funciones desconocidas (FIG. 3.2)[147, 186, 187].

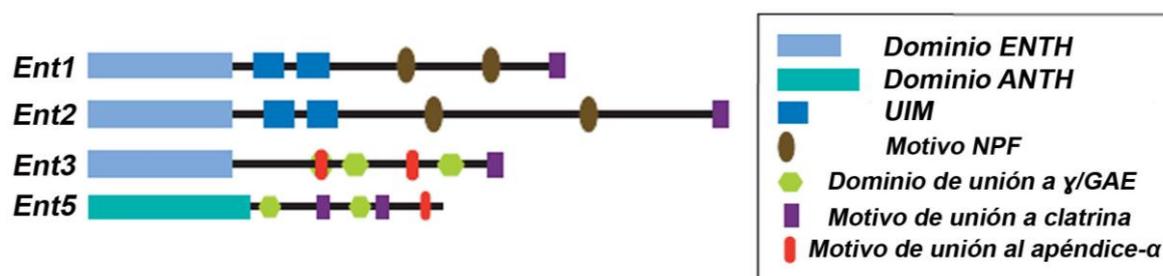


FIGURA 3.2: PROTEÍNAS E/ANTH Y SUS DOMINIOS EN LEVADURAS. Se representan esquemáticamente las proteínas del tipo epsina clásica (Ent1/2) y las ortólogas a epsinaR (Ent3/5). Todas comparten una organización modular similar, con un dominio ENTH o ANTH en la región N-terminal (en color celeste y turquesa respectivamente en el esquema), que media la unión a PIs, y una región C-terminal que contienen motivos peptídicos cortos y dominios que median las interacciones con otras proteínas. Adaptado de [2].

Por otro lado en este organismo también se han descrito proteínas ortólogas a epsinaR de mamífero, mediante ensayos de YTH utilizando como cebadores el dominio apéndice de la subunidad y de AP-1 de levadura y GGA2, se obtuvieron dos proteínas Ent3 y Ent5 que colocalizan con clatrina en la TGN y los endosomas [188]. Además, de la misma forma que epsinaR, la región N-terminal de Ent3 contiene el módulo conservado ENTH, aunque difieren en el bolsillo de unión a lípidos, lo que sugiere que epsinaR y Ent3 podrían unirse a PIs diferentes, a pesar de que ambos facilitan curvatura de la membrana de la TGN. En contraste con Ent3, Ent5 posee el dominio ANTH que media la unión a PIs, por lo tanto, es poco probable Ent5 promueva la curvatura de membrana y en su lugar podría funcionar más como AP180 que como epsina (FIG. 3.2). También,

ha sido reportado que tanto Ent3 como Ent5 son requeridas para el reclutamiento de clatrina *in vivo*, proporcionando datos que evidencian la superposición de funciones de las proteínas Ent3 y Ent5 en el ensamblaje de clatrina y el transporte mediado por CCVs en el sistema TGN/endosoma de levaduras [188].

RESULTADOS

GIENTHP SE EXPRESA EN *S. CEREVISIAE*

Debido a que el uso de codones de *G. lamblia* se asemeja más al de organismos procarionotas que al de otros eucariotas, es que en primer lugar se corroboró si GIENTHp se expresaba correctamente en *S. cerevisiae*.

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los otros organismos, la recombinación integrativa de un ADN transformante en la levadura se produce exclusivamente a través de recombinación homóloga. De esta manera, el ADN exógeno conteniendo al menos segmentos parciales homólogos a un gen específico, puede ser dirigido a voluntad a lugares determinados del genoma. Así, los genes normales de una cepa salvaje, incluso aquellos que no tienen mutaciones previamente conocidas, pueden ser convenientemente reemplazados por alelos deseados. Del mismo modo, se puede llevar a cabo este procedimiento entre un segmento de ADN exógeno y un vector de interés, si el segmento de ADN presenta regiones homólogas al plásmido específico. Esta última estrategia fue la que se utilizó para expresar GIENTHp en *S. cerevisiae*, tal como se describe en M&M (SECCIÓN 6.24). Así, cuando se analizó la expresión de la proteína de fusión GIENTHp-mCherry, mediante microscopía confocal utilizando un Acm anti-mCherry, se encontró que la proteína en estudio estaba presente en forma de parches en la MP (FIG. 3.3 A). Para confirmar la expresión de GIENTHp-mCherry, se realizaron ensayos de inmunotransferencia utilizando un Acm anti-mCherry y revelando con el método de ECL observándose que GIENTHp-mCherry se expresaba como una proteína de aproximadamente 80 kDa (GIENTHp ~50 kDa + mCherry ~30 kDa) (FIG. 3.3 B).

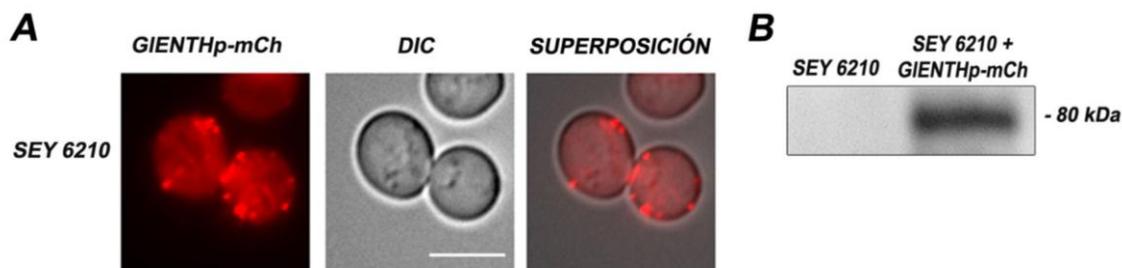


FIGURA 3.3: GIENThp SE EXPRESA EN *S. CEREVISIAE*. (A) GIENThp-mCherry localiza en forma de parches en la MP en células salvajes (*SEY6210*). Las células que sobre-expresan la proteína de fusión se crecieron en medio líquido y fueron visualizadas a través de microscopía confocal. También se muestra la microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC). Barra: 5µm (B) La inmunotransferencia muestra la expresión de GIENThp-mCherry como una proteína de aproximadamente 80 kDa en la cepa *SEY6210*.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE GIENThp COMO EPSINA CLÁSICA EN *S. CEREVISIAE*

GIENThp NO ES CAPAZ DE COMPLEMENTAR CÉLULAS ENT1ΔENT2Δ

Uno de los métodos más utilizados para caracterizar la función de un gen es la obtención de mutantes, siendo una técnica de gran utilidad en levaduras ya que permite que un gen de nuestro interés pueda ser interrumpido con una secuencia foránea. El procedimiento más empleado se basa en el uso de un fragmento lineal de ADN que contiene un marcador genético, por ejemplo *URA3*, flanqueado a ambos lados por secuencias del gen que deseamos interrumpir; estos extremos se recombinan con gran eficiencia y, debido a que en *S. cerevisiae* la frecuencia de recombinación homóloga es muy alta, el fragmento lineal de ADN se inserta en medio de nuestro gen resultando en la interrupción y, por lo tanto, en la anulación del mismo. Este procedimiento se ha utilizado exitosamente para generar todo tipo de mutantes, con la ventaja de que las mismas tienen exactamente el mismo fondo genético que la cepa progenitora y ha permitido el estudio de la función de una gran cantidad de genes en estos organismos. Sin embargo, cuando se trata de obtener mutantes interrumpidas en genes cuya anulación pudiera resultar letal, la interrupción génica debe hacerse en un diploide y por disección de tétradas recuperar las cuatro esporas. Si efectivamente la interrupción del gen en cuestión resulta letal, dos de las cuatro esporas del asca no serán viables.

El grupo de investigación la Dra. Beverly Wendland, en el departamento de Biología de la Universidad Johns Hopkins, ha generado la cepa doble mutante *ent1Δent2Δ* [186]. En estas células, se ha producido la eliminación de los genes *ENT1* y *ENT2*, resultando en cepas letales que pueden crecer sólo si se expresa al menos una de las proteínas Ent1/2 o sus motivos ENTH, ya que

se conoce que este dominio es necesario y suficiente para la viabilidad de las mutantes *ent1Δent2Δ* [187]. Debido a que previamente habían sido descritos genes homólogos a ENT1/2 en una variedad de organismos que incluyen desde humanos hasta parásitos [182], es que se decidió examinar si GIENTHp podía proporcionar las funciones llevadas a cabo por las proteínas Ent1/2. Para responder a este interrogante se realizaron ensayos de complementación fenotípica empleando las células *ent1Δent2Δ*, las cuales habían sido utilizadas anteriormente con éxito para la complementación con el homólogo de epsina de rata [187, 189].

Los ensayos de complementación son pruebas que se utilizan para determinar si tendrá lugar o no la complementación (compensación en forma de dominancia) en una célula con un fenotipo mutante dado, cuando otro genoma que codifica para el mismo fenotipo se introduce en dicha célula. Considerando que los hongos son organismos que pueden sintetizar los aminoácidos que necesitan para crecer, como por ejemplo el triptófano, es que la base de las pruebas de complementación consiste en generar mutantes en las cuales los genes de las enzimas requeridas para la síntesis de un determinado aminoácido ha sido eliminado del genoma y debe ser provisto por medio de un plásmido o a través del medio de cultivo. Para estos ensayos es necesario emplear vectores que contengan marcadores de selección tanto positiva como negativa, ya que para corroborar la transformación se selecciona positivamente (por ejemplo, si el vector posee el marcador *TRP1*, sólo van a crecer en placas conteniendo un medio auxótrofo para *TRP1* las células que estén transformadas) pero para testear la complementación se realiza una selección negativa (las dobles mutantes *ent1Δent2Δ* son letales, por lo que para mantenerlas vivas es necesario suplementarlas, por ejemplo, con un plásmido que codifica para Ent1). En los ensayos de complementación realizados, es necesario luego eliminar el plásmido que mantiene la viabilidad para evaluar si el segundo plásmido que contiene la proteína GIENTHp de *Giardia* era capaz de rescatar o no el fenotipo. Para ello, se utilizó el plásmido Ent1 que posee como marcador *TRP1* y que, en presencia del inhibidor específico 5-FAA (del inglés *5-fluoroanthranilic acid*), provoca la eliminación del plásmido que poseía este marcador.

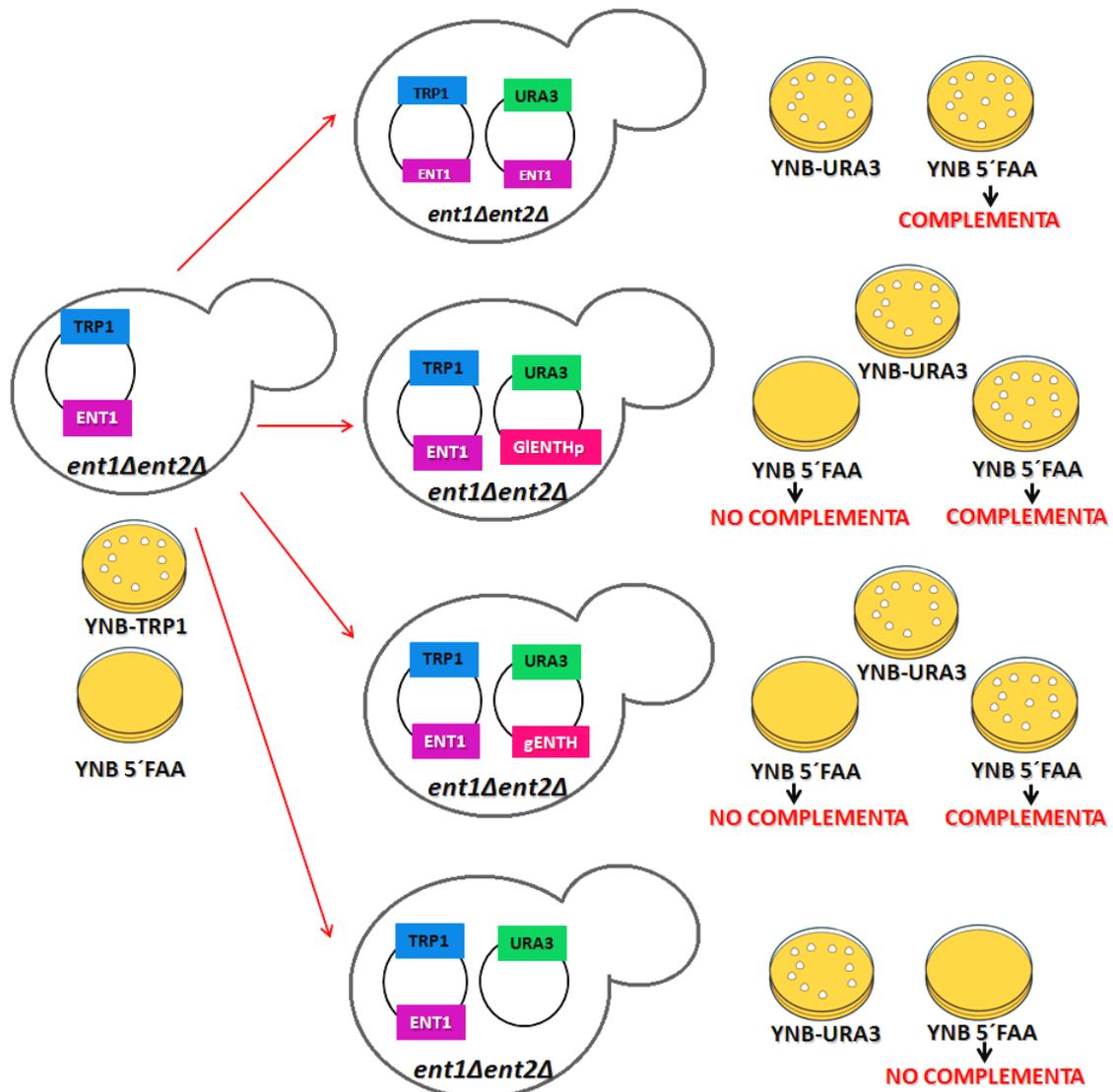


FIGURA 3.4: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL EXPERIMENTO DE COMPLEMENTACIÓN FENOTÍPICA EN CÉLULAS LETALES. Para analizar si la proteína completa *GIENTHp* o sólo su dominio *ENTH* (*gENTH*) eran capaces de rescatar la viabilidad celular, las dobles mutantes letales *ent1Δent2Δ* suplementadas con el vector *pENT1(TRP1)* fueron transformadas con los siguientes vectores: *i)* *pENT1(URA3)*, como control positivo; *ii)* *pGIENTHp-mCherry(URA3)* o *iii)* *pgENTH-mCherry(URA3)* *iv)* *pMET25.426* vacío.

En la **FIGURA 3.4** se esquematiza el experimento llevado a cabo, donde para analizar si la proteína completa *GIENTHp* o sólo su dominio *ENTH* (*gENTH*) eran capaces de rescatar la viabilidad celular, las dobles mutantes [*ent1Δent2Δ+pENT1(TRP1)*] se transformaron con los siguientes vectores: *i)* *pENT1(URA3)*, como control positivo, por lo que en este caso se espera que se complemente el fenotipo letal y las células crezcan en placas conteniendo el compuesto 5-FAA; *ii)* *pGIENTHp-mCherry(URA3)*, donde se prevé que las levaduras crezcan, si es que *GIENTHp*

es capaz de suplir las funciones llevadas a cabo por Ent1/2, mientras que si no lo hace, se pretende que las levaduras mueran ante la pérdida del plásmido **pENT1(TRP1)**; *iii*) **pgENTH-mCherry(URA3)**, que contiene sólo el dominio ENTH de *Giardia* el cual sería suficiente para rescatar la letalidad en el caso de que GIENTHp lleve a cabo un rol similar a Ent1/2 en hongos, pero si este no es el caso, no tendría lugar la compensación fenotípica y las células no vivirían y *iv*) **pMET25.426 vacío**, como control negativo, aquí se espera que no se complemente la letalidad y, por lo tanto, que las levaduras no crezcan. Así, los resultados mostraron que la sobre-expresión de GIENTHp o la de gENTH no fue capaz de rescatar el fenotipo letal, cuando las células pierden el vector **pENT1 (TRP1)** en las placas que contienen el compuesto tóxico 5-FAA (**Fig. 3.5 A**). Cuando se analizó la sobre-expresión de las proteínas mediante inmunotransferencia, se corroboró la correcta expresión de GIENTHp-mCherry y gENTH-mCherry en las células *ent1Δent2Δ* arrojando bandas de aproximadamente 80 y 30 kDa respectivamente (**Fig. 3.5 B**).

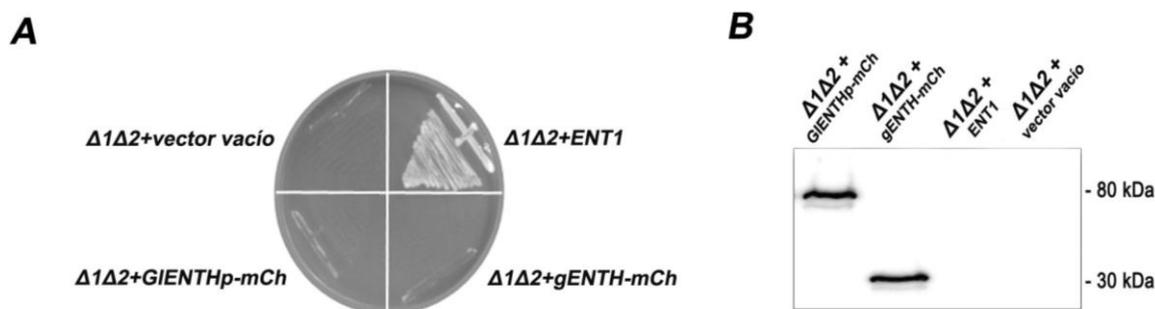


FIGURA 3.5: LA SOBRE-EXPRESIÓN DE GIENTHP NO COMPLEMENTA LAS CÉLULAS MUTANTES ENT1ΔENT2Δ.

(A) Las mutantes *ent1Δent2Δ* con el vector **pENT1(TRP1)** y un segundo plásmido *URA3*: vacío, o codificando la proteína completa GIENTHp, gENTH o ENT1, se crecieron en placas de cultivo conteniendo 5-FAA para eliminar el vector **pENT1(TRP1)** a 30°C durante 3 días. (B) Ensayos de inmunotransferencia muestran que GIENTHp-mCherry se expresa como una proteína de aproximadamente 80 kDa en células *ent1Δent2Δ*, mientras que gENTH-mCherry se expresa como una cercana a los 33 kDa cuando se utiliza un Acn anti-mCherry y se revela con ECL

LAS MUTANTES GLENTH_{N107Y}P Y GENTH_{N107Y} NO LOGRARON RESCATAR CÉLULAS ENT1ΔENT2Δ

Cuando el dominio ENTH de Ent1/2 fue comparado con los motivos homólogos de las proteínas epsina de *Drosophila melanogaster* y *Xenopus laevis*, las cuales se conocía que complementaban la letalidad en las células *ent1Δent2Δ* [169]. se encontraron tres residuos (Y100, T104 y E137) que estaban conservados exclusivamente en los dominios ENTH de epsina y que no se encontraban presentes en los demás motivos ENTH y ANTH no esenciales (descritos en *ent3/4/5*, *Yap1801/2* y *Sla2*). Luego, a través de diversos análisis mutagénicos se mostró que si sustituían cada uno de estos residuos, solamente las mutantes ENTH1^{Y100R} y ENTH1^{T104D} no eran

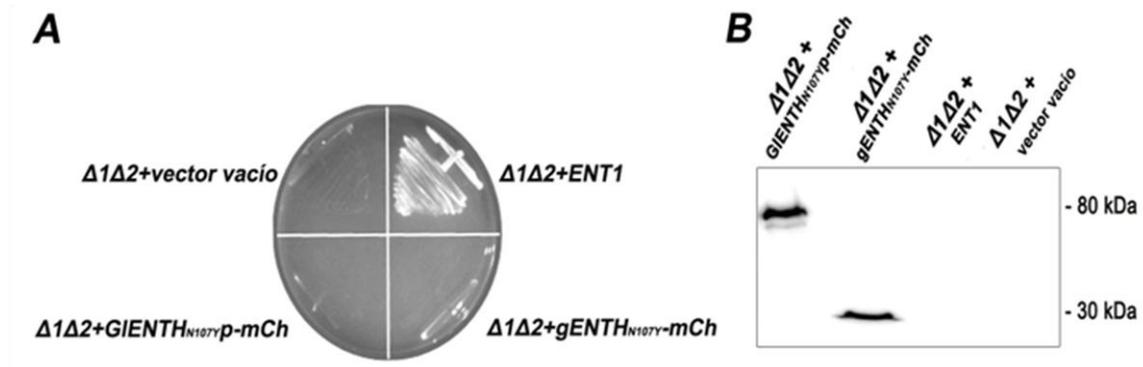


FIGURA 3.7: GIENTHN_{107YP} NO COMPLEMENTA LAS CÉLULAS ENT1ΔENT2Δ. (A) Células *ent1Δent2Δ* con un plásmido *pENT1(TRP1)* y un segundo vector *URA3*, vacío, o codificando la proteína completa GIENTHN_{107YP}, gENTHN_{107Y} o ENT1, se crecieron en placas de cultivo conteniendo 5-FAA para evitar el *pENT1(TRP1)* a 30°C durante 3 días. (B) Por inmunotransferencia utilizando un Acm-anti mCherry y revelando con ECL, se corroboró la correcta expresión de las proteínas de fusión GIENTHN_{107YP}-mCherry y gENTHN_{107Y}-mCherry en las dobles mutantes.

Los resultados expuestos hasta el momento indican que GIENTHp no llevaría a cabo las funciones de epsina clásica en hongos, ya que fue incapaz de complementar la viabilidad en *ent1Δent2Δ*.

GIENTHP NO INTERFIERE CON LA FUNCIÓN NORMAL DE ENT1/2

Los resultados obtenidos indican que GIENTHp fue incapaz de reemplazar la función de Ent1/2 en *S. cerevisiae*. Sin embargo, el alto grado de divergencia en la secuencia de aminoácidos de los dominios ENTH entre Ent1/2 y GIENTHp, apuntaba a que GIENTHp podría actuar como una proteína cuya función domine sobre las de Ent1/2 y, como consecuencia, anule su rol salvaje. Así, para evaluar si la proteína de interés podía llevar a cabo su rol como una proteína dominante negativa de Ent1/2, se realizaron ensayos funcionales clásicos en levaduras, estudiando la localización del receptor Ste3 y la polimerización de Abp1 (del inglés *Actin binding protein 1*) en células salvajes que sobre-expresan GIENTHp.

-LOCALIZACIÓN DE STE3 EN CÉLULAS SALVAJES

La proteína transmembrana Ste3 es el receptor de la feromona de apareamiento, el factor α , por lo que es expresado en células Mat α y constitutivamente internalizado a la vacuola y, en ausencia de su ligando, es degradado (Fig 3.8) [190].

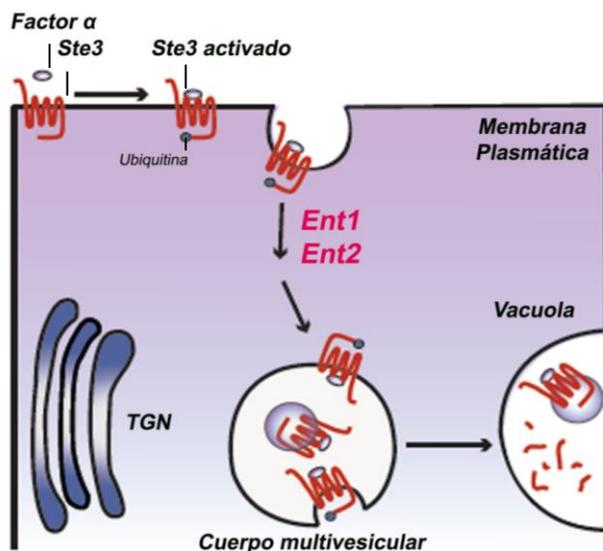


FIGURA 3.8: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL TRANSPORTE VESICULAR ENTRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA VACUOLA. El receptor Ste3 es activado en presencia del factor α y dirigido hacia el lumen del cuerpo multivesicular (MVB) de manera dependiente de las proteínas Ent1 y Ent2. La fusión del MVB con la vacuola resulta en el direccionamiento de las vesículas lumenales hacia el interior del compartimento de destino: la vacuola. Adaptado de [1].

Para analizar si la sobre-expresión de GIENTHp interfería en la función normal de Ent1/2 en células salvajes, se analizó el transporte de Ste3-GFP, mediante microscopía de fluorescencia en células vivas. Para ello, la cepa Ste3-GFP se transformó con los siguientes vectores: *i)* **pMET25.426** vacío, el cual se utilizó como control y donde esperaríamos observar que Ste3-GFP sea correctamente transportada al lumen de la vacuola y *ii)* **pGIENTHp-mCherry**, en este caso se espera por un lado que, si GIENTHp no interfiere con la función normal de las proteínas Ent1/2, entonces, la localización de Ste3 debería ser comparable con la del control, en la que el receptor es dirigido hacia el interior de la vacuola. Por el contrario, si GIENTHp altera la función salvaje de las proteínas del tipo epsina en levadura, se evidenciarían cambios en el itinerario del receptor indicando un defecto en la endocitosis. De esta manera, en primer lugar se chequeó la correcta expresión de GIENTHp a través de inmunotransferencia (**FIG. 3.9 A**) y, a continuación, se llevaron a cabo ensayos de microscopía de fluorescencia en células vivas. Los resultados revelaron que la sobre-expresión de GIENTHp no interfirió con el transporte de Ste3-GFP, ya que el receptor fue correctamente endocitado hacia el lumen de la vacuola, de manera semejante a lo observado en las células que presentan el vector vacío (**FIG. 3.9 B**).

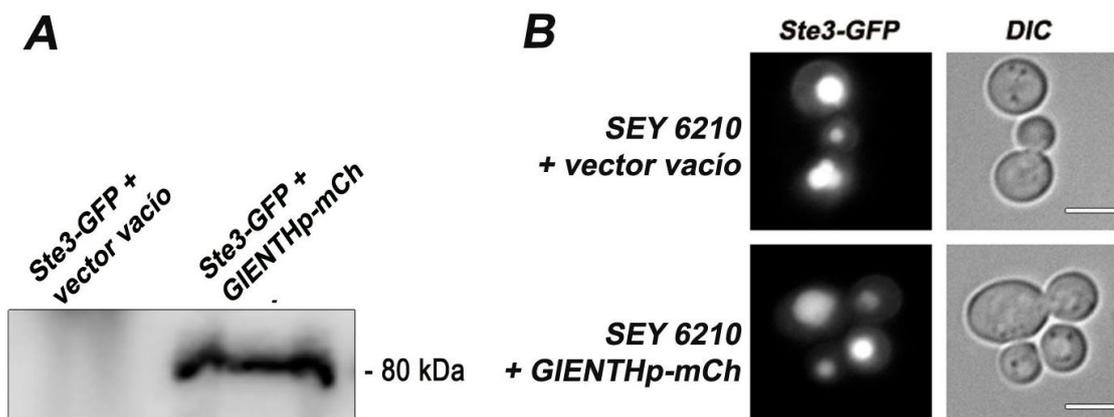


FIGURA 3.9: GIENTHp NO INTERFIERE EN EL TRANSPORTE DE STE3-GFP EN *S. CEREVISIAE*. (A) La expresión de GIENTHp-mCherry en la cepa Ste3-GFP se corroboró por inmunotransferencia observando una banda de aproximadamente 80 kDa. (B). Células que sobre-expresan GIENTHp no muestran defectos en la endocitosis de Ste3. La cepa Ste3-GFP fue transformada con un vector pMET25.426 vacío o con pGIENTHp-mCherry, se crecieron hasta fase logarítmica temprana en placas con medio rico de crecimiento a 30°C y se visualizaron a través de microscopía confocal. Barras: 5μm.

-POLIMERIZACIÓN DE ABP1 EN CÉLULAS SALVAJES

Un fenotipo común observado entre las mutantes de endocitosis es un defecto en la estructura o la polaridad del citoesqueleto de actina [191]. Los filamentos de actina en células de levaduras están presentes tanto como cables de actina como parches corticales. Los parches están localizados en la MP y son estructuras móviles, ya que la localización de estos varía a medida que células avanzan a través del ciclo celular [191]. Abp1 es una proteína de unión a actina y se encuentra exclusivamente en parches de actina en levaduras en estado vegetativo por lo que la versión fluorescente Abp1-GFP se utiliza comúnmente como un marcador de los movimientos de estos parches [192-194]. Debido a que en la ausencia de la función normal de Ent1/2, ya sea en *ent1Δent2Δ* [186] o en las mutantes cuádruples (*ent1Δent2Δyap1801Δyap1802Δ*) que carecen de los cuatro adaptadores Ent1/2 y Yap180 1/2 (homólogos de epsina y proteínas AP180/CALM) (Wendland, B. resultados no publicados), se observa un defecto en la estructura y la relocalización de los parches de actina cortical, se decidió analizar el citoesqueleto de actina por microscopía de fluorescencia en células salvajes vivas, cuando se sobre-expresa GIENTHp. Para ello, la cepa Abp1-GFP se transformó con los siguientes vectores: *i)* pMET25.426 vacío, el cual se utilizó como control y se espera observar parches de actina cortical normales y *ii)* pGIENTHp-mCherry, con el cual si GIENTHp interfiere en el rol llevado a cabo por Ent1/2, se evidenciarían cambios en la localización de Abp1-GFP indicando un defecto en el movimiento de los parches de actina, mientras que si la función de GIENTHp no domina sobre la de las proteínas Ent1/2, se esperaría encontrar entonces una localización normal de Abp1-GFP en

los parches de actina ubicados en la MP. Así, el primer paso consintió en corroborar la expresión de GIENTHp a través de inmunotransferencia en la cepa Apb1-GFP, empleando un Acm anti-mCherry y revelando con ECL (FIG. 3.10), obteniéndose, tal como se esperaba, una banda de aproximadamente 80 kDa. Luego, mediante el análisis de las imágenes de fluorescencia en células vivas, se observaron parches de actina corticales puntiformes normales, sin defecto en la localización Abp1-GFP, en presencia de GIENTHp (FIG. 3.11). Como se esperaba, las células *ent1Δent2Δyap1801Δyap1802Δ* mostraron una distribución defectuosa de actina, la cual se evidenció en forma de “cola de cometa” asociado con la corteza celular, corroborando los resultados observados anteriormente por el grupo de investigación de la Dra Wendland. (Wendland, B. resultados no publicados) (FIG. 3.11).

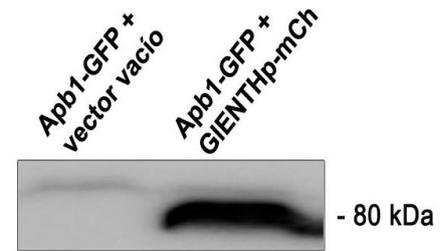


FIGURA 3.10: EXPRESIÓN DE GIENTHP Mediante inmunotransferencia se corroboró la expresión de GIENTHp-mCherry en la cepa Apb1-GFP, obteniendo una banda de aproximadamente 80 kDa al revelar con ECL.

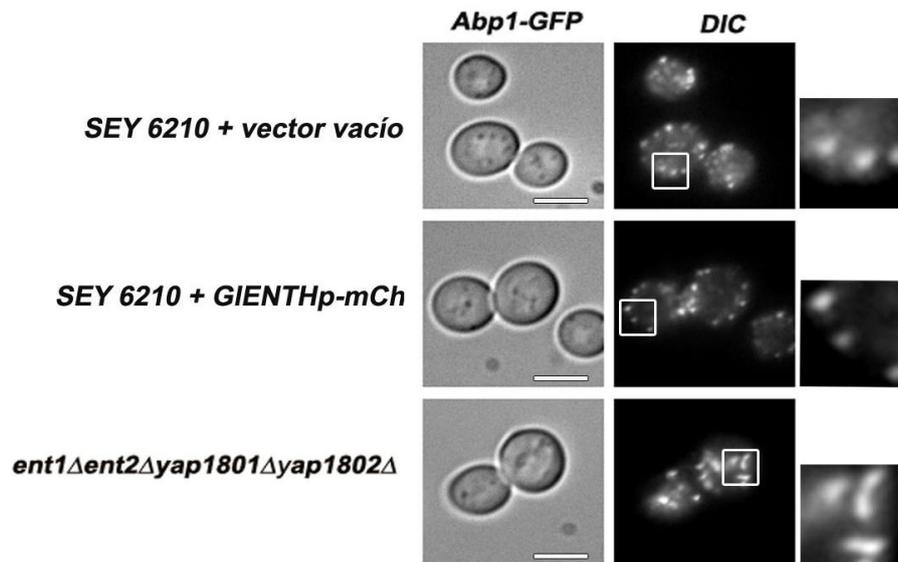


FIGURA 3.11: GIENTHP NO INTERFIERE EN EL TRANSPORTE DE ABP1-GFP EN *S. CEREVISIAE*. La cepa Abp1-GFP fue transformada con un vector pMET25.426 vacío o con pGIENTHp-mCherry, [(*ent1Δent2Δyap1801Δyap1802Δ*+ENTH1.414)+ABP1-GFP] fue utilizada como control. Las células se crecieron hasta fase logarítmica temprana en placas con medio rico de crecimiento a 30°C y se visualizaron a través de microscopía confocal. Barras: 5 μm. En los recuadros, a la derecha, se magnifica una región de la célula para apreciar en más detalle la distribución de Abp1-GFP.

Estos resultados indicaron que GLENTHP no era capaz de actuar como una proteína dominante negativa de Ent1/2.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE GLENTHP COMO EPSINAR EN *S. CEREVISIAE*

LA EXPRESIÓN DE GLENTHP NO RESTABLECE LA LOCALIZACIÓN DE GFP-CPS1 EN EL LUMEN VACUOLAR DE CÉLULAS ENT3ΔENT5Δ

En las mutantes dobles *ent3Δent5Δ* los genes ENT3 y ENT5 han sido deletados, resultando en células que, si bien no son letales, presentan defectos en el tráfico intracelular mediado por clatrina [188]. Un ejemplo de este defecto en el transporte es lo que ocurre con la carboxipeptidasa S (Cps1), que es transportada como un precursor desde la TGN a la vacuola donde luego se procesa a una forma activa más pequeña (FIG. 3.12) [195].

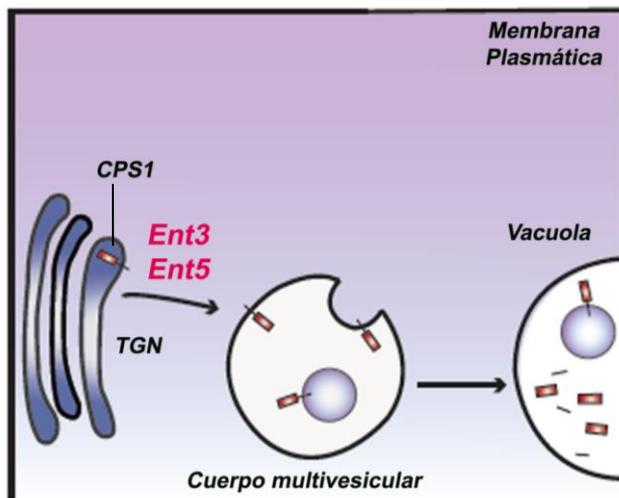


FIGURA 3.12: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL TRANSPORTE VESICULAR ENTRE TGN Y LA VACUOLA. La Carboxipeptidasa S (CPS1) es transportada desde la TGN hacia el lumen del cuerpo multivesicular (MVB), de manera dependiente de las proteínas Ent3 y Ent5. La fusión del MVB con la vacuola resulta en el direccionamiento de las vesículas lumenales hacia el ambiente hidrolítico del lumen del compartimento de destino. Una vez en la vacuola CPS es procesada a la forma activa de menor tamaño. Adaptado de [1].

GFP-Cps1 localiza de una manera bien definida dentro de la vacuola en las células salvajes, mientras que en las mutantes *ent3Δent5Δ* GFP-Cps1 está presente en la membrana vacuolar de manera fragmentada y no en el lumen de la organela [138, 195-197]. Para evaluar si GLENTHP podía rescatar estas deficiencias en el transporte de GFP-Cps1 en las células *ent3Δent5Δ*, estas mutantes dobles fueron co-transformadas con las siguientes combinaciones de vectores: i) pGFP-Cps1 (*URA3*) y pMET25.423 vacío, el cual se utilizó como control negativo y con el cual no deberíamos observar cambios en el defecto del transporte de Cps1 producido por la eliminación de Ent3/5 ii) pGFP-Cps1(*URA3*) y pGLENTHP-mCherry(*HIS3*), donde se espera observar por un lado que Cps1 sea correctamente transportada hacia el lumen de la vacuola, si es que GLENTHP es

capaz de suplir el defecto de transporte en las dobles mutantes, mientras que, si GIENTHp no lleva a cabo un rol semejante al de Ent3/5 en *S. cerevisiae*, la proteína no podría complementar la falla en el tráfico intracelular de Cps1 en *ent3Δent5Δ* y *iii*) pGFP-Cps1(*URA3*) y pENT5(*HIS3*), este caso corresponde al control positivo y aquí se espera que ENT5 rescate el defecto en el transporte de Cps1 en la dobles mutantes y se observe a la proteína fluorescente en el interior de la vacuola. Luego de visualizar al microscopio confocal las células vivas co-transformadas se encontró que la sobre-expresión de GIENTHp no restablece la localización de GFP-Cps1 en el lumen vacuolar en las dobles mutantes, de manera opuesta a lo que se observó en el control que expresa Ent5 (FIG. 3.13 A). La expresión de GIENTHp en las células *ent3Δent5Δ* fue analizada por inmunotransferencia utilizando un Acm anti-mCherry y revelando con ECL (FIG. 3.13 B) observándose una banda de aproximadamente 80 kDa, que se corresponde con el peso molecular de la proteína de fusión GIENTHp-mCherry.

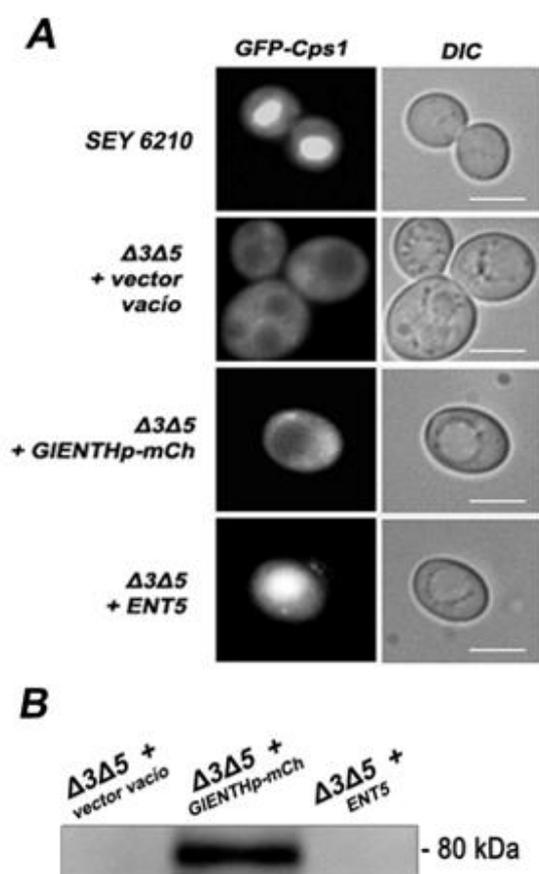


FIGURA 3.13: LA SOBRE-EXPRESIÓN DE GIENTHP NO RESTABLECE EL DEFECTO EN EL TRANSPORTE DE Cps1 EN CÉLULAS ENT3ΔENT5Δ. (A) Las células *ent3Δent5Δ* se co-transformaron con un vector pGFP-Cps1 y con el vector vacío pMET25.426, el vector pGIENTHp-mCherry o pENT5. Las células vivas se observaron por microscopia de fluorescencia. Se utilizaron como control, las células salvajes (*SEY 6210*) transformadas con pGFP-Cps1. Barras: 5 μ m. (B) La expresión de GIENTHp en las dobles mutantes se corroboró por inmunotransferencia utilizando un Acm anti-mCh observando una banda de 80 kDa en la cepa *ent3Δent5Δ*+ pGIENTHp-mCh.

GIENTHP NO PARTICIPÓ EN LA MADURACIÓN FACTOR- α EN CÉLULAS ENT3ΔENT5Δ

Otro de los defectos ya descritos en las células *ent3Δent5Δ*, radica en la alteración de la maduración del factor- α [198]. El proceso de maduración del factor- α se inicia por la acción de la

proteasa Kex2p presente en la TGN, estando la localización de esta proteasa relacionada con el tráfico dependiente de clatrina entre la TGN y los endosomas, donde intervienen las proteínas Ent3 y Ent5. Así, fallas en la localización Kex2p en la TGN provocan una reducción en la maduración del factor- α . El ensayo del "halo" proporciona una medida indirecta para evaluar si se completó la maduración del factor- α , el cual es secretado deteniendo el ciclo celular y el crecimiento de las células de levadura MATa en preparación para el apareamiento (FIG. 3.14) [199].

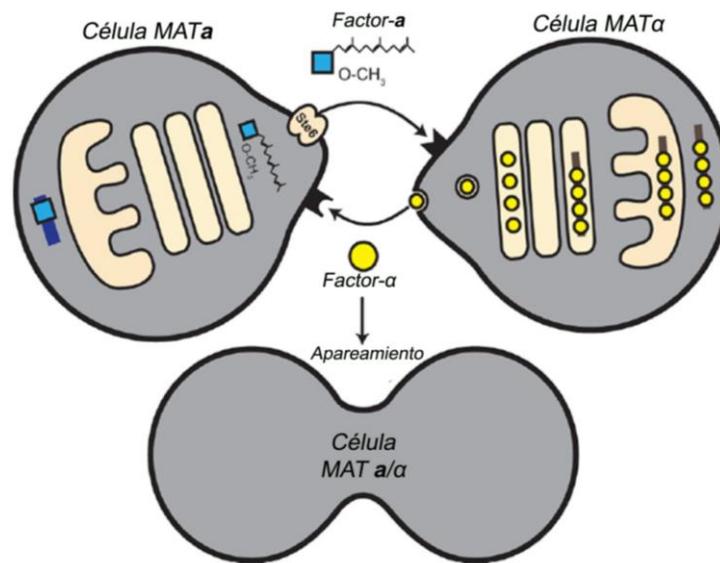


FIGURA 3.14: DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA BIOGÉNESIS Y SECRECIÓN DEL FACTOR-a Y FACTOR- α . Células MATa (izquierda) secretan el factor-a, un péptido que se sintetiza como un precursor y luego sufre una serie de pasos, previo a la exportación, incluyendo diferentes modificaciones y varios clivajes proteolíticos para producir el factor-a maduro. Estos pasos se producen en el citosol o en la cara citosólica de las membranas intracelulares. La exportación del factor-a se lleva a cabo a través de un mecanismo secretor "no clásico", mediada por el transportador ABC, Ste6. Paralelamente, las células MATa (derecha) secretan el factor- α , que se sintetiza como un precursor que contiene varias copias en tándem de factor- α . El precursor de esta feromona atraviesa la vía secretora clásica y sufre glicosilación en RE (línea de círculos en amarillo), seguido por el procesamiento proteolítico en el aparato de Golgi (círculos en amarillo) para producir el factor- α maduro que se transporta en vesículas hacia la membrana plasmática y es secretado. Durante la respuesta de la levadura haploide a las feromonas de apareamiento, las células sufren alteraciones morfológicas, llegando a ser polarizada una hacia la otra y exhibiendo proyecciones (protuberancias) distintas, como se muestra. La maquinaria de apareamiento se localiza en la punta de estas células polarizadas y, durante el apareamiento, las células se fusionan a estos extremos para formar las células diploides MATa/MATa. Adaptado de [3].

Un paso temprano en la vía de la respuesta de apareamiento es la detención del ciclo celular en G1, seguido por la recuperación del mismo. En respuesta al factor- α secretado por las

células que se encuentran depositadas sobre el césped de células *MATa* supersensibles, estas últimas permanecen permanentemente arrestadas en G1 y no crecen [200, 201]. Así, la zona de inhibición del crecimiento en el césped, que rodea a la colonia de células que fue depositada sobre éste y en las cuales se evalúa la secreción de péptido maduro, se conoce como "halo" del factor- α y el ancho de la aureola refleja aproximadamente la cantidad de ese péptido activo que es secretado. Ha sido mostrado que el bioensayo del "halo" es extremadamente sensible, de manera que incluso las cepas productoras de factor- α a niveles del 1 a 5% respecto al tipo salvaje muestran un "halo" significativo en esta prueba [202]. Este ensayo se lleva a cabo utilizando medio de crecimiento sólido, porque se conoce que el fenómeno de la lisis celular se produce solamente en placas de Petri, ya que durante el crecimiento en medio líquido no es posible detectar la secreción del péptido maduro extracelular [203].

Debido a que ha sido informado que la maduración de feromonas se reduce considerablemente en las células *ent3 Δ ent5 Δ* , en comparación con las mutantes simples o las células salvajes [138], es que se decidió evaluar si la sobre-expresión de GIENTHp restaura la maduración del factor- α en las cepas dobles mutantes actuando como Ent3/5 en estas células. Así, se depositaron en forma de gota, sobre una placa conteniendo un césped de la cepa *MATa* supersensible, las células salvajes *SEY6210 MAT α* , (donde se pretende que se forme el "halo" debido a que se produce normalmente la maduración péptido) y la cepa *Δ ent3 Δ ent5* transformada con los vectores **pGIENTHp-mCherry**, **pMET25.426 vacío** y **pENT5**, las cuales se utilizaron en el experimento anterior donde se evaluó la localización de Cps1. Se esperaba que las células *Δ ent3 Δ ent5* + **pGIENTHp-mCherry** produjeran un "halo" si es que GIENTHp es capaz de llevar a cabo el rol de Ent3/5 en *S. cerevisiae*, restaurando el defecto en la secreción del factor- α maduro en la cepa doble mutante. De no ser así, se esperaba que no se forme el "halo" ya que no se produce el arresto en G1 de las células supersensibles. Para el caso de las células *Δ ent3 Δ ent5* + **pMET25.426 vacío**, que se utilizó como control negativo, no se espera la formación del "halo" debido a que esta cepa mutante posee defectos en la maduración de la feromona. Por último, para las células *Δ ent3 Δ ent5* + **pENT5**, que corresponde al control positivo, se confiaba que ENT5 restaure el defecto de secreción del factor- α en las células *ent3 Δ ent5 Δ* y, consecuentemente, se observe el "halo". Los resultados mostraron un defecto en la secreción del factor- α maduro en las células *ent3 Δ ent5 Δ* que sobre-expresaban GIENTHp-mCherry o en las dobles mutante que sólo contenían el vector **pMET25.426 vacío**, según lo medido por la zona más pequeña de la inhibición del crecimiento de la cepa *MATa* supersensible, que se hizo visible por la formación de un "halo" muy pequeño. Como se esperaba, la mutante *ent3 Δ ent5 Δ* conteniendo el vector **pENT5** y las células *SEY6210 MAT α* mostraron un "halo" de mayor tamaño (Fig. 3.15). Estos resultados

indicaron que GLENTHP no tuvo la habilidad de restaurar la maduración de la feromona, tal como ocurre en las células mutantes simples o salvajes.

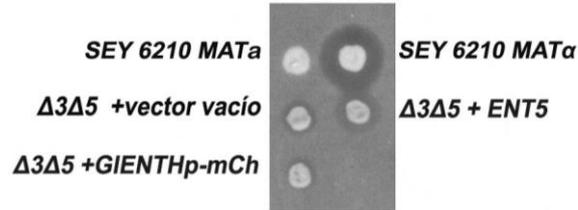


FIGURA 3.15: LA EXPRESIÓN DE GLENTHP NO SUPLE EL DEFECTO EN LA MADURACIÓN DEL FACTOR α EN CÉLULAS $ENT3\Delta ENT5\Delta$. Unidades equivalentes DO_{600} de células salvajes MAT α , salvajes MAT α , como control negativo, y la cepa $ent3\Delta ent5\Delta$ con el vector pMET25.426 vacío o con los vectores pGLENTHP-mCherry o pENT5, se depositaron sobre una placa conteniendo un césped células MAT α supersensibles. El diámetro del “halo” muestra una disminución en la inhibición del crecimiento en la cepa subyacente para $ent3\Delta ent5\Delta$ +GLENTHP-mCherry, visualizado por el “halo” de menor tamaño, en comparación con $ent3\Delta ent5\Delta$ +ENT5 y SEY6 210 MAT α .

Los resultados mencionados en esta sección sugieren que GLENTHP no desempeña el rol de epsinaR en *S. cerevisiae*, ya que no fue capaz de complementar los defectos en el transporte de $ent3\Delta ent5\Delta$.

GLENTHP PARTICIPA COMO UN ADAPTADOR ENT3/5 DOMINANTE NEGATIVO EN *S. CEREVISIAE*

Para evaluar si GLENTHP podía actuar cómo una proteína dominante negativa de las Ent3/5, se analizó la localización de CPS1 y la maduración del factor- α , pero en esta oportunidad utilizando células salvajes que sobre-expresan GLENTHP. Antes de llevar a cabo estos experimentos, se chequeó por inmunotransferencia la expresión de la proteína, observándose una banda de aproximadamente 80 kDa que se corresponde con el peso molecular de la proteína de fusión GLENTHP-mCherry (FIG. 3.16).



FIGURA 3.16: LA EXPRESIÓN DE GLENTHP EN CÉLULAS SALVAJES SEY 6210 MAT α . Se muestra la expresión de GLENTHP en las células salvajes mediante inmunotransferencia utilizando un Acn anti-mCherry y revelando con el método de ECL.

-LA EXPRESIÓN DE GLENTHP AFECTÓ EL TRANSPORTE INTRACELULAR DE GFP-CPS1 EN CÉLULAS SALVAJES

Para evaluar el itinerario de Cps1, las células salvajes se co-transformaron con las siguientes combinaciones de vectores: *i*) pGFP-Cps1 (*URA3*) y pMET25.423 vacío, el cual se utilizó como control negativo esperando que Cps1 sea normalmente transportada hacia el interior de la vacuola, *ii*) pGFP-Cps1(*URA3*) y pGLENTHP-mCherry(*HIS3*), en esta situación era posible que Cps1 sea correctamente dirigida al lumen de la vacuola si la función de GLENTHP no interfiere con el rol normal de las proteínas Ent3/5 en *S. cerevisiae*, mientras que, en el caso contrario, se observarían cambios en el itinerario de Cps1. Así, mediante la realización de ensayos de microscopía de fluorescencia en células vivas, se encontró que la sobre-expresión de GLENTHP en la cepa salvaje altera la función de las proteínas del tipo epsinaR en levaduras, evidenciándose por los cambios en la trayectoria de GFP-Cps1, ya que la misma no se observa en el lumen de la vacuola, sino que presenta un patrón de localización similar al mostrado anteriormente en las células *ent3Δent5*. Por el contrario, este defecto en el transporte intracelular no fue observado en presencia del vector vacío, donde Cps1 está presente en el interior de la vacuola (FIG. 3.17).

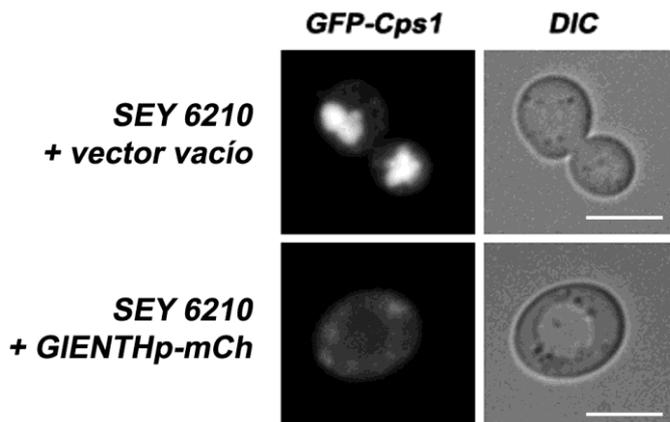


FIGURA 3.17: GLENTHP INTERFIERE CON EL TRANSPORTE DE CPS1 EN CÉLULAS SALVAJES DE *S. CEREVISIAE*. La sobre-expresión de GLENTHP produjo defectos en el transporte intracelular de Cps1, ya que no se observa a la proteína en el lumen de la vacuola en células salvajes (SEY 6210). Las células fueron co-transformadas con los vectores pGFP-Cps1 y pMET25.423 vacío o pGLENTHP-mCherry. Las células vivas se observaron por microscopía de fluorescencia. Barras: 5 μ m.

-LA EXPRESIÓN DE GLENTHP INTERFIRIÓ EN LA MADURACIÓN DEL FACTOR- α EN CÉLULAS SALVAJES

Para confirmar el comportamiento de GLENTHP como proteína Ent3/5 dominante negativa, se evaluó la maduración y secreción de la feromona de apareamiento, como se ha descrito más arriba, excepto que en este ensayo las células que se transformaron fueron las salvajes (SEY6210 *MAT α*). Se utilizaron los siguientes vectores: *i*) pMET25.426 vacío, el cual se empleó como control negativo y se presumía obtener un “halo” de tamaño normal, debido a la ausencia de defectos en la maduración del péptido y *ii*) pGLENTHP-mCherry, en este caso se esperaba tener un “halo”

similar al salvaje si es que GIENThp no afecta la función normal de Ent3/5, mientras que, de hacerlo, esperaríamos que no se forme un “halo” ya que se produciría un defecto en la maduración del factor- α y por lo tanto la cepa *MAT α* supersensible detendría su crecimiento. Así, el bioensayo del “halo” para la actividad del factor- α , reveló que la sobre-expresión de GIENThp en *SEY 6210 MAT α* disminuye considerablemente el nivel de secreción del péptido maduro, medido por la zona más pequeña de inhibición del crecimiento que se observó con la formación de un “halo” de menor tamaño, en relación con el obtenido alrededor de *MAT α* con el vector pMET25.426 vacío, donde se evidenció un “halo” de mayor tamaño (Fig. 3.18).

Estas observaciones sugieren que GIENThp impide que se lleve a cabo la correcta función de Ent3/5, actuando de esta manera como una proteína Ent3/5 dominante negativa en células de *S. cerevisiae*.

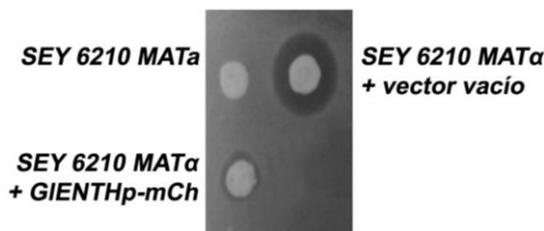


FIGURA 3.18: GIENThp ALTERA LA MADURACIÓN DE LA FEROMONA DE APAREAMIENTO EN CÉLULAS SALVAJES DE *S. CEREVISIAE*. Unidades equivalentes DO₆₀₀ de células salvajes *MAT α* con el vector pMET25.426 vacío o con pGIENThp-mCherry y células salvajes *MAT α* (control negativo) se depositaron sobre una placa conteniendo un césped células *MAT α* supersensibles. El tamaño del “halo” observado indica una disminución en la inhibición del crecimiento en la cepa subyacente para células salvajes que sobre-expresan GIENThp-mCherry, visualizado por el “halo” de menor tamaño en comparación con el “halo” de mayor tamaño obtenido para células salvajes *MAT α* con el vector vacío.

CONCLUSIONES PARCIALES

En este Capítulo se describió el análisis funcional de GIENThp, utilizando como modelo células de levadura. Se expresó la proteína miembro de la familia de ENTH de *G. lamblia* en *S. cerevisiae*, encontrando que ésta localiza en la MP en forma de parches. Además, la expresión de GIENThp no complementó ni el crecimiento en las células mutantes *ent1 Δ ent2 Δ* ni restauró el defecto en el transporte desde la TGN hacia la vacuola, mediado por clatrina, en la cepa *ent3 Δ ent5 Δ* . Sin embargo, GIENThp interfirió en la función normal de las proteínas Ent3/5, lo cual se evidenció por los defectos en el transporte de la Cps1 al lumen de la vacuola y en la maduración de la feromona de apareamiento.

Los resultados expuestos en esta sección sugieren que GIENThp podría actuar como una proteína Ent3/5 dominante negativa en células de levadura.

CAPÍTULO 4:

DISCUSIÓN GENERAL

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL

La formación de vesículas de transporte es un mecanismo clave para establecer y mantener la compartimentalización subcelular. De esta forma, las vesículas se ensamblan en la superficie citosólica de un compartimiento membranosos donador para entregar a continuación las moléculas cargo específicas a un compartimiento aceptor apropiado. Las CCVs son el tipo mejor caracterizado de vesículas de transporte y median la entrega del cargo a los diferentes compartimentos endosomales/lisosomales en la mayoría de las células eucariotas. En nuestro modelo de estudio, *G. lamblia*, el sistema endosomal/lisosomal exhibe una complejidad y diversidad significativa en términos de morfología y función, aunque su maquinaria de transporte es conservada [204]. En este sentido, anteriormente hemos sugerido que este organismo conserva un conjunto muy reducido de proteínas implicadas en el tráfico vesicular mediado por clatrina, con la participación de solamente dos, de los cuatro, complejos de adaptadores proteicos, AP-1 y AP-2; pero sin la participación APs monoméricas. Sin embargo, durante la realización de este Trabajo de Tesis, encontramos a la proteína GIENThp, que contiene un dominio ENTH conservado, presente en la superfamilia de APs monoméricos ENTH/ANTH/VHS, involucrados en el transporte de proteínas entre los compartimentos endosomal/lisosomal, desde el Golgi hacia los endosomas, entre endosomas o en el proceso endocítico [106, 107]. Así, los resultados presentados en este Trabajo de Tesis sugieren que GIENThp también podría estar involucrada en el tráfico mediado por clatrina en este parásito, cuestionando de esta manera nuestra idea original en la que se proponía que en esta vía de transporte vesicular intervenían exclusivamente proteínas adaptadoras heterotetraméricas.

Tanto las proteínas epsina como las epsinaR contienen en la región N-terminal el módulo ENTH y desempeñan papeles fundamentales en la endocitosis mediada por clatrina en la MP y en transporte vesicular mediado por este coatómero desde la TGN a los endosomas, respectivamente [107]. Asimismo, resultados recientes apoyan la hipótesis de que el dominio ENTH de epsinaR es la base de la superfamilia, ya que está presente en organismos eucariotas muy diferentes, desde en *H. sapiens* hasta en *G. lamblia* [182], siendo este módulo el único representante de la función ENTH/ANTH/VHS en las taxas Chromistas (por ejemplo, *T. gondii*), Euglenosoa (*T. brucei*) y Excavata (*G. lamblia*). Así, se postuló que la presencia de sólo un miembro de esta superfamilia en organismos tempranamente divergentes indicaba que múltiples tareas podrían ser realizadas por proteínas únicas del tipo epsinaR [182]. De acuerdo con esta hipótesis, encontramos que GIENThp tiene funciones y características de epsina y epsinaR en *G. lamblia*, colocando a esta proteína en el surgimiento de la superfamilia ENTH/ANTH/VHS,

participando en la organización de los compartimientos celulares diferenciales para proteger la homeostasis de las organelas en este parásito.

El dominio ENTH juega un papel importante en la creación de curvatura de la membrana a través de la unión específica a PIs que están presentes en ciertas regiones de las membranas [129, 139]. En este contexto, se ha demostrado que el dominio ENTH de epsina1 se une a PI4,5P₂ [131], mientras que el de epsinaR se asocia preferentemente con PI4P, PI5P y PI3,4P₂, a través de una interacción más débil, y en menor proporción a PI3,5P₂ y PI3,4,5P₃ [134]. En este Trabajo de Tesis, se demostró que GIENThp interacciona con PI3,4,5P₃ y PI4P y que el residuo K75 del dominio de ENTH es crítico para que se lleven a cabo estas interacciones, de manera similar a lo que se observó anteriormente en células de *Dictyostelium* y *COS-7* [131, 160]. A pesar de que en *Giardia* no han sido detalladamente descritos los PIs, se conoce que tres PIK y fosfatidilinositol fosfatasas están presentes en el genoma del parásito y que los genes PIK se expresan durante todo el ciclo celular [95]. Estos resultados sugirieron que los PIs sintetizados pueden ser utilizados por la PIK para generar PI3P; PI4P; PI4,5P₂ y PI3,4,5P₃ para la señalización celular [95, 181], aunque no se demostró hasta hace poco que *G. lamblia* es capaz de producir PI3P; PI4P y PI4,5P₂ [165; Gesumaria y Machado, comunicación personal]. En apoyo a estos nuevos hallazgos, detectamos que PI4P está presente en el RE y que se concentra alrededor de los núcleos en los trofozoítos, lo que sugiere que éste podría ser el lípido al que se une GIENThp en el sitio de clasificación o en los sitios de salida del RE (ERES). En cuanto a PI3,4,5P₃, encontramos que se expresa en niveles bajos en las estructuras intracelulares puntiformes en el citoplasma y enriquecido cerca de la MP. De manera similar, en *E. histolytica* y en la ameba no patogénica *D. discoideum*, PI3,4,5P₃ está presente en el citosol, la MP y el fagosoma, lo que sugiere que este lípido puede ser necesario para la captación continua de nutrientes en estos eucariotas inferiores, una característica común de los protozoos incluyendo a *Giardia* [205, 206].

Mientras que las regiones N-terminales de las proteínas que contienen los módulos ENTH/ANTH/VHS están bien conservadas, los motivos C-terminales son muy divergentes, frecuentemente específicos para cada familia o subfamilia, y reclutan los componentes de la capa de clatrina para conducir el ensamblaje del coatómero y la clasificación del cargo [2, 142]. En este Trabajo de Tesis, hemos comprobado experimentalmente que GIENThp es capaz de unirse a clatrina, α AP-2, γ AP-1 y Ub. Sin embargo, ni los motivos típicos DPW (Asp-Pro-Trp), esenciales para la asociación con AP-2, ni cajas de unión a clatrina (LLDLD/LIELE), implicados en la interacción con este coatómero, están presentes en su estructura primaria. De manera similar a lo observado en GIENThp, en la secuencia de epsinaR de *T. brucei* (TbEpsinR), no se encontraron las cajas de

clatrina LLDLD/LIELE, aunque se demostró que esta proteína se asocia a TbEpsinR y que se requiere de esta asociación para que TbEpsinR sea dirigida a las membranas [159]. No obstante, desde la definición original del motivo de la caja clatrina, se han identificado varias variantes de estos motivos y nuevas regiones de unión no canónicas [207]. Por otra parte, tampoco se han observado, tal como ocurre en epsinaR, repeticiones NPF (Asn-Pro-Phe), las cuales son requeridas para la unión con las proteínas portadoras del dominio EH, como por ejemplo Eps15, lo que sugiere que GIENThp está más lejanamente relacionada con las epsinas clásicas (epsina 1-3) que con las proteínas epsinaR. Aunque experimentalmente fue demostrado que GIENThp interacciona con AP-1, la presencia de los motivos de unión para AP-1/GGA (DFxDF) no se encuentra en la secuencia de GIENThp. No obstante, la falta de estos motivos es consistente con la ausencia de la proteína homóloga a GGAs en el genoma *Giardia*. Por otro lado, a diferencia de lo que se muestra en otros organismos en los que las proteínas ENTH interactúan directamente con clatrina, a través de su dominio N-terminal de hélice- β [118, 208], GIENThp se une a una secuencia de clatrina de *Giardia* adyacente a la región C-terminal. En este sentido, es notable que ni los típicos enrejados de clatrina asociadas a la membrana, ni las depresiones emergentes revestidas del coatómero se hayan visualizado en este parásito. En lugar de ello, se observaron depresiones revestidas no típicas, las cuales se encontraban en estrecha asociación con las PVs [52], sugiriendo que, en este organismo, podría ocurrir una disposición distinta de clatrina, que difiere de la formación del trímero y jaulas del coatómero [209]. Así, es posible que la interacción específica de clatrina de *Giardia* con GIENThp (y otras proteínas adaptadoras) defina la matriz de un complejo particular, donde se formen estructuras atípicas. Asimismo, la interacción de GIENThp con clatrina, α AP-2 y γ AP-1 reveló que tanto la presencia de motivos como la conservación de los sitios lineales cortos son muy divergentes en esta célula eucariota de ramificación temprana en la historia evolutiva. Tampoco se detectaron UIM clásicos en la región C-terminal de GIENThp, a pesar de que fue posible demostrar experimentalmente que ésta proteína es capaz de interactuar con Ub. Debido a que no se observó un cambio en la masa molecular de la banda de ~50 kDa de GIENThp mediante inmunotransferencia y sumado al hecho de que no se identificó a GIENThp como una proteína ubiquitinada en un estudio realizado *in vitro* [210], es probable que la proteína adaptadora en estudio se una a receptores ubiquitinados. Aunque queda por analizar si GIENThp es capaz de unir más de una molécula de Ub, la interacción de GIENThp con Ub sugiere que el reclutamiento de Ub a las proteínas que contienen el dominio ENTH no es una innovación específica restringido a eucariotas superiores, como se había sugerido recientemente [159]. Respecto a epsinaR, se informó que esta proteína en humanos contiene en la región C-terminal una secuencia rica en metionina (Met₄₂₇-Met₆₀₅), la cual contiene más de 17% de residuos de este

aminoácido [117]. A pesar de que se ha definido a esta región como un dominio rico en metionina (MRD, del inglés *Methionine-Rich Domain*), los análisis de esta región informados hasta el momento, no han permitido dilucidar la posible función del este dominio o incluso si es un dominio proteico real. En cualquier caso, el análisis de la composición de aminoácidos de GIENThp mostró que también posee un segmento Met₁₉₁-Met₄₀₃, que contiene 32 residuos de metionina (15%), 22 de los cuales se agrupan en el segmento Met₂₄₁- Met₃₅₄ (22%). La comparación de este fragmento con las correspondientes epsina y epsinaR de humanos, mostró que GIENThp puede poseer un segmento carboxilo-terminal enriquecido en residuos de metionina [Zamponi y Touz, resultados no publicados]. Además, encontramos que GIENThp también posee en el extremo C-terminal una región enriquecida en prolina (P) y glutamina (Q), también presentes en TbEpsinR de *T. cruzi*, un organismo cercanamente relacionado a *Giardia* que no presenta dominios de unión de clatrina pero se demostró experimentalmente que es capaz de unir a la cadena pesada del coatómero [159].

Un obstáculo importante en la identificación de una vía particular utilizada por *Giardia* para el crecimiento y la diferenciación celular, radica en el conjunto limitado de ligandos específicos encontrados hasta el momento, como así también en la ausencia de marcadores específicos de las diferentes organelas presentes en este parásito. Debido a que *G. lamblia* carece de endosomas y aparato de Golgi, existen cada vez más evidencias de que las PVs y el RE actúan como los compartimientos endosomal/lisosomal y la estación de clasificación, respectivamente [204]. En este sentido, observamos que GIENThp está presente principalmente en el citosol pero también mostró una localización celular similar a epsina: muy cerca de la MP y colocalizando parcialmente con AP-2, aunque también a epsinaR: en estrecha asociación con la chaperona del RE, BiP. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos encontrado que LDL es endocitado, con fines nutricionales, a través de una proteína relacionada con el receptor de LDL (GILRP) y AP-2 [72], mientras que la hidrolasa soluble AcPh es transportada desde el RE hacia las PVs por su receptor GIVps acoplado a AP-1 [175]. Por lo tanto, tanto el LDL como la AcPh resultaron ser candidatos atractivos para rastrear la función específica de GIENThp, utilizando como estrategia variación en su expresión (aumento y disminución) y la expresión constitutiva de GIENThp mutada en su dominio ENTH (GIEHTH_{K75A}-HA). De esta manera, hemos encontrado que cuando se reduce la expresión de la proteína en estudio, la internalización de LDL es suprimida o reducida significativamente. El mismo efecto se observó en los trofozoítos *glenthk75a*, lo que sugiere que la interacción de GIENThp con la MP es crítica para lograr la endocitosis mediada por el receptor LDL. Por otra parte, la alteración en la actividad AcPh en estas dos células transgénicas sugiere que este defecto podría estar directamente relacionado con la capacidad de GIENThp para apoyar

el tráfico vesicular de AcPh, mediado por su receptor y AP-1, desde el RE hacia las PVs. Es así que, debido a sus características inusuales y a los resultados funcionales que se presentan en este Trabajo de Tesis, proponemos que GIENThp puede desempeñar una doble función, ya sea como epsina o epsinaR, dependiendo de la exigencia del trofozoíto para la endocitosis (por ejemplo, para la nutrición, la remodelación de la composición de la MP o la regulación de la señalización) o para la clasificación de proteínas lisosomales (por ejemplo, para la digestión de moléculas).

En este Trabajo de Tesis, se mostró que tanto la disminución de la expresión GIENThp como la sobre-expresión de una proteína GIENThp no-funcional produjo una disminución notable en el crecimiento de los trofozoítos y una acumulación inusual de material electrodenso dentro de las PVs. Siendo estas características ya previamente observadas por el tratamiento de los trofozoítos salvajes con lactoferrina (LF) [o péptidos de LF (LFpep)], un metabolito antimicrobiano natural y una de las defensas no específicas más importantes de los mamíferos contra las infecciones microbianas [177, 211]. Aunque la acción microbicida de la LF se atribuyó inicialmente a su capacidad de secuestrar el hierro de los organismos susceptibles, el agregado de LF causa un efecto de matanza más rápida que la privación de hierro, y la muerte tampoco se evita por este elemento metálico [178]. Además, actualmente se conoce que la LF y LFpep se unen a los trofozoítos provocando un daño estructural significativo y generando la acumulación de material electrodenso en las PVs [177, 178]. Asimismo, un efecto similar se observó después de la adición de LY294002, que mostró un efecto giardicida marcado y una completa desorganización de la matriz de las PVs [180]. Se ha demostrado en otras células que la LF es internalizada por su receptor a través de la endocitosis mediada por clatrina [212] y que inhibe específicamente la endocitosis de quilomicrones [213], de todas formas, se necesita más información para entender si existe una correlación entre LF, LDL/la endocitosis de quilomicrones, los PIs y GIENThp en *Giardia*. En este sentido, nuestros resultados actuales sugieren que existe una correlación entre la expresión GIENThp (y otras moléculas implicadas en la endocitosis mediada por clatrina y APs), la internalización LF y el crecimiento celular. Además, la acumulación de material electrodenso en las PVs, junto con el agrandamiento notable de las vacuolas en las células *glenthk75a*, sugiere que GIENThp puede poseer una función adicional en la clasificación y la gemación de vesículas a partir de las PVs, actuando en forma conjunta con dinamina, clatrina, y AP-2 [73, 91]. Por lo tanto, la formación de PVs de mayor tamaño podría ser causada por un fallo en la gemación o la fisión de CCVs cuando se muta a GIENThp o dinamina y actúan como mutantes dominantes negativas. Aunque se ha sugerido que la dinámica de carga de las PV implica un intercambio vertical (de la MP o desde el RE/envoltura nuclear hacia PVs), nuestros resultados recientes muestran que es

posible que GIENThp también participa en el movimiento vesicular lateral PVs a PVs, necesario para la maduración de las vesículas [175].

Previamente, se demostró que las proteínas que contienen el módulo ENTH poseen funciones adicionales en la señalización y que más aún, pueden llevar a cabo otras en el núcleo [121]. De manera semejante a lo que se reportó para la mutante de epsina 1 (K76A) en células COS-7 [131], encontramos que GIENTh_{K75A}-HA se acumula significativamente en el interior del núcleo. Por otra parte, se conoce que los PIs se encuentran dentro de las moléculas reguladoras más versátiles, y que poseen la habilidad de realizar diversas funciones en la señalización celular y en los mecanismos de transporte mediados por vesículas. En este Trabajo de Tesis se demostró que los PIs también puede influir en la localización de las proteínas, ya que cuando GIENThp es incapaz de unirse través de su dominio de ENTH a PI4P y PI3,4,5P₃, ya sea en el caso de GIENTh_{K75A}-HA, o cuando se añadió el inhibidor de PI3K (LY294002), la localización de la proteína en el núcleo aumentó drásticamente. Posiblemente, esta incapacidad para interactuar con PIs impida su retención en las membranas, mostrando consecuentemente una mayor presencia en los núcleos. Motivo por el cual, estos resultados apuntan a una distribución general citoplasmática pero también nuclear de GIENThp, apoyando la observación de que las proteínas del tipo epsina también pueden desempeñar un papel en las vías de señalización, vinculando la maquinaria endocítica con la regulación de la función nuclear [120]. Se ha reportado, que la señalización PI3K juega un papel importante en la proliferación celular y la supervivencia [214] y, por lo tanto, la presencia de PI3,4,5P₃ en *E. histolytica*, *D. discoideum* y *G. lamblia* puede también estar relacionada con su naturaleza unicelular, para el cual las divisiones rápidas y continuas son un objetivo importante [205]. Sin embargo, queda por esclarecer si la interacción entre el dominio de ENTH de GIENThp y PI3,4,5P₃ es esencial para la señalización en este organismo parásito. Anteriormente, se demostró que la incubación de las células B834 (DE3) con leptomicina, que es un metabolito fúngico que inhibe la ruta de exportación nuclear, conduce a una rápida acumulación de epsina en el núcleo, lo que sugiere que esta proteína portadora del dominio de ENTH, es transportada continuamente dentro y fuera de la envoltura nuclear [120, 179]. En *Giardia*, se demostró que cada núcleo presenta excepcionalmente un número diferente de complejo de poros, distribución, y agrupación [215], lo que podría explicar la presencia de GIENThp o la acumulación de GIENTh_{K75A}-HA en solamente uno, de los dos núcleos del parásito. Aunque se demostró que la extensa vía de paso directo a través de la envoltura nuclear se produce a través de los complejos de los poros nucleares [216], la función de la envoltura nuclear en *G. lamblia* ha sido poco estudiada. Además, las diferencias en el número de cromosomas entre los dos núcleos parecen ocurrir en ciertas cepas del parásito [217] y la expresión de la ARN

nucleolar pequeño GlR17 se encontró que se produce principalmente en un solo nucleolo [218]. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la asimetría de ambos núcleos le otorga a *Giardia* posibilidades únicas para la regulación de la expresión génica, como podría ser el caso de la regulación de GIENThp. En cualquier caso, aunque no podemos excluir completamente que se trate de una proteína que es direccionada al núcleo, donde uno de ellos es más activo que el otro, sin duda, la localización de GIENThp en sólo uno de los núcleos es una particularidad de esta proteína.

Ha sido descrito que la familia de proteínas que contienen el dominio ENTH están presentes en casi todos los organismos eucariotas, particularmente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* contiene dos homólogos de epsina clásica, Ent1 y Ent2 y dos ortólogos de proteínas epsinaR, Ent3 y Ent5 [138, 219]. Como se mencionó anteriormente, el módulo ENTH de epsinaR es el fundador de la superfamilia ENTH/ANTH/VHS, ya que está presente en 80 de los 84 organismos eucariotas que se analizaron y además, en ese estudio posicionan a GIENThp en el comienzo de la familia ENTH [182]. Por lo tanto, este hallazgo nos alentó a analizar si GIENThp podría ser un factor clave en la evolución de la familia ENTH, por lo que decidimos probar su función en la levadura *S. cerevisiae*. De esta manera, encontramos que GIENThp fue incapaz de reemplazar la función de Ent1/2 o Ent3/5 en hongos, muy probablemente debido al grado limitado de homología entre las secuencias de estas proteínas. Estos resultados subrayan que ni un dominio de proteínas con un plegamiento similares (el módulo ENTH) ni la presencia de aminoácidos estructurales (Y100 y T104) son suficientes para poder realizar la función de la proteína. Es posible que la preferencia en la unión a lípidos de GIENThp, para PI3,4,5P₃ en lugar de PI4,5P₂ altere su interacción con el blanco apropiado en la MP, lo que resulta en el fracaso del rescate del defecto en la endocitosis en células *ent1Δent2Δ*. Sin embargo, otra posibilidad podría ser la incapacidad de la región C-terminal de GIENThp para unir clatrina de levadura o proteínas ubiquitinadas ya que no existen dominios canónicos para unión a éstas en la secuencia de GIENThp. Por otro lado, la AP en estudio tampoco fue capaz de llevar a cabo la función de las proteínas nativas Ent3/5 en células de *S. cerevisiae*, a pesar de que demostramos que interactúa con PI4P. En este sentido, teniendo en cuenta que *G. lamblia* carece de un aparato de Golgi y de APs monoméricos del tipo GGAs, es de esperar que GIENThp falle en el reconocimiento de moléculas claves, las cuales están presentes en el aparato de Golgi de hongos e intervienen en el transporte vesicular de proteínas específicas desde la TGN hacia la vacuola.

Los datos presentados hasta el momento nos aludían que debido a la divergencia en la secuencia, era posible que GIENThp o sólo su gENTH no estén calificados para realizar las funciones llevadas a cabo por las proteínas del tipo epsina y epsinaR en células de *S. cerevisiae*. Sin embargo, los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis, relacionados con la función *in vivo* de esta proteína en *G. lamblia* y el análisis filogenético de GIENThp, nos sugerían que tal vez esta proteína podría actuar como una proteína dominante negativa de Ent1/2 o Ent3/5. Así, nuestros resultados mostraron que la proteína en estudio inhibía la función normal de Ent3/5 de levaduras, lo que sugiere que los vestigios de la función epsinaR observados en *G. lamblia* fueron insuficientes para realizar la misma función en las células más evolucionadas. Ahora bien, el mecanismo por el cual GIENThp impide la función de Ent3/5 se puede explicar considerando que la proteína en estudio es capaz de unirse a PI4P, entonces es posible que esta AP monomérica, cuando se sobre-expresa en las células de levadura de tipo salvaje, compita en la unión a este PI, enriquecido en la membrana del aparato de Golgi, inhibiendo consecuentemente la unión de Ent3/5 a PI4P y restringiendo así su función. Sin embargo, debido a que GIENThp no puede interactuar con las proteínas AP-1 y GGAs de levadura, es que no fue capaz de participar en el tráfico desde la TGN hacia la vacuola en *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES FINALES

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES FINALES

En células eucariotas más evolucionadas, existen diversos adaptadores proteicos que intervienen en el reconocimiento de señales específicas presentes en los dominios citosólicos de las proteínas transmembrana, dirigiendo de esta manera su transporte y destino. Por motivo por el cual, poseer múltiples adaptadores proteicos provee a estas células de la plasticidad necesaria para permitir el control temporal aún en situaciones donde se producen altos niveles de tráfico proteico. Dado que las APs llevan a cabo funciones esenciales en el tráfico intracelular de proteínas y teniendo en cuenta las características ancestrales de *Giardia lamblia* en la evolución, es que resultó de gran interés identificar el repertorio completo de estas moléculas involucradas en procesos de transporte vesicular. Así, el tema abordado en este Trabajo de Tesis resultó innovador, ya que hasta la fecha se suponía que *Giardia* contaba con una maquinaria molecular reducida, donde solamente las proteínas adaptadoras multiméricas (AP-1 y AP-2) estaban involucradas en estos procesos. Sin embargo pudimos identificar y caracterizar funcionalmente a una proteína miembro de la familia ENTH y las evidencias encontradas, junto a los antecedentes ya conocidos nos permitieron sugerir un modelo donde GIENTHp es capaz de llevar a cabo una doble función como epsina y epsinaR.

Ha sido descrito que *Giardia* no sintetiza lípidos *de novo*, sino que los adquiere a través de fuentes exógenas, además se conoce que una porción de ellos es internalizada por endocitosis mediada por receptor [72]. En este sentido, en este Trabajo de Tesis encontramos que GIENTHp se une a PI3,4,5P₃ presente en la MP, lo que conduce a la deformación y curvatura de la bicapa lipídica. A continuación, a través de su región C-terminal, la proteína en estudio se asocia al receptor transmembrana de LDL ubiquitinado (GILRP) que está presente en la MP, a clatrina y a la subunidad α de AP-2 favoreciendo la formación de la vesícula recubierta del coatómero y llevando a cabo de esta manera su rol como proteína del tipo epsina clásica (FIG.5.1). Por otro lado, el receptor GILRP se asocia al complejo AP-2 a través de un motivo específico de internalización presente en su cola citoplásmica y finalmente la molécula de LDL es internalizada al interior de la célula.

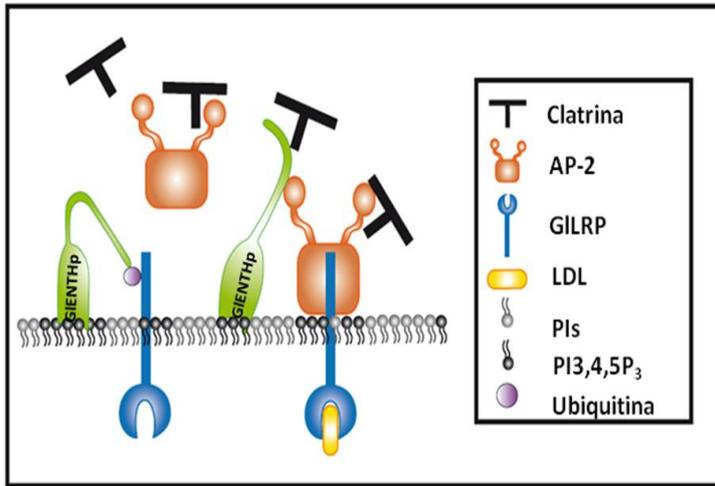


FIGURA 5.1: MODELO PROPUESTO PARA GLENTHP COMO EPSINA CLÁSICA EN *GIARDIA LAMBLIA* IMPULSANDO LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR.

Se muestra una representación esquemática de las moléculas involucradas en la internalización de LDL, donde las proteínas GLENTHP se unen a PI3,4,5P₃ y al receptor ubiquitinado presentes en la MP y a su vez, se asocia a las proteínas endocíticas AP-2 y clatrina. Por su parte, el receptor de LDL, GILRP, se une el complejo AP-2 y la molécula de LDL es finalmente internalizada al interior de la célula. Adaptado de [2].

Por otra parte, previamente en nuestro laboratorio se describió que la fosfatasa ácida es una enzima soluble y es transportada desde el RE hacia las PVs a través de un mecanismo dependiente de su receptor (GIVps), clatrina y la proteína adaptadora AP-1 [175]. Además, en este Trabajo de Tesis encontramos que en este proceso de tráfico vesicular interviene GLENTHP llevando a cabo su rol como epsinaR. Así, proponemos un modelo en el que la proteína en estudio, en primer lugar a través de su dominio conservado, el módulo ENTH, se asocia a PI4P en la membrana del ERES, se introduce en la bicapa lipídica, conduciendo de esta manera a la deformación y curvatura de la membrana. Asimismo, GLENTHP es capaz de unirse a través de su región carboxilo-terminal a GIVPS, a la subunidad γ de AP-1 y clatrina en las vesículas nacientes, lo que conduce finalmente al transporte de la AcPh desde el RE, donde es sintetizada, hacia las PVs, donde se convierte en una enzima activa (FIG.5.2).

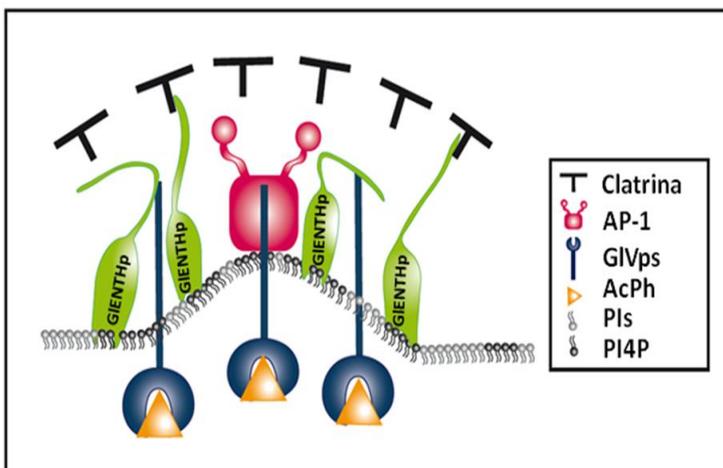


FIGURA 5.2: MODELO SUGERIDO PARA GLENTHP COMO EPSINAR EN *GIARDIA LAMBLIA*.

Se esquematiza el mecanismo planteado para el ensamblaje de clatrina en el RE mediado por GLENTHP: El dominio ENTH de GLENTHP se une a PI4P en la membrana del ERES, lo que conduce a la deformación y curvatura de la membrana. Además, GLENTHP se asocia al receptor de la fosfatasa ácida (GIVPS), AP-1 y clatrina en las vesículas nacientes, a través de su región C-terminal, lo que conduce al transporte de la AcPh desde el RE hacia las PVs. Adaptado de [2].

Así, los resultados obtenidos en el **CAPÍTULO 2** nos permiten sugerir un papel multifuncional de GIENTHp (**FIG.5.3**), consistente con la evidencia de que *Giardia* posee muchas proteínas con funciones combinadas y que se puede considerar como portadora de una versión minimalista de la maquinaria de transporte más compleja presentes en otros organismos eucariotas. De todos modos, un análisis más detallado de GIENTHp, combinando enfoques bioquímicos, farmacológicos, genéticos y de biología celular, generará nuevos conocimientos sobre la función de PVs y podría proporcionar nuevas vías de intervención terapéutica contra *Giardia* y otros parásitos relacionados.

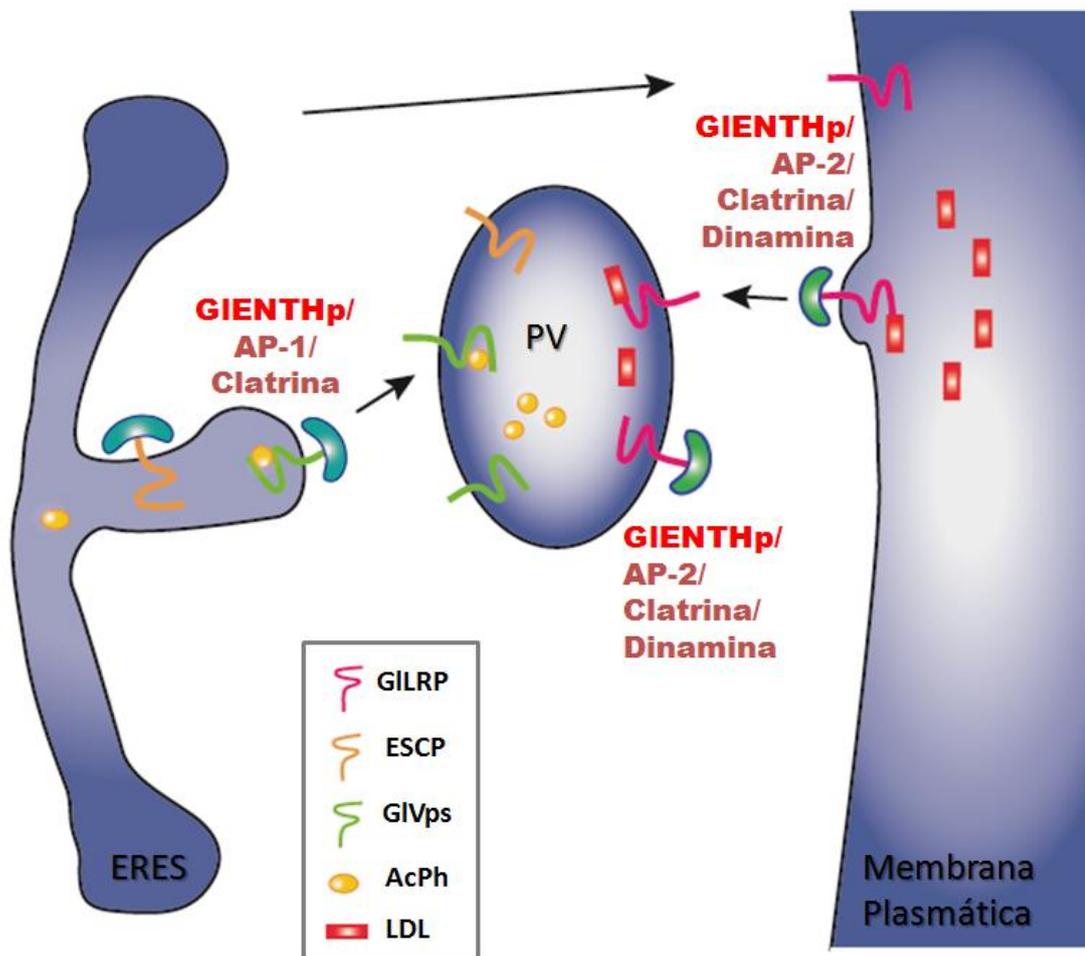


FIGURA 5.3: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL TRÁFICO DE PROTEÍNAS LISOSOMALES CON LA INTERVENCIÓN DE GIENTHp EN *G.LAMBLIA*. Desde el sitio de direccionamiento la enzima AcPh se asocia al receptor GIVps y a las proteínas adaptadoras GIENTHp y AP-1 para ser transportada a las PVs. Por otra parte, a partir de la membrana plasmática, AP-2 junto a GIENTHp intervienen en la endocitosis de LDL (mediada por su receptor GILRP) hacia a las PVs.

En el **CAPÍTULO 3** se analizó el rol funcional de GIENTHp utilizando como modelo células de levadura, encontrando que la proteína en estudio no complementa los fenotipos de las células mutantes *ent1Δent2Δ* y *ent3Δent5Δ* en *S. cerevisiae*, sugiriendo una divergencia funcional entre GIENTHp y ENT1/2/3/5. Sin embargo, se evidenció que la AP monomérica del parásito actuaba como una proteína dominante negativa de Ent3/5 en hongos tal como se muestra en el modelo propuesto en la **FIGURA 5.4**. De esta manera nuestro análisis permitió una reconstrucción evolutiva de la vía endosomal/lisosomal y podría por fin contribuir a la comprensión del itinerario seguido por las proteínas lisosomales, la participación de los endosomas tempranos frente a endosomas tardíos en el transporte, y el impacto relativo de los diferentes mecanismos moleculares tanto en los procesos anterógrados y retrógradas de transporte.

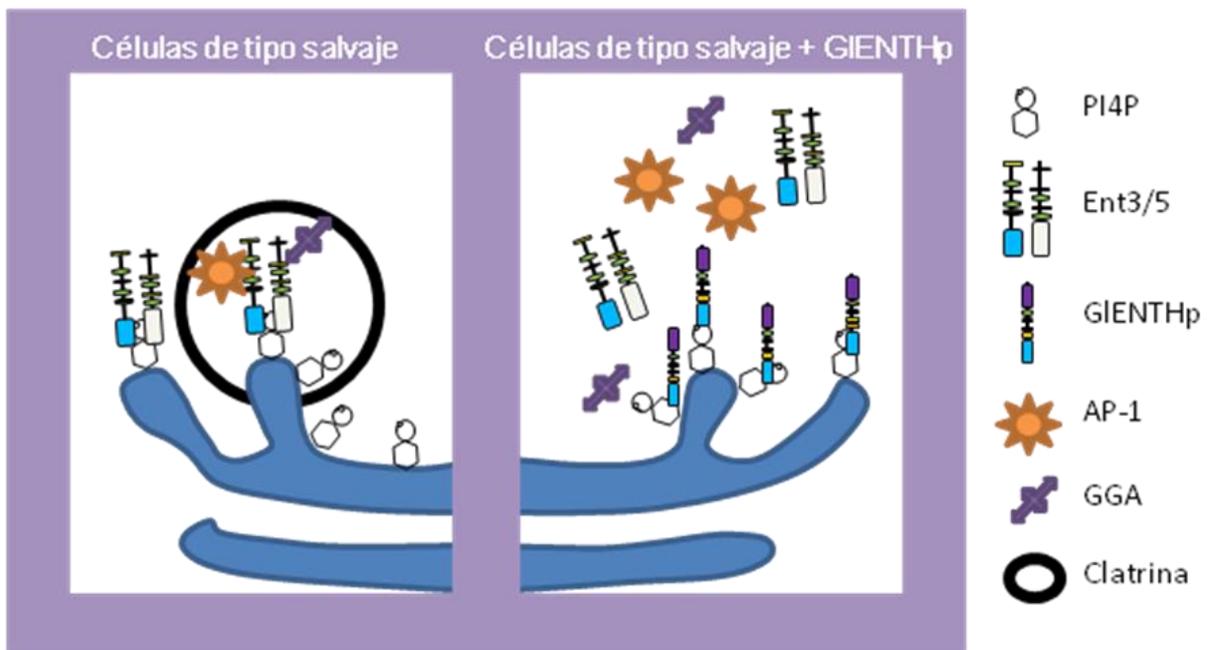


FIGURA 5.4: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL TRÁFICO DE PROTEÍNAS CON LA INTERVENCIÓN DE GIENTHP EN *S. CEREVISIAE*. A la izquierda se muestra que la asociación a la membrana de Ent3/5 requiere de la unión a PI4P, que se encuentra localizado en la cisterna trans del aparato de Golgi en la levadura, y de la interacción con las proteínas adaptadoras AP-1 y GGAs, las cuales participan en el tráfico vesicular desde el aparato de Golgi a la vacuola (células de tipo salvaje). A la derecha se esquematiza cómo GIENTHp también se une a PI4P en la membrana del aparato de Golgi, cuando es sobre-expresada (células de tipo salvaje + GIENTHp) inhibiendo la interacción de Ent3/5 con este PI, sin embargo como no se asocia a AP-1 y GGAs inhibe la función normal de las proteínas del tipo epsinaR en hongos.

CAPÍTULO 6:

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 6: MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2:

6.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS (*IN SILICO*)

La proteína *GIENTHp* (*GL50803_3256*) fue identificada mediante la búsqueda en *GDB* (<http://GiardiaDB.org>). Para probar la conservación del dominio ENTH de *GIENTHp* (*gENTH*), se realizó una búsqueda de secuencias homólogas utilizando Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) seguido de un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa CLUSTAL 2.1 [220] con un arreglo por defecto y empleando secuencias del dominio ENTH provenientes de las proteínas epsina1 y epsinaR de *Homo sapiens* y de epsina1 de *Rattus norvegicus*. También se utilizaron las secuencias ENTH de los protistas *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichomona vaginalis* y *Spironucleus salmonicida* y del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Con el objetivo de determinar la presencia de péptido señal en *GIENTHp* se utilizaron los programas y servicios web: Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) [221, 222], SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) [223] y PSORT II (<http://www.psort.org/>) [224]. Para el análisis de la estructura 3D de *gENTH*, se utilizaron como herramientas los programas Max Planck Institute Bioinformatics o HHPred y Modeller v7.7 para modelos predictivos. El dominio de ENTH de *GIENTHp* se construyó utilizando el dominio de ENTH de epsina1 humana (HsENTH) como modelo. HsENTH unido a PI4,5P₂, resuelto por difracción de rayos X (resolución: 1.70 Å) (Swiss-Model repository, UniProt AC: Q9Y6I3). MolMol [225] fue utilizado para crear las imágenes 3D. La verificación de las estructuras 3D predichas se ejecutó utilizando los programas ANOLEA [226], Verify 3D [227] y MolProbity [228]. Para predecir los efectos funcionales debido a la sustitución de un aminoácido se utilizó el método SNAP (del inglés *Screening for Non-Acceptable Polymorphisms*) (<https://www.rostlab.org/services/SNAP/>) [161].

6.2 ORGANISMOS Y CULTIVO IN VITRO

Los trofozoítos de *Giardia lamblia* se adquirieron en *American Type Culture Collection* (ATCC 50582) y son provenientes de la cepa *WB*, clon 1267 [229]. Para cultivarlos axénicamente se utilizó medio TYI-S-33 (pH 7) suplementado con 10% de suero bovino adulto y 5% de bilis bovina (medio completo de crecimiento) [230]. Todos los cultivos se realizaron en tubos de borosilicato de 14 mL con tapa a rosca (Eurotubo®, Deltalab). Los tubos conteniendo los

trofozoítos fueron incubados a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial u otra etapa, dependiendo del experimento. El cultivo se realizó colocando los tubos a 30° de inclinación en gradillas, permitiendo una mayor adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo. Para cosecharlos, se cambió el medio de cultivo por medio nuevo o por buffer fosfato (*PBS*: del inglés *Phosphate Buffer Saline*) y se incubaron los tubos a 4°C durante 15 min para permitir la suelta de los trofozoítos de las paredes del tubo y, posteriormente, se realizó una centrifugación a 1455 x g por 10 min.

6.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN EN *GIARDIA LAMBLIA*

6.3.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR

La secuencia de *GIENTHp* fue obtenida como se describe en la sección Resultados. Para amplificar el promotor endógeno se utilizaron las 320 pb que se ubican aguas arriba del inicio de la transcripción de *glenthp*. El ADN genómico de *Giardia* fue utilizado como templado para amplificar, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*: del inglés *Polymerase Chain Reaction*), la secuencia codificante del gen de interés, considerando que este parásito carece de intrones. Se diseñaron manualmente los cebadores (TABLA 6.1, 6.2 Y 6.3), para realizar el clonado del fragmento de interés en un vector específico para *Giardia lamblia*. La secuencia reconocida por la enzima de restricción utilizada es subrayada para cada cebador. Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) y almacenados a -20°C. Las diluciones se realizaron en agua DEPC (agua tratada con Dietil-pirocarbonato).

La amplificación por *PCR* se llevó a cabo empleando la enzima *Taq platinum Hight Fidelity* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción: 2 min a 94°C, 30 ciclos de [30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C] y luego 10 min a 72°C para la extensión final. El análisis de los productos de *PCR* se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa, como se describió previamente. Los productos de *PCR* se purificaron mediante el empleo de un ensayo comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, US). Las secuencias de todos los constructos se enviaron para su secuenciación a la compañía *Macrogen* (<http://www.macrogen.com>).

6.3.2 EXPRESIÓN DE GLENTHP Y GLENTHK75AP EN *GIARDIA LAMBLIA*

Para expresar GLENTHP y su versión mutante GLENTHK75AP, se utilizó el vector de expresión pTubApa-H7-HApac (FIG. 6.1). Este plásmido permite la expresión constitutiva y estable de genes en trofozoítos de *G. lamblia*, gracias a la presencia del promotor de tubulina y a la selección con el antibiótico puromicina, respectivamente. El casete de puromicina se encuentra bajo el control del promotor endógeno no regulado de *gdh* (FIG. 6.1). Las proteínas se expresan fusionadas a 3 repeticiones en tándem del epítipo de hemaglutinina (HA) del subtipo H3 del virus influenza (YPYDVPDYA) en su extremo carboxilo-terminal [231, 69, 96]. Así, para expresar GLENTHP de manera constitutiva, el gen *glenthp* fue clonado en el vector pTubApa-H7-HApac reemplazando el gen *vsph7* y dando como resultado la creación del vector pGLENTHP-HApac (FIG. 6.2). Para expresar GLENTHP bajo su promotor endógeno, el vector fue construido mediante el remplazo del promotor de tubulina de pGLENTHP-HA por el promotor endógeno de la proteína, el cual fue amplificado como se menciona en la SECCIÓN 6.5.1., obteniendo el vector peGLENTHP-HApac (FIG. 6.2).

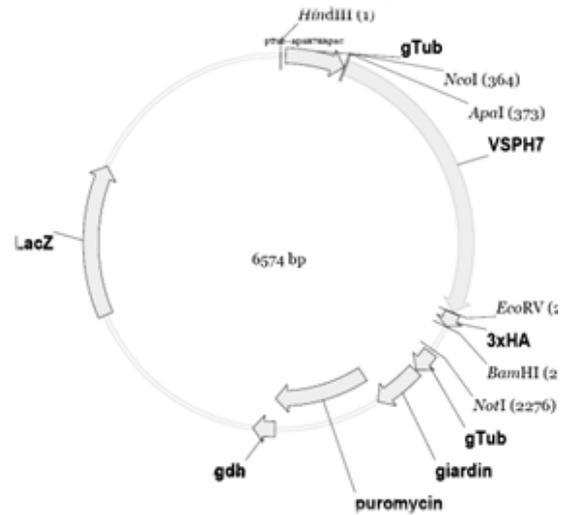


FIGURA 6.1: VECTOR PTUBAPA-H7-HAPAC. El vector original expresa a la proteína VSPH7-HA mediante promotores de tubulina. Contiene además el gen *puromicina* y *LacZ* para expresar células de manera estable en *Giardia* y *E. coli*, respectivamente. Para clonar un nuevo gen que exprese una proteína de fusión-HA, el vector puede ser restringido con las enzimas *NcoI* o *ApaI* (región 5') y *EcoRV* (región 3').

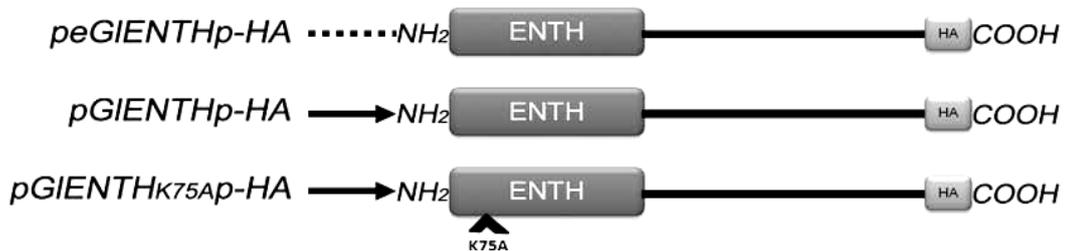


FIGURA 6.2: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS VECTORES DE GLENTHP LOS CUALES POSEEN EL TAG HA EN EL EXTREMO C-TERMINAL. Todos los vectores consisten en el dominio de ENTH, las secuencias C-terminal y la etiqueta HA, dirigido por el promotor endógeno (línea discontinua) para peGLENTHP-HA o un promotor de tubulina (flechas) para pGLENTHP-HA y pGLENTHK75AP-HA. La posición de la mutación puntual (K75A) se muestra por debajo de la estructura génica de la mutante.

Para introducir la mutación en el dominio ENTH (K75) de la secuencia génica de GIENTHp, se diseñaron cebadores (TABLA 6.2) con la mutación puntual empleando el programa de Stratagene “*QuikChange Primer Design Program*” (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner>) y se realizó el ensayo de mutagénesis *QuikChange* siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Stratagene*) [96, 232]. Brevemente, se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando como templado el vector pGIENTHp-HApac. Luego del agregado de la enzima de restricción *DpnI* 1 h a 37°C, que digiere el ADN de doble cadena super-enrollado (no mutado), 3 µL del producto obtenido fue utilizado para transformar bacterias *XL-1 Blue*. Finalmente, el plásmido pGIENTH_{K75A}p-HApac (Fig. 6.2) fue obtenido de las colonias de bacterias y enviado a la compañía *Macrogen* para su secuenciación. El secuenciamiento se realizó utilizando un termociclador *BigDye™* y los productos de reacción purificados por precipitación con etanol fueron secuenciados en el equipo *Automatic Sequencer 3730xl*, seleccionándose los plásmidos que presentaron las mutaciones correctas.

TABLA 6.1: SECUENCIA DE CEBADORES DISEÑADOS PARA EL CLONADO Y EXPRESIÓN DE GIENTHP

Cebadores	Secuencia (5'→3')
GIENTHp Fw	CATT <u>CCATGG</u> CTGCGAAGGAGAACATGCAG
GIENTHp Rv	CATT <u>GTATAC</u> AAAGAAGGACATGAGGTCCG
Prom end Fw	CATTA <u>AAGCTT</u> CATATAAGCTCTTCGGC
Prom end Rv	CATT <u>CCATGG</u> TTTTTTTCAACCATATTTGT

Fw: sentido. Rv: antisentido. CCATGG: secuencia reconocida por *NcoI*.
GTATAC: secuencia reconocida por *Bstz171*. AAGCTT: secuencia reconocida por *HindIII*.

TABLA 6.2: CEBADORES DISEÑADOS PARA EL CLONADO Y EXPRESIÓN DE LA MUTANTE DE GIENTHP.

Cebadores	Secuencia (5'→3')
GIENTH _{K75A} p Fw	TCTGGTCACTTCTTTCAAGCACCAACTCAGCTAGCTGGAAGCAGATC
GIENTH _{K75A} p Rv	GATCTGCTCCAGCTAGCTGAGTTGGTGCTGAAAGAAGTGACCAGA

Fw: sentido. Rv: antisentido.

6.3.3 DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GLENTHP EN *GIARDIA LAMBLIA*

Para disminuir la expresión de GLENTHP, se utilizó el vector dsRNA, el cual fue generado en nuestro laboratorio y permite la expresión inducible de ARN de doble cadena (ARNdc) en *G. lamblia* (GenBank GU395185) [96, 174] (FIG. 6.3). Para silenciar el gen de *glenthp*, nucleótidos 5' del 1 al 778, de los 1218 nt totales, se introdujeron dentro del vector dsRNA luego de la amplificación por PCR del inserto, utilizando los cebadores que se detallan en la TABLA 6.3. El vector resultante pdsRNAglenth (10 µg) se utilizó para transfectar trofozoítos WB/1267 de *G. lamblia*. La expresión del ARNdc fue inducida por tetraciclina (10 µg/mL, concentración final) durante 48 hs. La producción del ARNdc y la depleción del ARNm de *glenthp* fue evaluado por PCR en tiempo real, como se describe en detalle más adelante.

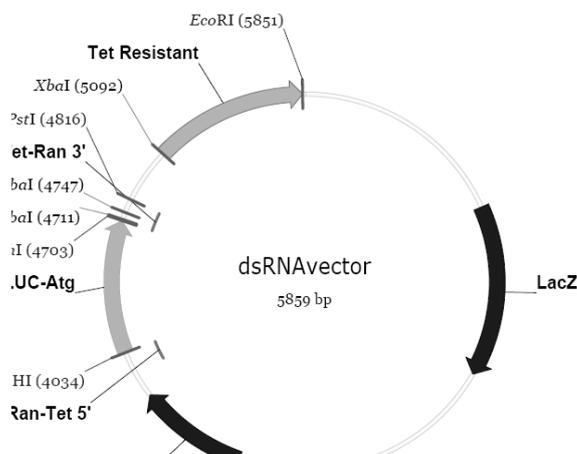


FIGURA 6.3: VECTOR INDUCIBLE DSRNA. Este vector se desarrolló para la expresión inducible de ARN de doble cadena en *G. lamblia*. Contiene promotores opuestos *ran* de *Giardia* (en gris), elementos operadores de tetraciclina (Tet) y está diseñado para la inserción y expresión de productos de PCR de doble cadena. Este vector contiene además un casete de puromicina bajo el control del promotor endógeno no regulado de *gdh*. A partir de ADN genómico de *G. lamblia* se amplificó la secuencia de *glenthp* por PCR y se introdujo entre los promotores opuestos *ran* inducibles por tetraciclina

TABLA 6.3: CEBADORES DISEÑADOS PARA EL CLONADO Y EXPRESIÓN GLENTHP EN EL VECTOR DSRNA

Cebadores	Secuencia (5' → 3')
GIENTHp ds Fw	CATTGGATCCCTGCGAAGGAGAACATGCA
GIENTHp ds Rv	CATTGCATGCCATACCCATGCCCATGTTG

Fw: sentido. Rv: antisentido. **GGATCC**: secuencia reconocida por *BamHI*. **GCATGC**: secuencia reconocida por *NheI*

6.3.4 CORTE DEL VECTOR E INSERTO UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El marco de lectura abierto que codifica para cada gen de interés fue clonado en el vector de expresión correspondiente, según cada caso. Para *glenth* el inserto de 1200 pb fue incubado con el par de enzimas *NcoI/Bstz171*, en el caso del promotor endógeno de *glenth* el fragmento de 320pb con *HindIII/NcoI* y por último, el fragmento del gen *glenth* desde el 1 hasta el nt 778 se

utilizó el par de enzimas *BamHI/NheI*. En todos los casos, la digestión se realizó por 2 hs a 37°C (corte) y 10 min a 70°C (inactivación de la enzima). Todas las enzimas de restricción utilizadas pertenecen a *New England, Biolabs*. Los productos de restricción se chequearon en gel de agarosa al 1% como se detalla más arriba. El vector cortado se purificó a partir del gel mediante el empleo de un ensayo comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, US).

6.3.5 LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE CORTE

Los insertos y vectores se ligaron mediante la incubación con la enzima T4 DNA Ligasa (*Fermentans*) por 16 hs a 16°C, seguido de 10 min a 70°C para inactivar la enzima.

6.3.6 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES *XL-BLUE*

Bacterias *XL-Blue* fueron crecidas en 5 mL de LB/Tetraciclina estéril (Peptona 1% / Extracto de Levadura 0,5% / Tetraciclina (Tet) 15 mg/mL en 100 mL de agua destilada) a 37°C en agitación toda la noche. Luego, 1 mL de este cultivo fue empleado para inocular 250 mL de LB/Tet (15 µg/mL) y cultivado en *Erlenmeyer* a 18°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) aproximada de 0,6. Cuando se alcanzó este valor, las bacterias se incubaron 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 2095 x g por 10 min a 4°C y se resuspendió el precipitado en 80 mL de tampón TB frío (Pipes 10 mM/MnCl₂ 55 mM/CaCl₂ 2H₂O 15 mM/KCl 150 mM, pH 7). Las bacterias se incubaron nuevamente 10 min en hielo y se centrifugaron a 2095 x g por 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 20 mL de tampón TB frío y se agregaron 1,5 mL de DMSO (DMSO al 7%) de forma cuidadosa para evitar toxicidad en las células. Luego, las bacterias se fraccionaron en alícuotas de 1 mL en tubos estériles, congelándose en N₂ líquido y conservándose a -70°C hasta su uso.

6.3.7 TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

Las bacterias *XL-Blue* competentes se transformaron con el vector conteniendo el gen de interés (adicionando 2 µL del producto de ligación), mediante shock térmico: 15 min a 4°C, 30 s a 42°C y 2 min a 4°C. Luego, se adicionó 1 mL de LB y se dejó en agitación durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 2851 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µL de LB. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri conteniendo LB-ampicilina (25mg/mL)-agar 1,2% y se incubaron toda la noche en estufa a 37°C.

6.3.8 CHEQUEO DE COLONIAS POR PCR

Las colonias obtenidas luego de la transformación se chequearon mediante *PCR* utilizando la enzima *Taqpol* (Invitrogen), empleando cebadores específicos de cada gen de interés, o del

vector utilizado, y en las mismas condiciones de reacción detalladas anteriormente para la PCR del inserto. De igual manera, el análisis de los productos de PCR se llevó a cabo mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1%. Las colonias positivas se crecieron en LB líquido con Ampicilina (25 mg/mL) y se cultivaron toda la noche en agitación a 37°C.

6.3.9 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Los cultivos de bacterias incubados durante la noche fueron centrifugados a 3500 x g por 8 min a 20°C y se purificaron utilizando un ensayo comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, US). Los plásmidos obtenidos se detallan a continuación en la TABLA 6.4:

TABLA 6.4: VECTORES GENERADOS

Vector	Descripción
pGIENTHp-HA	Permite la sobre-expresión de GIENTHp-HA
peGIENTH-HA	Permite la expresión endógena de GIENTHp-HA
pGIENTH _{K75A} P-HA	Permite la sobre-expresión de GIENTH _{K75A} P-HA
pdsRNAGlenth	Regula negativamente la expresión de GIENTHp

6.4 TRANSFECCIÓN DE TROFOZOÍTOS DE *GIARDIA LAMBLIA* CEPA WB/1267

Para cada una de las transfecciones se partió de trofozoítos en monocapa. Las células fueron enfriadas y centrifugadas a 1455 x g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 360 µL de medio completo adicionando 40 µL de plásmido. La transfección se realizó mediante electroporación (Electro Square Porator™ ECM 830) aplicando 1 pulso de 14 ms a 350 V en una cubeta de 4 mm. Seguidamente, la muestra fue incubada en hielo durante 10 min y luego trasvasadas a un tubo de vidrio de 7 mL conteniendo medio completo y los antibióticos Piperacilina (500 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) y Moxalactama (333 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Luego de cultivar los trofozoítos a 37°C toda la noche, se agregó Puomicina (10 µg/mL) (Invivogen, San Diego, CA, US) para seleccionar aquellas células que estuvieran transfectadas. La expresión de las proteínas de interés se visualizó por IF e inmunotransferencia.

6.5 PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El ARN total fue extraído a partir de trofozoítos, de acuerdo a lo informado [96]. Para ello, el ARN se aisló usando el reactivo TRizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, US) seguido de una

segunda purificación utilizando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, US).

El ADN genómico fue purificado siguiendo el protocolo de extracción con fenol y precipitación con alcohol isopropílico [233].

6.6 PCR EN TIEMPO REAL

El ARN total de trofozoítos de tipo salvaje y de las células *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-enth*, fue tratado con ADNasa (Promega, Madison, WI, US), previo a la síntesis de ADNc con la enzima *Transcriptasa Reversa RevertAid™* (Fermentas). Los ADNc fueron utilizados para el análisis de la expresión de genes utilizando la mezcla *PCR SYBR Green Master Mix* para PCR en tiempo real (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), ADNc de simple cadena (100 ng) y cebadores en una concentración de 800 nM, en un volumen de reacción de 20 µl. Los cebadores se diseñaron para la detección de los genes *gdh* y *glenth* como se muestra en la TABLA 6.5. Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) y almacenados a -20°C. Las diluciones se realizaron en agua DEPC (agua tratada con Dietil-pirocarbonato).

TABLA 6.5: SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL

Cebadores	Secuencia (5'→3')
gdh real Fw	AGGGCGGCTCCGACTTT
gdh real Rv	AGCGCATGACCTCGTTGTC
glenth real Fw	CGGTTTCATCAGCCCACTCAT
glenth real Rv	CGTCTGGGCTGGAGCTTGT

Fw: sentido. Rv: antisentido.

Las corridas se realizaron en un sistema 7500 estándar (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de *RT-PCR* fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de [95°C por 15 seg y 60°C por 1 min]. La expresión génica fue normalizada utilizando el gen *gdh* como gen de referencia y calculada utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.). El test-t fue utilizado para determinar las diferencias entre las cepas salvajes *WB/1267* (grupo control) y las células transgénicas *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-glenth*. La significancia estadística se delimitó en un valor de $p < 0.05$. Los datos se representan como media \pm error estándar de la media.

6.7 GENERACIÓN DEL ANTICUERPO POLICLONAL (ACP) ANTI-CLATRINA (GLCHC) EN *GIARDIA LAMBLIA*

6.7.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Ratones hembras púberes de la cepa *BALB/c* (de edad entre 10–12 semanas) fueron provistos desde la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de La Plata y crecidos en el bioterio del Instituto Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET). Los animales se mantuvieron controlados y fueron inspeccionados y aprobados por la Dirección Nacional de Sanidad Animal (SENASA).

6.7.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Tx/6xHis- GLCHC

La producción de la proteína recombinante Tx/6xHis-*GLCHC* se llevó a cabo amplificando el fragmento que codifica para la región N-terminal de la cadena pesada de clatrina (*GLCHC*: del inglés *Giardia lamblia* *Clathrin Heavy Chain*) en *Giardia* (desde el aminoácido 1 hasta el 404) y se clonó en el vector de expresión pET-32a-m (Novagen), fusionado a un tag doble de tiorredoxina y 6xHis (Tx/6xHis) en su extremo N-terminal (FIG. 6.4).

La proteína de fusión Tx/6xHis-*GLCHC* se expresó en bacterias de la cepa *BL21* (pLysS) de *Escherichia coli*. La síntesis de la proteína recombinante fue inducida por la adición de 0,5 mM de isopropyl-b-Dthiogalactopyranoside (IPTG) por 3 hs a 25°C. Posteriormente, se purificó utilizando columnas de Ni-agarosa (Qiagen, Valencia, CA) y se dializó en membranas de diálisis (MCWO: 10000, punto de corte de peso molecular nominal), con el objetivo de eliminar contaminantes que pudieran tener efecto en la generación de los anticuerpos (Pierce, Rockford IL, US). Las fracciones de proteína *GLCHC* recombinante eluídas se separaron en geles de 12% *SDS-PAGE* y se visualizaron por tinción de azul de Coomassie [80 mg de azul de Coomassie (CBB R 250) y 35 mM HCl en 1 L de agua destilada (dH2O)].

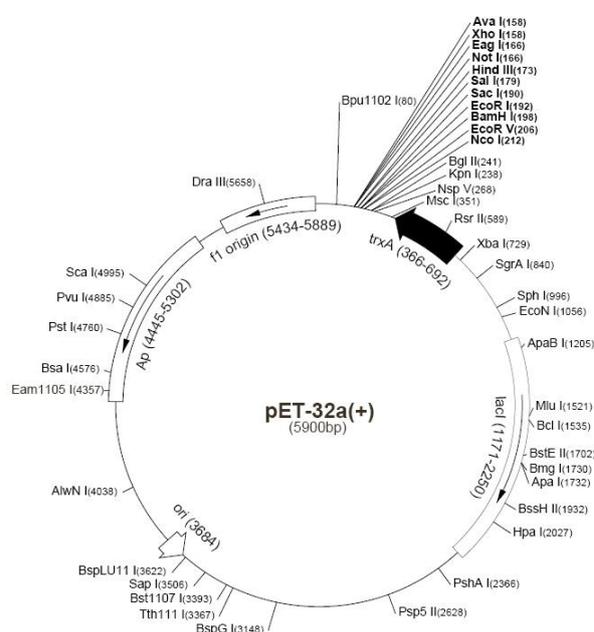


FIGURA 6.4: VECTOR PET-32A. El vector posee promotor T7. Se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, para clonar la proteína de fusión Tx/6xHis-*GLCHC*.

6.7.3 INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DEL AC POLICLONAL

Tres ratones de la cepa *BALB/c* fueron inmunizados con 100 µg/mL de la proteína recombinante Tx/6xHis-G/CHC, emulsionado con el adyuvante *TiterMax®Gold* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) (1:1). Se realizaron tres inmunizaciones por vía subcutánea y un desafío por medio de la vía endovenosa, inyectando sólo el antígeno. Previo a las inmunizaciones y luego de cada una de ellas, se extrajo sangre endovenosa de cada ratón que se incubó por 1 h a 37°C y se centrifugó a 500 x g durante 10 min para obtener el suero, que fue conservado a -20°C hasta su uso. Para comprobar si los ratones habían sido inmunizados, se verificó la producción de anticuerpos policlonales (presentes en el suero) por ensayos de inmunotransferencia, dot-blot e IF.

6.8 INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Los trofozoítos se lavaron con *PBSm* (*PBS* 1X + medio de crecimiento al 1%, pH 7,4) y se colocaron sobre portaobjeto, previamente tratados con poli-L-lisina, para permitir la adherencia de las células a 37°C, en cámara húmeda. Después de la fijación con formaldehído al 4% durante 40 min a temperatura ambiente, las células se lavaron y se bloquearon con *PBS* 1X conteniendo 10% de suero normal de cabra (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) y Triton X-100 al 0,1%. A continuación, las células fueron incubadas con anticuerpos específicos diluidos en solución de Ac (*PBS* 1X conteniendo 3% de suero normal de cabra y Tritón-X100 al 0,1%), seguido de incubación con Ac secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón) conjugado a Alexa 488, Alexa 555, FITC o Texas red. (TABLA 6.6). Por último, las preparaciones se lavaron y se montaron en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, US). La marcación fluorescente se visualizó a través de un microscopio confocal Olympus FV1000 motorizado (Olympus UK Ltd, Reino Unido), utilizando objetivos de inmersión en aceite (NA 1,32) 63X o 100X. Los fluorocromos se excitaron usando un láser de argón a 488 nm y un láser de criptón a 568 nm. El compuesto diamidino-2-phenylindole (DAPI) se visualizó mediante excitación con luz ultravioleta utilizando un láser de argón 364 nm. Las hendiduras de detección fueron configuradas para reducir al mínimo cualquier cruce de señal entre los canales. Las imágenes de contraste diferencial de interferencia (DIC) se recogieron simultáneamente con las imágenes de fluorescencia. Finalmente, las imágenes fueron procesadas utilizando los programas ImageJ y Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems). Las imágenes de epifluorescencia se observaron con un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 35M), utilizando un objetivo de inmersión en aceite 100X (Carl Zeiss) equipado con epifluorescencia y contraste diferencial de interferencia (DIC) y fueron capturadas a través de microscopía de fluorescencia regular mediante una cámara intensificada por tubo de silicio (SIT-C2400; Hamamatsu Phototonics, Bridgewater, NJ). Por último, las imágenes fueron digitalizadas

directamente en el programa para procesamiento de imágenes Metamorph/MetaFluor (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, US). Para los análisis cuantitativos, las imágenes fueron expuestas y procesadas idénticamente. Al menos 200-400 células que expresaron cada tipo de proteína fueron examinadas. Los datos fueron estadísticamente evaluados utilizando test t de *Student*.

TABLA 6.6: ANTICUERPOS UTILIZADOS EN ENSAYOS DE IF E INMUNOTRANSFERENCIA

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Casa Comercial
Anti-HA	Monoclonal de ratón	1:300	Sigma (St Louis, MO, US)
Anti-HA FITC	Monoclonal de ratón	1:100	Sigma (St Louis, MO, US)
AlexaFluor-488	Monoclonal de ratón	1:500	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
AlexaFluor- 555	Monoclonal de conejo	1:500	Molecular Probes Eugene, Oregon, US
Tx-red	Monoclonal de ratón	1:500	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
FITC	Policlonal de ratón	1:200	Cappel Laboratories
9C9	Monoclonal de ratón	1:200	Generado en el laboratorio
2F5	Monoclonal de ratón	1:200	Generado en el laboratorio
Anti-VSP1267	Monoclonal de ratón	1:100	Generado en el laboratorio
Anti- PI3,4,5P ₃	Monoclonal de ratón	1:50	Echelon Biosciences Incorporated
Anti- PI4P	Monoclonal de ratón	1:200	Echelon Biosciences Incorporated
Anti-HRP	Policlonal de ratón	1:1000	DakoCytomation
Anti-HA/HRP	Monoclonal de ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, US)

6.9 ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN CUANTITATIVO (QCA: DEL INGLÉS QUANTITATIVE COLOCALIZATION ANALYSIS)

El análisis cuantitativo de colocalización se realizó sobre imágenes obtenidas por inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando el paquete de procesamiento de imágenes Fiji (<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>). La señal de fondo se corrigió usando un valor de umbral para todos los canales de manera de corregir la señal completamente. Posteriormente, se examinó el coeficiente de correlación según *Manders* (M). Los valores de M están en el rango de 0 a 1,0. Si el análisis de la imagen arroja como resultado un coeficiente de correlación de 0,5, implica que en el 50% de los píxeles, hay solapamiento. Un valor de cero, significa que no hay píxeles superpuestos. Este coeficiente no es sensible a las limitaciones típicas de las imágenes de fluorescencia [234,235,236]. Se considera que hay colocalización en el rango de 0,6 a 1,0.

6.10 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Se utilizaron 10 µg de proteínas totales de lisados de parásitos en solución amortiguadora de muestra (SAM: Tris-HCl 0,5 M pH= 6,8; SDS 10%; azul de Bromofenol 0,5% y glicerol) en presencia o ausencia de β-mercaptoetanol 5 mM y se hirvieron por 10 min [237]. La separación de las proteínas se realizó en geles de Bis-Tris al 12% o 15%. La electroforesis fue realizada utilizando el sistema *BioRad Mini-Protean II*, a voltaje constante de 200 V.

6.11. INMUNOTRANSFERENCIA

La transferencia de proteínas desde los geles a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ ECL™, Little Chalfont, UK) se realizó a 15 V, por 1 h a temperatura ambiente (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) en tampón Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol al 20% [Towbin H. y col., 1979]. Finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con 3% de leche en polvo con bajo contenido graso (Molico, Nestlé®) y Tween 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US), en tampón TBS (del inglés *Tris Buffered Saline*) (solución amortiguadora de Tris-salino: 25 mM Tris; 150 mM NaCl) por 1 h en agitación, a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos IgG anti-HA en una dilución de 1:1000 y, luego de tres lavados con TBS-Tween 20, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón [Ig (H+L)-HRP] (Dako, Dinamarca) marcado con la enzima peroxidasa de rabano o HRP (del inglés *Horseradish peroxidase*). Luego de varios lavados en TBS-Tween 20 al 0,1%, las proteínas se visualizaron por autorradiografía con el sustrato *quimioluminiscente SuperSignal West Pico* (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, US.). Brevemente, 24 µL de luminol 1,25 mM y 4 µL de ácido cumárico 200 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) fueron agregados a la solución tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,6 e, inmediatamente antes de incorporar a la membrana, se añadieron 3 µL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Después de 1 min de incubación en oscuridad, la membrana escurrida fue cubierta con una lámina de plástico y una película de fotografía *Agfa Ortho CP-G Plus* (AGFA) fue expuesta por 2 min en un casete para autorradiografía. Finalmente, la película fue revelada entre 3 a 5 min hasta la aparición de bandas, fijada y lavada con agua. Los controles incluyeron la omisión del Ac primario, el uso de un Ac no relacionado, o ensayos con células no transfectadas.

6.12 ENSAYOS DE DOT-BLOT

Se tomaron 5 µl de homogenato de trofozoítos de *Giardia* o proteína recombinante y se mezclaron con igual cantidad de SAM. Las muestras así preparadas se sembraron en una placa de 96 pocillos con vacío, empleando como soporte una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ ECL™, Little Chalfont, UK). A continuación, la membrana fue incubada en solución

amortiguadora de bloqueo y, posteriormente, con los Acs primarios y secundarios, como se detalla en los ensayos de inmunotransferencia.

6.13 ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN CÉLULAS DE LEVADURAS (YTH)

El sistema de doble híbrido MATCHMAKER fue usado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Clontech). El vector de doble híbrido **pGADT7-Rec** (LEU2) (dominio activador de la transcripción de GAL4; AD) conteniendo el gen truncado *glΔenth* fue utilizado como señuelo, mientras que los genes *γAP-1*, *αAP-2*, *μAP-1*, *μAP-2*, *ubiquitina* (Ub) y los fragmentos del gen *glchc* (ver sección resultados) se insertaron en el vector **pGBKT7**(TRP1) (dominio de unión a GAL4 DNA; BD), produciendo los vectores **pglΔenth-AD** y **pγAP-1-BD**, **pαAP-2-BD**, **pμAP-1-BD**, **pμAP-2-BD**, **pUb-BD** y **pCHC1-BD**, **pCHC2-BD**, **pCHC3-BD**, **pCHC4-BD** y **pCHC5-BD**, respectivamente. Las células de levaduras AH109 transformadas fueron cultivadas a 30°C por 4–5 días en placas con medio mínimo careciendo de leucina y triptófano (-L/-T), para chequear la transformación positiva, o en ausencia de leucina, triptófano, e histidina (TDO, medio triple astringencia), para estudiar interacciones específicas entre las proteínas. Para valorar cualitativamente el grado de fuerza de las interacciones, las células se cultivaron en placas conteniendo medio mínimo carente de leucina, triptófano, histidina y adenina (QDO, medio quadruple astringencia), como se describió previamente [96]. Los controles de interacción incluyeron **pESCP-AD/pμ1-BD** (control de la interacción proteína-proteína) [72, 96] y la combinación de los vectores **pGBKT7/pglΔenth-AD** y **pGADT7/pglΔenth-BD** (control de autoactivación). Las secuencias de los cebadores empleados en el ensayo se incluyen en la **TABLA 6.7**.

TABLA 6.7: CEBADORES DISEÑADOS PARA LOS ENSAYOS DE YTH

Cebadores	Secuencia (5' → 3')
GIENThp YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> ATGCCTGCGAAGGAGAACATGCAG
GIENThp YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> AAAGAAGGACATGAGGTCGGC
GIΔENThp YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> ATGTCCGGGATAGGTGCCAACTTT
GIΔENThp YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> AAAGAAGGACATGAGGTCGGCTA
CHC1 YTH Fw	CATT <u>CATATG</u> GCCAGCGCCTTGTCTATTAAT
CHC1 YTH Rv	CATT <u>CCGGG</u> TCTTAACAAGCTCAGCAGCCTCGC
CHC2 YTH Fw	CATT <u>CATATG</u> TAGCTCCAGCAGGTGTCCTTCGCA
CHC2 YTH Rv	CATT <u>CCGGG</u> TCAAGAGTCTTTGAATCCAGCTGA
CHC3 YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> AATTGCAAAGGCTTGCCTGGAAACG
CHC3 YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> CTGGAGAGCCGTCGGCATTGGAACC
CHC4 YTH Fw	CATT <u>CCATGG</u> ACGCGCCGAGATCCTGAGTGCTGG
CHC4 YTH Rv	CATT <u>CCGGG</u> GCTGCACACTCCGAGCGTCCTCA
CHC5 YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> AGTGATTGCTATGGTGAGATCCTAC
CHC5 YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> GTGTTGTTGGGGTGCTTGCTGC
Ub YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> ATGCTCCTTAAAGTTCAAGTTGACG
Ub YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> GCCTCCCCTCAGGTTAACGACTAA
α AP-2 YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> ATGTCCAATATGAGGGGTCTCAAG
α AP-2 YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> CAGTGAAAGAAGATCGTTTAAGCC
μ AP-2 YTH Fw	GTT <u>CATATG</u> ATCAAGGCGGTCATTCTTTG
μ AP-2 YTH Rv	ATC <u>GGATCC</u> GCGCGGCCTGTAAACCCAATCTT
γ AP-1 YTH Fw	CATT <u>GAATTC</u> ATGGAGCTTAGCAACTTCATTTCGC
γ AP-1 YTH Rv	CATT <u>GGATCC</u> AAACACACACCTTGAACCTCAACGG
μ AP-1 YTH Fw	GTTA <u>CCATG</u> GTAAGCTCTCTGCTAATCATT
μ AP-1 YTH Rv	CAG <u>GAATTC</u> GTTGTCATAAAACACACCATCGT

Fw: sentido. Rv: antisentido. GAATTC: secuencia reconocida por *EcoRI*. GGATCC: secuencia reconocida por *BamHI*. CATATG: secuencia reconocida por *NdeI*. CCGGG: secuencia reconocida por *XmaI*. CCATGG: secuencia reconocida por *NcoI*. CCGGG: secuencia reconocida por *SmaI*.

6.14 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)

Los trofozoítos de *Giardia* fueron enfriados y lisados en solución tampón de lisis (50 mM Tris, pH 8; 120 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Tritón X-100 e inhibidor de proteasas) por 30 min en hielo y centrifugados a 13000 x g por 5 min a 4°C. El lisado celular se limpió utilizando perlas de proteína L-Agarosa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) por 30 min a 4°C y,

subsecuentemente, el sobrenadante fue sujeto a IP utilizando 300 μ l del Acp anti-*G1CHC* o anti-*Ub* (donado por el Dr. Moises Wasserman, Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia [166]) por 4 hs y posteriormente incubado toda la noche a 4°C con proteína L-Agarosa. Las perlas fueron lavadas cuatro veces con solución amortiguadora de lavado (50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl pH 8; 0,1% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas), centrifugadas a 700 x g, resuspendidas en solución SAM, y hervidas por 10 min para los ensayos de inmunotransferencia utilizando el Acm anti-HA conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US), tal como se describe en la SECCIÓN 6.11.

6.15 ENSAYO BIOQUÍMICO DE INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA (PIP STRIPS™)

Parásitos transgénicos *glenth* y *glenthk75a* fueron lisados y añadidos a la membrana de nitrocelulosa con lípidos adheridos (PIP Strip™, Echelon Biosciences Incorporated), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. En primer lugar, la membrana se bloqueó en *Tween 20* al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) y *BSA* (del inglés *Bovine Serum Albumin*) al 3% en tampón *PBS* por 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación, los trofozoítos transgénicos *glenth* y *glenthk75a* en fase logarítmica fueron enfriados y lisados en la solución de *Tween 20* al 0,1% y *BSA* al 3% en tampón *PBS* mediante sonicación suave, utilizando un sonicador Branson 250 (Branson, CT), aplicando 3 pulsos al 30% durante 10 seg, con descansos de 10 seg entre cada pulso, a 4°C. Luego, se agregaron los lisados a cada membrana de nitrocelulosa y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Después de 3 lavados de 10 min con *Tween 20* al 0,1% en tampón *PBS*, las proteínas *GIENTH*_p-HA y *GIENTH*_{k75A}p-HA fueron detectadas luego de la incubación con anti-HA marcado con HRP (dilución 1:1000 en *Tween 20* al 0,1% y *BSA* al 3% en tampón *PBS*). Finalmente, las membranas se revelaron por *quimioluminiscencia* tal como se describe más arriba, en la SECCIÓN 6.11. Se utilizó como control positivo el dominio PH de PLC- δ 1 con una etiqueta GST, el cual se une a $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$. Como control negativo, se utilizó el lisado de trofozoítos salvajes.

6.16 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Los trofozoítos transgénicos *glenth* y *glenthk75a* fueron crecidos hasta fase logarítmica y las células cosechadas como se describió anteriormente en la SECCIÓN 6.2. Luego, el precipitado celular se lavó dos veces en *PBS*, fue resuspendido en una solución tampón de lisis hipotónica fría (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, suplementado con inhibidores de proteasas) e incubado durante 5 min en hielo. A continuación, cada muestra se centrifugó en una microcentrífuga refrigerada a 16000 x g durante 10 min a 4°C. La fracción sedimentada se lavó una vez con tampón de lisis hipotónico frío, se resuspendió en SAM y, finalmente, se incubó durante 25 min en hielo, previo a la separación de las proteínas por SDS-PAGE. Cantidades equivalentes de las fracciones

citoplasmática (C) y unida a membrana (M) se analizaron por inmunotransferencia, como se describió anteriormente [159]. El software Gel-pro Analyzer 4.5 fue utilizado para obtener información cuantitativa de las bandas (Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD, USA). Se cuantificaron 5 membranas de cada muestra.

6.17 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PI3,4,5P₃ Y PI4P

6.17.1 ESTIMULACIÓN CELULAR

Trofozoítos en fase logarítmica se cosecharon y lavaron como se mencionó previamente (ver SECCIÓN 6.2) y se incubaron durante 15 min a 37°C en medio conteniendo la solución amortiguadora KRT (Tris-HC 0,025M pH 7,2; MgSO₄ 1,2x10⁻³M; CaCl₂ 2,6x10⁻³M; KCl 4,8x10⁻³M; NaCl 0,12M) suplementada con 15 mM de glucosa y albúmina al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US), en agitación suave, antes del estímulo, con el objetivo de estabilizar fisiológicamente a las células. Posteriormente, las células fueron estimuladas mediante la adición de bilis bovina al 0,62% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) en la solución amortiguadora KRT suplementada con 15 mM de glucosa y albúmina al 0,1% y se incubó por 15 min a 37°C en agitación suave. La estimulación se detuvo mediante la adición de KRT frío y centrifugación a 5000 g durante 5 min [40, 163; Gesumaria and Machado, comunicación personal].

6.17.2 DETECCIÓN DE PI3,4,5P₃ Y PI4P

Se utilizaron las células estimuladas, como se describió en la sección anterior, para detectar PI3,4,5P₃ y PI4P mediante ensayos de IF, como se describe en la SECCIÓN 6.8, excepto que, en este caso, la permeabilización de las células fue llevada a cabo con saponina al 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) en TBS, por 15 min a temperatura ambiente y que todas las soluciones se prepararon en la solución amortiguadora TBS. Se utilizaron los Ac comerciales anti-PI4P y anti-PI3,4,5P₃, tal como se describe en la TABLA 6.5. La señal de fluorescencia fue analizada y documentada por microscopía de fluorescencia convencional, utilizando un láser de argón 364 nm (Carl Zeiss Axiovert 35M) y capturado con una cámara de destino, intensificada a silicio (SIT-C2400; Hamamatsu Phototonics, Bridgewater, NJ).

6.18 ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE BODIPY-LDL EN CÉLULAS TRANSGÉNICAS

Se utilizó FITC-dextrano de 20.000 Da (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) y Bodipy-LDL (Molecular Probes, Invitrogen) como marcadores de endocitosis por fase fluida o mediada por receptor, respectivamente [73]. Así, los trofozoítos transfectados con los vectores pGIENThp-HA, pGIENTh_{K75A}p-HA o pds-GIENTh y trofozoítos salvajes WB/1267, fueron cultivados hasta alcanzar la fase logarítmica en medio de cultivo con suero deficiente en lipoproteínas (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, US) y se cosecharon y lavaron como se mencionó previamente en la SECCIÓN 6.2. Los experimentos de internalización se llevaron a cabo resuspendiendo los trofozoítos cosechados en un medio frío de marcado (glucosa 50 mM; cisteína 10 mM; ácido ascórbico 2 mM, en la solución amortiguadora PBS a pH 7,1) conteniendo 2 mg/ml de FITC-dextrano o 7,5 µg de Bodipy-LDL. Las muestras se incubaron a 4°C por 30 min (situación que normalmente inhibe la endocitosis mediada por receptor) y, posteriormente, las células fueron lavadas con PBSm y transferidas a 37°C por 30 min para restaurar la endocitosis. Las células se colectaron por centrifugación a 2500 x rpm por 5 min a 4°C, se lavaron con PBSm frío y se visualizaron por microscopía de fluorescencia, utilizando un microscopio confocal de disco giratorio, debido a que permite obtener imágenes de alta calidad cuando se trabaja con células vivas, ya que posee una rápida velocidad de adquisición y mínima fotoexcitación [microscopio Olympus Spinning Disk (DSU), objetivo Olympus UApO 150X 1.45 AN y cámara Andor IXON 3 x-8677 ccd 201-20-1-122]. Los controles de este experimento incluyen la adición de FITC-dextrano o Bodipy-LDL, marcador de endocitosis de fase fluida o de endocitosis mediada por receptor, respectivamente, a los trofozoítos de tipo salvaje y a las células *ds-enth* no inducidas con Tet. La cantidad de células que mostraron localización del colorante fluorescente en las PVs se cuantificaron en cada una de las muestras como un porcentaje del total de las células presentes. El paquete de procesamiento de imágenes Fiji (<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>) se utilizó para analizar las imágenes fluorescentes. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software R (<http://www.r-project.org>). Los datos se expresaron en porcentaje de células con las PVs marcadas en relación a todas las células contadas. Todas las imágenes se procesaron de la misma manera. Se muestra el efecto más representativo en cada tipo de células.

6.19 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ÁCIDA ENDÓGENA MEDIANTE EL EMPLEO DEL SUSTRATO ELF 97

Para probar la actividad de fosfatasa ácida se empleó el sustrato ELF 97 [2-(5-cloro-2-fosforiloxifenilo)-6-cloro-4-(3H) quinazolinona (CPPCQ)] (Molecular Probes, Eugene, OR, US), siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor [175]. Se probaron diferentes concentraciones de ELF 97 y tiempos de incubación; siendo las condiciones más apropiadas una concentración de 20 µM y una incubación de 15 min. Los trofozoítos salvajes *WB/1267* y los transgénicos *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-glenth* fueron incubados con el sustrato ELF 97 en tampón de acetato 110 mM (pH 5,5), que contiene 1,1 mM de nitrito de sodio. Para la tinción de ELF 97 no es necesario permeabilizar la membrana celular. La señal de fluorescencia fue analizada y documentada como se mencionó anteriormente en la SECCIÓN 6.27.2. Para las mediciones cuantitativas de fluorescencia de ELF 97, se utilizó el paquete de procesamiento de imágenes de Fiji

(<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>). Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software R (<http://www.r-project.org>). Se evaluaron al menos 50 células por condición y los experimentos se repitieron 3 veces.

6.20 INMUNO-ELECTRO MICROSCOPIA (IEM)

Para preservar la organización celular, los trofozoítos salvajes *WB/1267* y los transgénicos *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-glenth*, se fijaron *in situ* usando 2,5% de glutaraldehído y 4% de formaldehído en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2. Luego, las células se rasparon de la pared del tubo con espátula de goma, se lavaron en la solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2 y se fijaron nuevamente por 60 min a 4°C con una solución que contenía tetróxido de osmio al 1% y ferrocianuro de potasio al 0,8% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, las células se lavaron utilizando la misma solución amortiguadora, se deshidrataron en soluciones de acetona de concentraciones crecientes y se incluyeron en resina Epon. Las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, se observaron en un microscopio electrónico Zeiss 109. Todas las imágenes de IEM disponibles fueron cuantificadas. Este experimento se realizó en colaboración con la Dra. Adriana Lanfredi Rangel (Unidade de Microscopia Eletrônica, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brasil).

6.21 CURVAS DE CRECIMIENTO

Se inocularon tubos de borosilicato de 7 mL conteniendo medio de crecimiento sin puromicina con $1,8 \times 10^5$ trofozoítos tomados de cultivos en fase logarítmica de la cepa salvaje y de las líneas *glenth-ha*, *glenthk75a* y *ds-glenth*. Para testear el efecto de la Tetraciclina y el efecto en el crecimiento luego de la depleción de GIENTHp, se adicionó Tet (10 µg/mL, concentración final) a cultivos de células *WB/1267* y *ds-glenth*. Se decantó el medio cada 12 hs y se enfriaron los tubos 20 min en hielo para despegar los trofozoítos vivos adheridos a la pared del tubo. El número de células viables se determinó por conteo en hemocitómetro. La comparación de las medias se realizó a través del test-t de *Student* para muestras independientes (the Independent-Samples Student's t-test)

6.22 INHIBICIÓN DE LA FOSFATIDIL INOSITOL- 3- QUINASA (PI3K)

Los trofozoítos salvajes *WB/1267* y los transgénicos *glenth-ha* y *glenthk75a*, se crecieron durante 48 hs previo al tratamiento con el inhibidor de la enzima fosfoinositol 3 quinasa, LY294002 (del inglés 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Las células fueron tratadas durante toda la noche con diferentes concentraciones de LY294002 (diluido en DMSO). Luego de las 48 hs, utilizando una concentración

de 30 μM de LY294002, se observó una cantidad significativa de células sanas, por lo que se decidió trabajar con esta cantidad del inhibidor [181]. Como control, se trató a las células con los mismos volúmenes de DMSO. Luego de la inhibición, los trofozoítos fueron fijados con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) y se realizaron ensayos de IF y microscopía confocal, como fue detallado anteriormente (ver **SECCIÓN 6.8**). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

CAPÍTULO 3:

6.23 CEPAS Y VECTORES

Las cepas y los vectores utilizados en esta tesis se detallan en las **TABLA 6.8/9**, respectivamente.

TABLA 6.8: CEPAS DE *S. CEREVISIAE* UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
SEY6210	MAT α his3- Δ 200 trp1- Δ 901 leu2-3 ura3-52 lys2-801 suc2- Δ 9	Lab. Wendland
SEY6210a	MATa his3- Δ 200 trp1- Δ 901 leu2-3 ura3-52 lys2-801 suc2- Δ 9	Lab. Wendland
BWY1170	SEY6210;ent1::HIS3ent2::HIS3 + pBW0768	Lab. Wendland
BWY2858	SEY6210; Ste3-GFP::KAN	Lab. Wendland
BWY5908 (MD256)	SEY6210; ent3::TRP1ent5::TRP1	Lab. Duncan
BWY2776	SEY6210; ABP1-GFP::G418	Lab. Wendland
BWY2784	SEY6210; ent1 Δ ::LEU2 ent2 Δ ::HIS3 yap1801 Δ ::HIS3 yap1802 Δ ::LEU2, ABP1-GFP(G418)+pBW0778 ENTH1.414 (TRP)	Lab. Wendland
MATa supersensibles	MATa ura3-52, leu2-3, 112 his3-D200 trp1-D901 lys2-801 suc2-D9 GAL-MEL, sst1D::LYS	Lab. Wendland

TABLA 6.9: VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

VECTOR	DESCRIPCIÓN	DETALLE	FUENTE
pBW0279	pENT1 (<i>URA3</i>)	pMET25.426::ENT1(<i>URA3</i>)	Lab. Wendland
pBW0768	pENT1(<i>TRP1</i>)	pRS.414::ENT1(<i>TRP1</i>)	Lab. Wendland
pBW0778	pENTH1(<i>TRP1</i>)	pRS.414::ENTH1(<i>TRP1</i>)	Lab. Wendland
pBW2715	pGIENThp- mCherry (<i>HIS3</i>)	pMET25.423::GIENThp- mCherry (<i>HIS3</i>)	Esta Tesis
pBW2701	pGIENThp-mCherry (<i>URA3</i>)	pMET25.426::GIENThp- mCherry (<i>URA3</i>)	Esta Tesis
pBW2703	pgENTH-mCherry (<i>URA3</i>)	pMET25.426::gENTH-mCherry (<i>URA3</i>)	Esta Tesis
pBW2720	pGIENThN107Y- mCherry(<i>URA3</i>)	pMET25.426::GIENThN107Yp- mCherry (<i>URA3</i>)	Esta Tesis
pBW2721	pgENTHn107Y-mCherry (<i>URA3</i>)	pMET25.426::gENTHn107Y- mCherry (<i>URA3</i>)	Esta Tesis
pBW0405	pGFP-CPS1 (<i>URA3</i>)	pRS416::GFP-CPS1(<i>URA3</i>)	Lab. Wendland
pBW2713	pENT5 (<i>URA3</i>)	pRS316::ENT5(<i>URA3</i>)	Lab. Duncan
pBW2712	pENT5(<i>LEU2</i>)	pRS315::ENT5(<i>LEU2</i>)	Lab. Duncan

Las cepas de levadura fueron crecidas en medio estándar YPD (del inglés *Yeast Extract Peptone Dextrose*), que contiene extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y dextrosa al 2% (Difco, Detroit, MI), o en medio sintético YNB (del inglés *Yeast Nitrogen Base*), base nitrogenada de levadura suplementada con aminoácido y dextrosa al 2%, con los aminoácidos requeridos para mantener los vectores a 30°C durante 3 o 4 días, dependiendo de cada cepa. Para ensayos con cultivos líquidos, se inocularon 10^5 células en 10 ml de medio selectivo, se incubaron a 30°C por 48 hs y se midió la DO a 600 nm en un espectrofotómetro (PerkinElmer, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Artisan Technology Group).

Los vectores pMET25.423 (pUG34) y pMET25.426 (pUG36) (Fig. 6.5), utilizados en este estudio, contienen secuencias de vectores bacterianos, previstas para su amplificación y manejo en *E. coli*, además de secuencias específicas para levaduras. Estos vectores fueron diseñados y producidos basados en el círculo de 2 μ de levadura: se aprovecha de un plásmido natural de *S. cerevisiae*, conocido simplemente como círculo de 2 μ (por su tamaño). Éstos se encuentran en unas 50 a 100 copias en el núcleo, constituyendo una especie de minicromosoma estable [238].

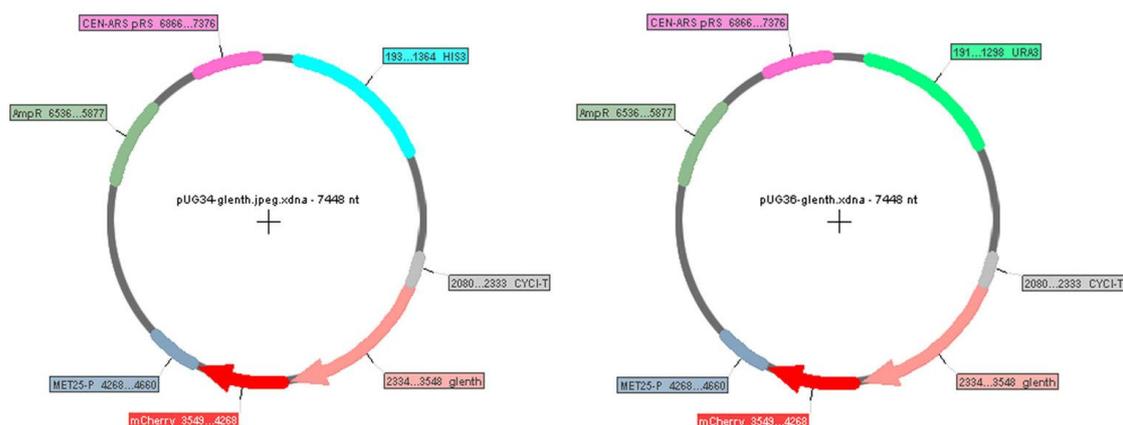


FIGURA 6.5: PLÁSMIDOS PARA SOBRE-EXPRESAR GLENTHP EN LEVADURAS. Se muestra la representación esquemática de los vectores **pGIENTHP-mCherry(*HIS3*)** a la izquierda y **pGIENTHP-mCherry(*TRP1*)** a la derecha, en los cuales el gen *glenTh* (en rosa en el esquema) se clonó por recombinación homóloga en los plásmidos **pMET25.423(pUG34)** y **pMET25.426(pUG36)**, respectivamente. Ambos son vectores de expresión de alta copia, presentan el origen de replicación de un plásmido natural de *S. cerevisiae* (círculo de 2 μ) y una secuencia promotora *MET25* (en azul). La proteína de fusión generada posee una etiqueta mCherry en el C-terminal (mCherry se muestra en rojo) y otra de 6xHis en el N-terminal (no se muestra en este dibujo). Además, el vector **pUG34** posee como marcador *HIS3* (en celeste brillante), mientras que **pUG36** presenta *URA3* (en verde brillante), que codifican para genes necesarios para la síntesis de histidina o uracilo, por lo que la presencia del plásmido le permitirá a las levaduras transformadas crecer en medios axótrofos para *HIS3* y *URA3*, respectivamente.

6.24 EXPRESIÓN DE GLENTHP EN CÉLULAS DE LEVADURAS

Los vectores utilizados en este trabajo fueron construidos amplificando el gen *glenTh* completo (o solo el dominio ENTH) desde el vector **pGIENTHP-HA** (ver M & M SECCIÓN 6.3.9) y clonado por recombinación homóloga en levaduras, en el vector multicopia *HIS3* o *URA3* bajo el promotor *MET25*. La recombinación homóloga se llevó a cabo entre el plásmido **pMET25.423** o **pMET25.426** y el producto amplificado por PCR. En primer lugar, para clonar el gen *glenTh* en estos vectores se diseñaron cebadores específicos (ver TABLA 6.10), los cuales contienen en un extremo 24 pb correspondiente a la secuencia que posee homología con el vector **pMET25.423** (en gris en la TABLA 6.10), seguida de una secuencia de 24 pb correspondientes a *glenTh* 423 (en rosa). En el caso del cebador sentido, entre las dos secuencias se ubican los pares de bases correspondientes a la etiqueta de 6xHis (en naranja). Paralelamente a la amplificación de *glenTh* a través de PCR (tal como fue descrito en la SECCIÓN 6.3.1), los vectores **pMET25.423** o **pMET25.426** se linealizaron con 2,5 μ l del Buffer 4 al 10X + 2,5 μ l de BSA al 10X + 1 μ l *EcoRI* + 1 μ l *XmaI* + 7,5 μ l H₂O durante 3 hs a 37°C. Luego, el producto de PCR y los vectores mediante

electroforesis en geles de agarosa, como se describió en la SECCIÓN 6.3.1. Finalmente, se procedió a transformar las levaduras con el inserto y vector lineal, para que tenga lugar la recombinación homóloga entre ellos, tal como se ilustra en la FIGURA 6.6.

TABLA 6.10: SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA EXPRESAR GLENTHP O GENTH EN LEVADURAS

Cebadores	Secuencia (5'→3')
GIENTHpMET25Fw	TCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGATGCATCATCATCATCACCTGCGAAGGAGAACATGCAGAAC
GIENTHpMET25Rv	ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCAAAGAAGGACATGAGGTCTGGCTAT
gENTHMET25Rv	ATC GATAAGCTTGATATCGAATTCGGCATACTTTGACGTGTATCTGC

Fw: sentido. **Rv:** antisentido. En gris se representa la secuencia que posee homología con el vector. En rosa las 24 pb correspondientes a la secuencia de GLENTHP. Con naranja, se representa la etiqueta de histidina.

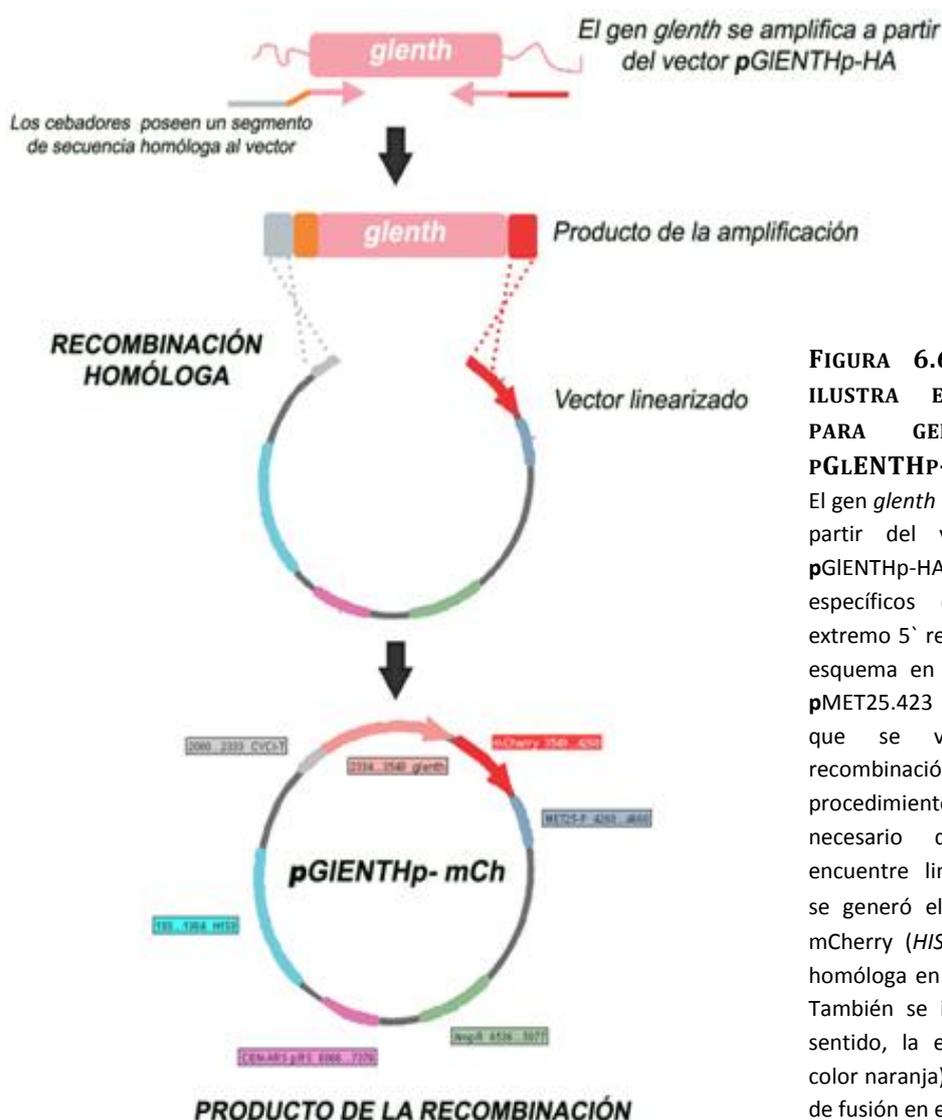


FIGURA 6.6: DIAGRAMA QUE ILUSTRAS EL PROCEDIMIENTO PARA GENERAR EL VECTOR PGLENTHP- MCHERRY (HIS3). El gen *glenth* (en rosa) se amplificó a partir del vector de expresión pGIENTHP-HA, utilizando cebadores específicos que poseen en el extremo 5' regiones idénticas (en el esquema en gris y rojo) al vector pMET25.423 (pUG34), con el cual se va a producir la recombinación. Para que este procedimiento tenga lugar es necesario que el vector se encuentre linealizado. Finalmente, se generó el plásmido pGIENTHP-mCherry (*HIS3*) por recombinación homóloga en las levaduras salvajes. También se ilustra, en el cebador sentido, la etiqueta de 6xHis (en color naranja) que posee la proteína de fusión en el extremo N-terminal.

La sustitución de aminoácidos puntuales, también se realizó como se describió en la **SECCIÓN 6.3.2**, empleando QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Todas las enzimas de restricción utilizadas son de New England Biolabs (Ipswich, MA). En todos los casos, las levaduras se transformaron con el método Acetato de Litio (LiAc), siguiendo las instrucciones del manual para levaduras de Clontech. Brevemente, luego del tratamiento de las células con 0,1 M de LiAc-TE [se prepara al momento de usar, mezclando: 0,5 ml de Tampón TE 10X (Tris-HCl 0,1M y EDTA 10 mM a pH 7,5) con 0,5 mL de LiAc 1 M a pH 7,5 en 4 mL de agua destilada], para lograr la permeabilización de la pared celular, se adicionaron: 10 μ L de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml), 5 μ L del plásmido a transformar y 50 μ L de la suspensión de células. A continuación, se añadieron 300 μ L ml de solución PEG estéril recién preparada mezclando: 1,5 mL de tampón TE 10X con 1,5 ML de Acetato de litio 1 M pH 7,5, más 12 mL de Polietilenglicol 4000 al 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Luego, las células se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, en agitación. Al día siguiente, las células transformadas se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 seg y, luego de eliminar el sobrenadante, se distribuyeron en placas conteniendo los medios selectivos necesarios para casa caso. El crecimiento de las levaduras transformadas se evaluó luego de incubar las placas por 3 días a 30°C, mediante la observación al microscopio de colonias con células fluorescentes rojas. Una vez confirmadas las transformaciones, se rescataron los vectores de las levaduras. Este procedimiento involucra la selección de una colonia positiva que luego se replica y se deja crecer durante toda la noche a 30°C en medio sólido y con la selección adecuada. Al día siguiente, las células presentes en la placa de cultivo se resuspendieron en 250 μ L de solución A [sorbitol al 1M, citrato de sodio al 0,1 M y EDTA al 60 mM + β mercaptoetanol al 1% + la enzima Zymolysasa a una concentración final de 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)], para romper la pared celular de la levadura, y se las incubó a 37°C por 2 hs. A continuación, se centrifugaron las células a 6000 rpm por 3 min, se extrajo el sobrenadante y se continuó la extracción del plásmido de la misma manera como se procede con bacterias (**SECCIÓN 6.3.9**). Una vez que el vector fue rescatado de las células de levadura, se utilizó para transformar bacterias *XL-Blue*, tal como se detalla en la **SECCIÓN 6.3.7**, y, finalmente, la cantidad adecuada de vector purificado fue utilizada para transformar levaduras salvajes SEY6210, siguiendo el método del LiAc descripto más arriba.

6.25 ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN FENOTÍPICA EN CÉLULAS LETALES

Las células *ent1 Δ ent2 Δ* , que expresan Ent1 desde un vector que contiene un marcador de auxotrofia (*TRP1*), fue utilizado parar realizar la contra-selección utilizando la resistencia al ácido 5-fluoroantranílico o 5-FAA (del inglés *5-Fluoroanthranilic Acid Resistance*). Esto ocurre debido a que el triptófano se sintetiza en levaduras en cinco pasos. Por lo tanto, son empleadas cinco

enzimas, *trp1-5*, y en una de las etapas intermedias se produce el antranilato, que es el punto de contacto para el veneno metabólico 5-FAA. Debido a que este compuesto adquiere la toxicidad sólo después de que el antranilato esté completamente transformado enzimáticamente, es que el 5-FAA no actúa tóxicamente en las levaduras auxótrofas para este aminoácido. Así, las dobles mutantes [*ent1Δent2Δ+pENT1(TRP1)*] fueron transformadas con los siguientes vectores: *i)* *pENT1(URA3)*, como control positivo, *ii)* *pGIENTHp-mCherry(URA3)*, *iii)* *pgENTH-mCherry(URA3)*, que contiene sólo el dominio de ENTH *Giardia*, o *iv)* *pMET5.426* vacío, como control negativo. Las transformaciones se seleccionaron en placas YNB-*URA3* a 30°C durante 3 días. Además, para confirmar la complementación, las transformantes fueron crecidas en placas conteniendo el compuesto tóxico 5-FAA, que induce a las células a perder el plásmido que poseía el marcador *TRP1(pENT1)*. Los resultados fueron analizados de la siguiente manera: Si el segundo plásmido [*pGIENTHp-mCherry(URA3)* o *pgENTH-mCherry(URA3)*] complementa la letalidad, crecerán las colonias en las placas con 5-FAA, mientras que si no lo hacen, se debe a que la proteína en estudio no es capaz de llevar a cabo un rol similar a Ent1/2 en *S. cerevisiae*.

6.26 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL MOTIVO ENTH

Las secuencia de aminoácidos del dominio ENTH de *Saccharomyces cerevisiae* (Ent1¹⁻¹⁶⁰ and Ent2¹⁻¹⁶⁰, número de acceso de la proteína: NP_010120 y NP_013307, respectivamente) y *Giardia lamblia* (GIENTHp¹⁻¹⁶⁰, GenBank.: GL50803_3256), se alinearon utilizando CLUSTAL 2.1 program [220].

6.27 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES PARA SDS-PAGE E

INMUNOTRANSFERENCIA

Dependiendo de cada experimento, las células SEY6210 *MATα*; SEY6210*MATα*+GIENTHp-mCh; *Δ1Δ2*+GIENTHp-mCh; *Δ1Δ2*+gENTH-mCh; *Δ1Δ2*+Ent1; *Δ1Δ2*; *Δ3Δ5*; *Δ3Δ5*+gENTH-mCh; *Δ1Δ2*+Ent5; Ste3-GFP+vector vacío; Ste3-GFP+GIENTHp-mCh; Abp1-GFP+vector vacío; Abp1-GFP+GIENTHp-mCh, se cultivaron hasta la fase logarítmica media y se lavaron en PBS, antes de la suspensión en tampón de Laemmli que contenía 6 M de urea. Las células se lisaron mediante la molienda con perlas de vidrio de 0,4-0,6 y las proteínas se resolvieron a continuación por SDS-PAGE y se detectaron por inmunotransferencia utilizando un Ac anti-mCherry producido en conejo, tal como se mencionó anteriormente en la Sección 6.11.

6.28 ENSAYOS DE TRANSPORTE DE PROTEÍNAS Y MICROSCOPIA

CÉLULAS UTILIZADAS:

Para evaluar la localización de GIENThp en *S. cerevisiae*, células salvajes (SEY6210) se transformaron con el vector **pGIENThp-mCherry** (*URA3*).

Para estudiar la localización de GFP-Cps1, las células mutantes *ent3Δent5Δ* fueron co-transformadas con las siguientes combinaciones de vectores: *i*) **pGFP-Cps1** (*URA3*) y **pMET25.423** vacío, *ii*) **pGFP-Cps1**(*URA3*) y **pGIENThp-mCherry**(*HIS3*) o *iii*) **pGFP-Cps1**(*URA3*) y **pENT5**(*HIS3*) (control positivo, que rescata el defecto). Se utilizaron como control células salvajes transformadas con **pGFP-Cps1** (*URA3*). El mismo procedimiento se utilizó para transformar células salvajes con **pGIENThp-mCherry** (*URA3*) y **pMET25.426** vacío, para evaluar si GIENThp estaba actuando como una proteína no-funcional de epsinaR en levaduras.

Para evaluar si GIENThp inhibe la función de Ent1/2 actuando como una proteína dominante negativa de epsina clásica, se estudió la localización de Ste3. Para esto se utilizó la cepa BWY2858 (Ste3-GFP) la cual posee la etiqueta GFP integrada en el genoma en el *loci* de Ste3 en la región C-terminal. Estas células fueron transformadas con el vector **pMET25.426** (*URA3*) vacío o con **pGIENThp-mCherry** (*URA3*).

Para continuar en el estudio de GIENThp como una proteína no funcional de Ent1/2, se analizó el citoesqueleto de actina, utilizando la cepa BWY2776 (Abp1-GFP), en la cual GFP fue integrada en el genoma en el *loci* de Abp1 en el extremo C-terminal. Las células expresando Abp1-GFP, fueron transformadas con el vector **pMET25.426** (*URA3*) vacío o con **pGIENThp-mCherry**(*URA3*). La cepa BWY2784 [*ent1Δ ent2Δyap1801Δ yap1802Δ*, ABP1-GFP (G418)+**pBW0778 ENTH1.414** (*TRP1*)] se utilizó como control positivo.

En todos los casos, las células se crecieron en medio sintético carente de uracilo (YNB-*URA3*), de histidina (YNB-*HIS3*) o de triptófano (YNB-*TRP1*), para mantener la viabilidad en la cepa BWY2784. Luego, las células se crecieron hasta fase logarítmica, previo al análisis de la fluorescencia.

FLUORESCENCIA:

Para las imágenes con células vivas, las células transformadas fueron crecidas hasta fase logarítmica temprana, en placas con medio de cultivo selectivo a 30°C. Luego, 2 μ l de medio mínimo conteniendo las células transformadas se colocaron en un cubreobjetos de vidrio sin recubrimiento y se invirtieron en un portaobjetos de vidrio. Todas las imágenes se tomaron a temperatura ambiente. Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio invertido (Carl Zeiss) equipado con una cámara Cooke Sensicam (Cooke), un sistema de iluminación fluorescente

X-Cite 120 PC, a 100× y con una apertura numérica de 1.4, utilizando lentes de inmersión con aceite Plan-Apochromat y el programa SlideBook 4.2. Todas las imágenes fueron capturadas utilizando idénticas condiciones de exposición.

6.29 ENSAYO DEL FACTOR α

Este ensayo se realizó para evaluar la función de GIENThp como una proteína del tipo epsinaR y como una proteína no-funcional de Ent3/5 en levaduras, siguiendo el protocolo descrito por otros autores [3,239]. Brevemente, colonias aisladas de cepas salvajes SEY6210 o la mutante $\Delta ent3\Delta ent5$ conteniendo los plásmidos de interés, se resuspendieron en medio de cultivo YPD, se diluyeron a una DO_{600}/ml de 0,5 y se depositaron en forma de gota (5 μl) sobre una placa de YPD conteniendo un césped de células supersensibles al factor α (células *MATa* supersensibles : *MATa* *ura3-52*, *leu2-3*, *112* *his3-D200* *trp1-D901* *lys2-801* *suc2-D9* *GAL-MEL*, *sst1D::LYS*). Como control positivo se utilizaron las células salvajes *MATa* y como control negativo las células *MATa*. Las células que se analizaron fueron la cepa mutante $\Delta ent3\Delta ent5$ con las siguientes combinaciones de vectores: *i*) *pMET25.426 (URA3)* vacío, *ii*) *pGIENThp-mCherry (URA3)* y *iii*) *pENT5 (URA3)*; o las salvajes con *i*) *pMET25.426 (URA3)* vacío y *ii*) *pGIENThp-mCherry (URA3)*.

Las placas se incubaron a 30°C toda la noche y se fotografiaron. Este experimento se repitió 3 veces con resultados equivalentes.

CAPÍTULO 7:

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. KATZMANN, D.J., G. ODORIZZI, AND S.D. EMR, *RECEPTOR DOWNREGULATION AND MULTIVESICULAR-BODY SORTING*. NAT REV MOL CELL BIOL, 2002. 3(12): p. 893-905.
2. LEGENDRE-GUILLEMIN, V., ET AL., *ENTH/ANTH PROTEINS AND CLATHRIN-MEDIATED MEMBRANE BUDDING*. J CELL SCI, 2004. 117(Pt 1): p. 9-18.
3. MICHAELIS, S. AND I. HERSKOWITZ, *THE A-FACTOR PHEROMONE OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE IS ESSENTIAL FOR MATING*. MOL CELL BIOL, 1988. 8(3): p. 1309-18.
4. MUNRO, S., *ORGANELLE IDENTITY AND THE ORGANIZATION OF MEMBRANE TRAFFIC*. NAT CELL BIOL, 2004. 6(6): p. 469-72.
5. PERRET, E., ET AL., *EVOLVING ENDOSOMES: HOW MANY VARIETIES AND WHY?* CURR OPIN CELL BIOL, 2005. 17(4): p. 423-34.
6. VAN MEEL, E. AND J. KLUMPERMAN, *IMAGING AND IMAGINATION: UNDERSTANDING THE ENDO-LYSOSOMAL SYSTEM*. HISTOCHEM CELL BIOL, 2008. 129(3): p. 253-66.
7. SOGIN, M.L., ET AL., *PHYLOGENETIC MEANING OF THE KINGDOM CONCEPT: AN UNUSUAL RIBOSOMAL RNA FROM GIARDIA LAMBLIA*. SCIENCE, 1989. 243(4887): p. 75-7.
8. FEELY, D.E. AND S.L. ERLANDSEN, *ISOLATION AND PURIFICATION OF GIARDIA TROPHOZOITES FROM RAT INTESTINE*. J PARASITOL, 1981. 67(1): p. 59-64.
9. CAVALIER-SMITH, T., *THE EXCAVATE PROTOZOAN PHYLA METAMONADA GRASSE EMEND. (ANAEROMONADEA, PARABASALIA, CARPEDIEMONAS, EOPHARYNGIA) AND LOUKOZOA EMEND. (JAKOBEA, MALAWIMONAS): THEIR EVOLUTIONARY AFFINITIES AND NEW HIGHER TAXA*. INT J SYST EVOL MICROBIOL, 2003. 53(Pt 6): p. 1741-58.
10. SOGIN, M.L. AND J.C. EDMAN, *A SELF-SPLICING INTRON IN THE SMALL SUBUNIT RRNA GENE OF PNEUMOCYSTIS CARINII*. NUCLEIC ACIDS RES, 1989. 17(13): p. 5349-59.
11. HASHIMOTO, T., ET AL., *PROTEIN PHYLOGENY GIVES A ROBUST ESTIMATION FOR EARLY DIVERGENCES OF EUKARYOTES: PHYLOGENETIC PLACE OF A MITOCHONDRIA-LACKING PROTOZOAN, GIARDIA LAMBLIA*. MOL BIOL EVOL, 1994. 11(1): p. 65-71.
12. HASHIMOTO, T., ET AL., *PHYLOGENETIC PLACE OF MITOCHONDRION-LACKING PROTOZOAN, GIARDIA LAMBLIA, INFERRED FROM AMINO ACID SEQUENCES OF ELONGATION FACTOR 2*. MOL BIOL EVOL, 1995. 12(5): p. 782-93.
13. ANKARKLEV, J., ET AL., *BEHIND THE SMILE: CELL BIOLOGY AND DISEASE MECHANISMS OF GIARDIA SPECIES*. NAT REV MICROBIOL. 8(6): p. 413-22.
14. ROGER, A.J., ET AL., *A MITOCHONDRIAL-LIKE CHAPERONIN 60 GENE IN GIARDIA LAMBLIA: EVIDENCE THAT DIPLOMONADS ONCE HARBORED AN ENDOSYMBIONT RELATED TO THE PROGENITOR OF MITOCHONDRIA*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1998. 95(1): p. 229-34.
15. SMITH, M.W., ET AL., *SEQUENCE SURVEY OF THE GIARDIA LAMBLIA GENOME*. MOL BIOCHEM PARASITOL, 1998. 95(2): p. 267-80.
16. ANDERSSON, J.O., ET AL., *PHYLOGENETIC ANALYSES OF DIPLOMONAD GENES REVEAL FREQUENT LATERAL GENE TRANSFERS AFFECTING EUKARYOTES*. CURR BIOL, 2003. 13(2): p. 94-104.
17. ADAM, R.D., *BIOLOGY OF GIARDIA LAMBLIA*. CLIN MICROBIOL REV, 2001. 14(3): p. 447-75.
18. MAYRHOFER, G., ET AL., *DIVISION OF GIARDIA ISOLATES FROM HUMANS INTO TWO GENETICALLY DISTINCT ASSEMBLAGES BY ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF ENZYMES ENCODED AT 27 LOCI AND COMPARISON WITH GIARDIA MURIS*. PARASITOLOGY, 1995. 111 (Pt 1): p. 11-7.
19. THOMPSON, R.C., R.M. HOPKINS, AND W.L. HOMAN, *NOMENCLATURE AND GENETIC GROUPINGS OF GIARDIA INFECTING MAMMALS*. PARASITOL TODAY, 2000. 16(5): p. 210-3.
20. MONIS, P.T., ET AL., *GENETIC DIVERSITY WITHIN THE MORPHOLOGICAL SPECIES GIARDIA INTESTINALIS AND ITS RELATIONSHIP TO HOST ORIGIN*. INFECT GENET EVOL, 2003. 3(1): p. 29-38.
21. NASH, T.E., ET AL., *EXPERIMENTAL HUMAN INFECTIONS WITH GIARDIA LAMBLIA*. J INFECT DIS, 1987. 156(6): p. 974-84.
22. KARANIS, P. AND P.L. EY, *CHARACTERIZATION OF AXENIC ISOLATES OF GIARDIA INTESTINALIS ESTABLISHED FROM HUMANS AND ANIMALS IN GERMANY*. PARASITOL RES, 1998. 84(6): p. 442-9.

23. BYRD, L.G., J.T. CONRAD, AND T.E. NASH, *GIARDIA LAMBLIA INFECTIONS IN ADULT MICE*. INFECT IMMUN, 1994. 62(8): p. 3583-5.
24. DAVIDS, B.J., ET AL., *POLYMERIC IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR IN INTESTINAL IMMUNE DEFENSE AGAINST THE LUMEN-DWELLING PROTOZOAN PARASITE GIARDIA*. J IMMUNOL, 2006. 177(9): p. 6281-90.
25. THOMPSON, R.C., J.A. REYNOLDSON, AND A.H. MENDIS, *GIARDIA AND GIARDIASIS*. ADV PARASITOL, 1993. 32: p. 71-160.
26. KORMAN, S.H., ET AL., *INVESTIGATION OF HUMAN GIARDIASIS BY KARYOTYPE ANALYSIS*. J CLIN INVEST, 1992. 89(6): p. 1725-33.
27. FRASER, D., ET AL., *GIARDIA LAMBLIA CARRIAGE IN ISRAELI BEDOUIN INFANTS: RISK FACTORS AND CONSEQUENCES*. CLIN INFECT DIS, 2000. 30(3): p. 419-24.
28. FRASER, D., ET AL., *NATURAL HISTORY OF GIARDIA LAMBLIA AND CRYPTOSPORIDIUM INFECTIONS IN A COHORT OF ISRAELI BEDOUIN INFANTS: A STUDY OF A POPULATION IN TRANSITION*. AM J TROP MED HYG, 1997. 57(5): p. 544-9.
29. SAVIOLI, L., ET AL., *RESPONSE FROM SAVIOLI AND COLLEAGUES FROM THE DEPARTMENT OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES, WORLD HEALTH ORGANIZATION*. PLOS MED, 2006. 3(6): p. e283.
30. SAVIOLI, L., H. SMITH, AND A. THOMPSON, *GIARDIA AND CRYPTOSPORIDIUM JOIN THE 'NEGLECTED DISEASES INITIATIVE'*. TRENDS PARASITOL, 2006. 22(5): p. 203-8.
31. ZUEV, D., ET AL., *OPTIMIZATION OF CRF1R BINDING AFFINITY OF 2-(2,4,6-TRICHLOROPHENYL)-4-TRIFLUOROMETHYL-5-AMINOMETHYLTHIAZOLES THROUGH RAPID AND SELECTIVE PARALLEL SYNTHESIS*. BIOORG MED CHEM LETT, 2005. 15(2): p. 431-4.
32. RIVERO, M.R., *ESTUDIO DE LAS ENDOPARASITOSIS INFANTILES EN ÁREAS DE RIESGO DE LA CIUDAD DE RIO CUARTO*. TESINA DE GRADO. MICROBIOLOGÍA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO., 2003.
33. TRULL, T.J., ET AL., *DIMENSIONAL MODELS OF PERSONALITY DISORDER: DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS FIFTH EDITION AND BEYOND*. CURR OPIN PSYCHIATRY, 2007. 20(1): p. 52-6.
34. GARDNER, T.B. AND D.R. HILL, *TREATMENT OF GIARDIASIS*. CLIN MICROBIOL REV, 2001. 14(1): p. 114-28.
35. UPCROFT, J.A., P. UPCROFT, AND P.F. BOREHAM, *DRUG RESISTANCE IN GIARDIA INTESTINALIS*. INT J PARASITOL, 1990. 20(4): p. 489-96.
36. GOLDMAN, A., ET AL., *PROGNOSTIC FACTORS IN CANCER OF THE TESTIS: AN APPROACH TO IDENTIFICATION*. CANCER TREAT REP, 1980. 64(2-3): p. 487-96.
37. WRIGHT, C.W., ET AL., *DETERMINATION OF ANTI-GIARDIAL ACTIVITY IN VITRO BY MEANS OF SOLUBLE FORMAZAN PRODUCTION*. TRANS R SOC TROP MED HYG, 1992. 86(5): p. 517-9.
38. LALLE, M., ET AL., *EXPRESSION OF CRYPTOSPORIDIUM PARVUM CPA135/CPCCP1 CHIMERAS IN GIARDIA DUODENALIS: ORGANIZATION OF THE PROTEIN DOMAINS AFFECTS THE PROTEIN SECRETION PATHWAY*. EXP PARASITOL. 127(3): p. 680-6.
39. LUJAN, H.D., *MECHANISMS OF ADAPTATION IN THE INTESTINAL PARASITE GIARDIA LAMBLIA*. ESSAYS BIOCHEM, 2011. 51: p. 177-91.
40. BOUCHER, S.E. AND F.D. GILLIN, *EXCYSTATION OF IN VITRO-DERIVED GIARDIA LAMBLIA CYSTS*. INFECT IMMUN, 1990. 58(11): p. 3516-22.
41. BERNANDER, R., J.E. PALM, AND S.G. SVARD, *GENOME PLOIDY IN DIFFERENT STAGES OF THE GIARDIA LAMBLIA LIFE CYCLE*. CELL MICROBIOL, 2001. 3(1): p. 55-62.
42. BINGHAM, A.K., ET AL., *GIARDIA SP.: PHYSICAL FACTORS OF EXCYSTATION IN VITRO, AND EXCYSTATION VS EOSIN EXCLUSION AS DETERMINANTS OF VIABILITY*. EXP PARASITOL, 1979. 47(2): p. 284-91.
43. SMITH, P.D., D.B. KEISTER, AND C.O. ELSON, *HUMAN HOST RESPONSE TO GIARDIA LAMBLIA. II. ANTIBODY-DEPENDENT KILLING IN VITRO*. CELL IMMUNOL, 1983. 82(2): p. 308-15.
44. ELMENDORF, H.G., S.C. DAWSON, AND J.M. MCCAFFERY, *THE CYTOSKELETON OF GIARDIA LAMBLIA*. INT J PARASITOL, 2003. 33(1): p. 3-28.
45. THOMPSON, R.C., *GIARDIASIS AS A RE-EMERGING INFECTIOUS DISEASE AND ITS ZOONOTIC POTENTIAL*. INT J PARASITOL, 2000. 30(12-13): p. 1259-67.

46. LOFTNESS, T.J., J. BAILLIE, AND R.D. SOLTIS, *MALABSORPTION AND PROTRACTED DIARRHEA ASSOCIATED WITH GIARDIASIS. AN UNUSUAL CASE*. MINN MED, 1984. 67(5): p. 257-9.
47. MANNING, P., S.L. ERLANDSEN, AND E.L. JARROLL, *CARBOHYDRATE AND AMINO ACID ANALYSES OF GIARDIA MURIS CYSTS*. J PROTOZOOLOGY, 1992. 39(2): p. 290-6.
48. JARROLL, E.L., ET AL., *GIARDIA CYST WALL-SPECIFIC CARBOHYDRATE: EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF GALACTOSAMINE*. MOL BIOCHEM PARASITOL, 1989. 32(2-3): p. 121-31.
49. YU, L.Z., C.W. BIRKY, JR., AND R.D. ADAM, *THE TWO NUCLEI OF GIARDIA EACH HAVE COMPLETE COPIES OF THE GENOME AND ARE PARTITIONED EQUATIONALLY AT CYTOKINESIS*. EUKARYOT CELL, 2002. 1(2): p. 191-9.
50. PRUCCA, C.G. AND H.D. LUJAN, *ANTIGENIC VARIATION IN GIARDIA LAMBLIA*. CELL MICROBIOL, 2009. 11(12): p. 1706-15.
51. PIMENTA, P.F., P.P. DA SILVA, AND T. NASH, *VARIANT SURFACE ANTIGENS OF GIARDIA LAMBLIA ARE ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF A THICK CELL COAT: THIN SECTION AND LABEL FRACTURE IMMUNOCYTOCHEMISTRY SURVEY*. INFECT IMMUN, 1991. 59(11): p. 3989-96.
52. LANFREDI-RANGEL, A., ET AL., *THE PERIPHERAL VESICLES OF TROPHOZOITES OF THE PRIMITIVE PROTOZOAN GIARDIA LAMBLIA MAY CORRESPOND TO EARLY AND LATE ENDOSOMES AND TO LYSOSOMES*. J STRUCT BIOL, 1998. 123(3): p. 225-35.
53. CAMPANATI, L., ET AL., *VIDEO-MICROSCOPY OBSERVATIONS OF FAST DYNAMIC PROCESSES IN THE PROTOZOON GIARDIA LAMBLIA*. CELL MOTIL CYTOSKELETON, 2002. 51(4): p. 213-24.
54. FEELY, D.E., J.V. SCHOLLMAYER, AND S.L. ERLANDSEN, *GIARDIA SPP.: DISTRIBUTION OF CONTRACTILE PROTEINS IN THE ATTACHMENT ORGANELLE*. EXP PARASITOL, 1982. 53(1): p. 145-54.
55. PEATTIE, D.A., ET AL., *ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF GIARDINS TO THE EDGES OF DISK MICRORIBBONS OF GIARDIA LAMBLIA AND THE NUCLEOTIDE AND DEDUCED PROTEIN SEQUENCE OF ALPHA GIARDIN*. J CELL BIOL, 1989. 109(5): p. 2323-35.
56. BENCHIMOL, M., *PARTICIPATION OF THE ADHESIVE DISC DURING KARYOKINESIS IN GIARDIA LAMBLIA*. BIOL CELL, 2004. 96(4): p. 291-301.
57. CAMPANATI, L., ET AL., *TUBULIN DIVERSITY IN TROPHOZOITES OF GIARDIA LAMBLIA*. HISTOCHEM CELL BIOL, 2003. 119(4): p. 323-31.
58. BENCHIMOL, M., ET AL., *VISUALIZATION OF THE FUNIS OF GIARDIA LAMBLIA BY HIGH-RESOLUTION FIELD EMISSION SCANNING ELECTRON MICROSCOPY--NEW INSIGHTS*. J STRUCT BIOL, 2004. 147(2): p. 102-15.
59. GILLIN, F.D., D.S. REINER, AND J.M. MCCAFFERY, *CELL BIOLOGY OF THE PRIMITIVE EUKARYOTE GIARDIA LAMBLIA*. ANNU REV MICROBIOL, 1996. 50: p. 679-705.
60. LUJAN, H.D. AND M.C. TOUZ, *PROTEIN TRAFFICKING IN GIARDIA LAMBLIA*. CELL MICROBIOL, 2003. 5(7): p. 427-34.
61. GUPTA, R.S., ET AL., *CLONING OF GIARDIA LAMBLIA HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 HOMOLOGS: IMPLICATIONS REGARDING ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS AND OF ENDOPLASMIC RETICULUM*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1994. 91(8): p. 2895-9.
62. LUJAN, H.D., ET AL., *CHOLESTEROL STARVATION INDUCES DIFFERENTIATION OF THE INTESTINAL PARASITE GIARDIA LAMBLIA*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1996. 93(15): p. 7628-33.
63. SOLTYS, B.J., M. FALAH, AND R.S. GUPTA, *IDENTIFICATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM IN THE PRIMITIVE EUKARYOTE GIARDIA LAMBLIA USING CRYOELECTRON MICROSCOPY AND ANTIBODY TO BIP*. J CELL SCI, 1996. 109 (Pt 7): p. 1909-17.
64. KNODLER, L.A., ET AL., *DEVELOPMENTAL GENE REGULATION IN GIARDIA LAMBLIA: FIRST EVIDENCE FOR AN ENCYSTATION-SPECIFIC PROMOTER AND DIFFERENTIAL 5' MRNA PROCESSING*. MOL MICROBIOL, 1999. 34(2): p. 327-40.
65. MCARTHUR, A.G., ET AL., *THE EVOLUTIONARY ORIGINS OF EUKARYOTIC PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE DOMAINS: NEW EVIDENCE FROM THE AMITOCHONDRIATE PROTIST GIARDIA LAMBLIA*. MOL BIOL EVOL, 2001. 18(8): p. 1455-63.
66. KATTENBACH, W.M., ET AL., *GIARDIA DUODENALIS: A FREEZE-FRACTURE, FRACTURE-FLIP AND CYTOCHEMISTRY STUDY*. PARASITOL RES, 1991. 77(8): p. 651-8.

67. FEELY, D.E. AND J.K. DYER, *LOCALIZATION OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN GIARDIA LAMBLIA AND GIARDIA MURIS TROPHOZOITES*. J PROTOZOOLOGY, 1987. 34(1): p. 80-3.
68. LINDMARK, D.G., *GIARDIA LAMBLIA: LOCALIZATION OF HYDROLASE ACTIVITIES IN LYSOSOME-LIKE ORGANELLES OF TROPHOZOITES*. EXP PARASITOL, 1988. 65(1): p. 141-7.
69. TOUZ, M.C., ET AL., *SORTING OF ENCYSTATION-SPECIFIC CYSTEINE PROTEASE TO LYSOSOME-LIKE PERIPHERAL VACUOLES IN GIARDIA LAMBLIA REQUIRES A CONSERVED TYROSINE-BASED MOTIF*. J BIOL CHEM, 2003. 278(8): p. 6420-6.
70. SLAVIN, I., ET AL., *DEPHOSPHORYLATION OF CYST WALL PROTEINS BY A SECRETED LYSOSOMAL ACID PHOSPHATASE IS ESSENTIAL FOR ENCYSTATION OF GIARDIA LAMBLIA*. MOL BIOCHEM PARASITOL, 2002. 122(1): p. 95-8.
71. BOCKMAN, D.E. AND W.B. WINBORN, *ELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF EXOGENOUS FERRITIN WITHIN VACUOLES OF GIARDIA MURIS*. J PROTOZOOLOGY, 1968. 15(1): p. 26-30.
72. RIVERO, M.R., ET AL., *GIARDIA LAMBLIA LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN IS INVOLVED IN SELECTIVE LIPOPROTEIN ENDOCYTOSIS AND PARASITE REPLICATION*. MOL MICROBIOL, 2011. 79(5): p. 1204-19.
73. RIVERO, M.R., ET AL., *ADAPTOR PROTEIN 2 REGULATES RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS AND CYST FORMATION IN GIARDIA LAMBLIA*. BIOCHEM J, 2010. 428(1): p. 33-45.
74. LUJAN, H.D., ET AL., *DEVELOPMENTAL INDUCTION OF GOLGI STRUCTURE AND FUNCTION IN THE PRIMITIVE EUKARYOTE GIARDIA LAMBLIA*. J BIOL CHEM, 1995. 270(9): p. 4612-8.
75. LANFREDI-RANGEL, A., ET AL., *TROPHOZOITES OF GIARDIA LAMBLIA MAY HAVE A GOLGI-LIKE STRUCTURE*. FEMS MICROBIOL LETT, 1999. 181(2): p. 245-51.
76. MARTI, M. AND A.B. HEHL, *ENCYSTATION-SPECIFIC VESICLES IN GIARDIA: A PRIMORDIAL GOLGI OR JUST ANOTHER SECRETORY COMPARTMENT?* TRENDS PARASITOL, 2003. 19(10): p. 440-6.
77. STEFANIC, S., ET AL., *ORGANELLE PROTEOMICS REVEALS CARGO MATURATION MECHANISMS ASSOCIATED WITH GOLGI-LIKE ENCYSTATION VESICLES IN THE EARLY-DIVERGED PROTOZOAN GIARDIA LAMBLIA*. J BIOL CHEM, 2006. 281(11): p. 7595-604.
78. FASO, C., ET AL., *EXPORT OF CYST WALL MATERIAL AND GOLGI ORGANELLE NEOGENESIS IN GIARDIA LAMBLIA DEPEND ON ENDOPLASMIC RETICULUM EXIT SITES*. CELL MICROBIOL, 2012.
79. NASH, T.E. AND M.R. MOWATT, *IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A GIARDIA LAMBLIA GROUP-SPECIFIC GENE*. EXP PARASITOL, 1992. 75(4): p. 369-78.
80. NASH, T.E. AND M.R. MOWATT, *CHARACTERIZATION OF A GIARDIA LAMBLIA VARIANT-SPECIFIC SURFACE PROTEIN (VSP) GENE FROM ISOLATE GS/M AND ESTIMATION OF THE VSP GENE REPERTOIRE SIZE*. MOL BIOCHEM PARASITOL, 1992. 51(2): p. 219-27.
81. NASH, T.E. AND M.R. MOWATT, *VARIANT-SPECIFIC SURFACE PROTEINS OF GIARDIA LAMBLIA ARE ZINC-BINDING PROTEINS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1993. 90(12): p. 5489-3.
82. FAUBERT, G., D.S. REINER, AND F.D. GILLIN, *GIARDIA LAMBLIA: REGULATION OF SECRETORY VESICLE FORMATION AND LOSS OF ABILITY TO REATTACH DURING ENCYSTATION IN VITRO*. EXP PARASITOL, 1991. 72(4): p. 345-54.
83. ERLANDSEN, S.L., ET AL., *FORMATION OF THE GIARDIA CYST WALL: STUDIES ON EXTRACELLULAR ASSEMBLY USING IMMUNOGOLD LABELING AND HIGH RESOLUTION FIELD EMISSION SEM*. J EUKARYOT MICROBIOL, 1996. 43(5): p. 416-29.
84. ALBERTS B, J.A., LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTHER P ED. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 4TH EDN*. 2002, GARLAND SCIENCE: LONDON.
85. PEARSE, B.M., *COATED VESICLES FROM PIG BRAIN: PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION*. J MOL BIOL, 1975. 97(1): p. 93-8.
86. KIRCHHAUSEN, T., *CLATHRIN*. ANNU REV BIOCHEM, 2000. 69: p. 699-727.
87. KIRCHHAUSEN, T., *THREE WAYS TO MAKE A VESICLE*. NAT REV MOL CELL BIOL, 2000. 1(3): p. 187-98.
88. POLISHCHUK, R.S., ET AL., *ULTRASTRUCTURE OF LONG-RANGE TRANSPORT CARRIERS MOVING FROM THE TRANS GOLGI NETWORK TO PERIPHERAL ENDOSOMES*. TRAFFIC, 2006. 7(8): p. 1092-103.
89. MORRISON, H.G., ET AL., *GENOMIC MINIMALISM IN THE EARLY DIVERGING INTESTINAL PARASITE GIARDIA LAMBLIA*. SCIENCE, 2007. 317(5846): p. 1921-6.

90. FINN, R.D., ET AL., *THE PFAM PROTEIN FAMILIES DATABASE*. NUCLEIC ACIDS RES, 2008. 36(DATABASE ISSUE): P. D281-8.
91. GAECHTER, V., ET AL., *THE SINGLE DYNAMIN FAMILY PROTEIN IN THE PRIMITIVE PROTOZOAN GIARDIA LAMBLIA IS ESSENTIAL FOR STAGE CONVERSION AND ENDOCYTIC TRANSPORT*. TRAFFIC, 2008. 9(1): P. 57-71.
92. HEHL, A.B. AND M. MARTI, *SECRETORY PROTEIN TRAFFICKING IN GIARDIA INTESTINALIS*. MOL MICROBIOL, 2004. 53(1): P. 19-28.
93. MARTI, M., ET AL., *THE SECRETORY APPARATUS OF AN ANCIENT EUKARYOTE: PROTEIN SORTING TO SEPARATE EXPORT PATHWAYS OCCURS BEFORE FORMATION OF TRANSIENT GOLGI-LIKE COMPARTMENTS*. MOL BIOL CELL, 2003. 14(4): P. 1433-47.
94. MARTI, M., ET AL., *AN ANCESTRAL SECRETORY APPARATUS IN THE PROTOZOAN PARASITE GIARDIA INTESTINALIS*. J BIOL CHEM, 2003. 278(27): P. 24837-48.
95. HERNANDEZ, Y., ET AL., *CLATHRIN-DEPENDENT PATHWAYS AND THE CYTOSKELETON NETWORK ARE INVOLVED IN CERAMIDE ENDOCYTOSIS BY A PARASITIC PROTOZOAN, GIARDIA LAMBLIA*. INT J PARASITOL, 2007. 37(1): P. 21-32.
96. TOUZ, M.C., L. KULAKOVA, AND T.E. NASH, *ADAPTOR PROTEIN COMPLEX 1 MEDIATES THE TRANSPORT OF LYSOSOMAL PROTEINS FROM A GOLGI-LIKE ORGANELLE TO PERIPHERAL VACUOLES IN THE PRIMITIVE EUKARYOTE GIARDIA LAMBLIA*. MOL BIOL CELL, 2004. 15(7): P. 3053-60.
97. ZHANG, F., ET AL., *CLATHRIN ADAPTOR GGA1 POLYMERIZES CLATHRIN INTO TUBULES*. J BIOL CHEM, 2007. 282(18): P. 13282-9.
98. ABODEELY, M., ET AL., *A CONTIGUOUS COMPARTMENT FUNCTIONS AS ER AND ENDOSOME/LYSOSOME IN GIARDIA LAMBLIA*. EUKARYOT CELL, 2009.
99. FASO, C. AND A.B. HEHL, *MEMBRANE TRAFFICKING AND ORGANELLE BIOGENESIS IN GIARDIA LAMBLIA: USE IT OR LOSE IT*. INT J PARASITOL, 2011.
100. BONIFACINO, J.S. AND L.M. TRAUB, *SIGNALS FOR SORTING OF TRANSMEMBRANE PROTEINS TO ENDOSOMES AND LYSOSOMES*. ANNU REV BIOCHEM, 2003. 72: P. 395-447.
101. ROBINSON, M.S. AND J.S. BONIFACINO, *ADAPTOR-RELATED PROTEINS*. CURR OPIN CELL BIOL, 2001. 13(4): P. 444-53.
102. TRAUB, L.M., *SORTING IT OUT: AP-2 AND ALTERNATE CLATHRIN ADAPTORS IN ENDOCYTIC CARGO SELECTION*. J CELL BIOL, 2003. 163(2): P. 203-8.
103. ROBINSON, M.S., *ADAPTABLE ADAPTORS FOR COATED VESICLES*. TRENDS CELL BIOL, 2004. 14(4): P. 167-74.
104. MITSUNARI, T., ET AL., *CLATHRIN ADAPTOR AP-2 IS ESSENTIAL FOR EARLY EMBRYONAL DEVELOPMENT*. MOL CELL BIOL, 2005. 25(21): P. 9318-23.
105. BONIFACINO, J.S. AND J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, *COAT PROTEINS: SHAPING MEMBRANE TRANSPORT*. NAT REV MOL CELL BIOL, 2003. 4(5): P. 409-14.
106. SEN, A., ET AL., *THE EPSIN PROTEIN FAMILY: COORDINATORS OF ENDOCYTOSIS AND SIGNALING*. BIOMOL CONCEPTS, 2012. 3(2): P. 117-126.
107. HORVATH, C.A., ET AL., *EPSIN: INDUCING MEMBRANE CURVATURE*. INT J BIOCHEM CELL BIOL, 2007. 39(10): P. 1765-70.
108. MCPHERSON, P.S., B.K. KAY, AND N.K. HUSSAIN, *SIGNALING ON THE ENDOCYTIC PATHWAY*. TRAFFIC, 2001. 2(6): P. 375-84.
109. CONNER, S.D. AND S.L. SCHMID, *REGULATED PORTALS OF ENTRY INTO THE CELL*. NATURE, 2003. 422(6927): P. 37-44.
110. BRODSKY, F.M., ET AL., *BIOLOGICAL BASKET WEAVING: FORMATION AND FUNCTION OF CLATHRIN-COATED VESICLES*. ANNU REV CELL DEV BIOL, 2001. 17: P. 517-68.
111. HINNERS, I. AND S.A. TOOZE, *CHANGING DIRECTIONS: CLATHRIN-MEDIATED TRANSPORT BETWEEN THE GOLGI AND ENDOSOMES*. J CELL SCI, 2003. 116(Pt 5): P. 763-71.
112. SLEPNEV, V.I. AND P. DE CAMILLI, *ACCESSORY FACTORS IN CLATHRIN-DEPENDENT SYNAPTIC VESICLE ENDOCYTOSIS*. NAT REV NEUROSCI, 2000. 1(3): P. 161-72.

113. TAKEI, K. AND V. HAUCKE, *CLATHRIN-MEDIATED ENDOCYTOSIS: MEMBRANE FACTORS PULL THE TRIGGER*. TRENDS CELL BIOL, 2001. 11(9): p. 385-91.
114. CHEN, H., ET AL., *EPSIN IS AN EH-DOMAIN-BINDING PROTEIN IMPLICATED IN CLATHRIN-MEDIATED ENDOCYTOSIS*. NATURE, 1998. 394(6695): p. 793-7.
115. MILLS, I.G., ET AL., *EPSINR: AN AP1/CLATHRIN INTERACTING PROTEIN INVOLVED IN VESICLE TRAFFICKING*. J CELL BIOL, 2003. 160(2): p. 213-22.
116. WASIAK, S., ET AL., *ENTHOPROTIN: A NOVEL CLATHRIN-ASSOCIATED PROTEIN IDENTIFIED THROUGH SUBCELLULAR PROTEOMICS*. J CELL BIOL, 2002. 158(5): p. 855-62.
117. KALTHOFF, C., ET AL., *CLINT: A NOVEL CLATHRIN-BINDING ENTH-DOMAIN PROTEIN AT THE GOLGI*. MOL BIOL CELL, 2002. 13(11): p. 4060-73.
118. ROSENTHAL, J.A., ET AL., *THE EPSINS DEFINE A FAMILY OF PROTEINS THAT INTERACT WITH COMPONENTS OF THE CLATHRIN COAT AND CONTAIN A NEW PROTEIN MODULE*. J BIOL CHEM, 1999. 274(48): p. 33959-65.
119. KAY, B.K., ET AL., *IDENTIFICATION OF A NOVEL DOMAIN SHARED BY PUTATIVE COMPONENTS OF THE ENDOCYTIC AND CYTOSKELETAL MACHINERY*. PROTEIN SCI, 1999. 8(2): p. 435-8.
120. HYMAN, J., ET AL., *EPSIN 1 UNDERGOES NUCLEOCYTOSOLIC SHUTTLING AND ITS EPS15 INTERACTOR NH(2)-TERMINAL HOMOLOGY (ENTH) DOMAIN, STRUCTURALLY SIMILAR TO ARMADILLO AND HEAT REPEATS, INTERACTS WITH THE TRANSCRIPTION FACTOR PROMYELOCYTIC LEUKEMIA ZN(2)+ FINGER PROTEIN (PLZF)*. J CELL BIOL, 2000. 149(3): p. 537-46.
121. DE CAMILLI, P., ET AL., *THE ENTH DOMAIN*. FEBS LETT, 2002. 513(1): p. 11-8.
122. LOHI, O., ET AL., *VHS DOMAIN -- A LONGSHOREMAN OF VESICLE LINES*. FEBS LETT, 2002. 513(1): p. 19-23.
123. TAKESHITA, T., ET AL., *STAM, SIGNAL TRANSDUCING ADAPTOR MOLECULE, IS ASSOCIATED WITH JANUS KINASES AND INVOLVED IN SIGNALING FOR CELL GROWTH AND C-MYC INDUCTION*. IMMUNITY, 1997. 6(4): p. 449-57.
124. HIRST, J., M.R. LINDSAY, AND M.S. ROBINSON, *GGAS: ROLES OF THE DIFFERENT DOMAINS AND COMPARISON WITH AP-1 AND CLATHRIN*. MOL BIOL CELL, 2001. 12(11): p. 3573-88.
125. ZHU, Y., M.T. DRAKE, AND S. KORNFELD, *ADAPTOR PROTEIN 1-DEPENDENT CLATHRIN COAT ASSEMBLY ON SYNTHETIC LIPOSOMES AND GOLGI MEMBRANES*. METHODS ENZYMOL, 2001. 329: p. 379-87.
126. BEAN, A.J., ET AL., *HRS-2 REGULATES RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS VIA INTERACTIONS WITH EPS15*. J BIOL CHEM, 2000. 275(20): p. 15271-8.
127. PUERTOLLANO, R., ET AL., *SORTING OF MANNOSE 6-PHOSPHATE RECEPTORS MEDIATED BY THE GGAS*. SCIENCE, 2001. 292(5522): p. 1712-6.
128. STENMARK, H., R. AASLAND, AND P.C. DRISCOLL, *THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-PHOSPHATE-BINDING FIVE FINGER*. FEBS LETT, 2002. 513(1): p. 77-84.
129. FORD, M.G., ET AL., *CURVATURE OF CLATHRIN-COATED PITS DRIVEN BY EPSIN*. NATURE, 2002. 419(6905): p. 361-6.
130. FORD, M.G., ET AL., *SIMULTANEOUS BINDING OF PTDINS(4,5)P2 AND CLATHRIN BY AP180 IN THE NUCLEATION OF CLATHRIN LATTICES ON MEMBRANES*. SCIENCE, 2001. 291(5506): p. 1051-5.
131. ITOH, T., ET AL., *ROLE OF THE ENTH DOMAIN IN PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE BINDING AND ENDOCYTOSIS*. SCIENCE, 2001. 291(5506): p. 1047-51.
132. MORGAN, J.R., ET AL., *A CONSERVED CLATHRIN ASSEMBLY MOTIF ESSENTIAL FOR SYNAPTIC VESICLE ENDOCYTOSIS*. J NEUROSCI, 2000. 20(23): p. 8667-76.
133. LOHI, O. AND V.P. LEHTO, *VHS DOMAIN MARKS A GROUP OF PROTEINS INVOLVED IN ENDOCYTOSIS AND VESICULAR TRAFFICKING*. FEBS LETT, 1998. 440(3): p. 255-7.
134. HIRST, J., ET AL., *EPSINR: AN ENTH DOMAIN-CONTAINING PROTEIN THAT INTERACTS WITH AP-1*. MOL BIOL CELL, 2003. 14(2): p. 625-41.
135. LE BORGNE, R. AND B. HOFACK, *PROTEIN TRANSPORT FROM THE SECRETORY TO THE ENDOCYTIC PATHWAY IN MAMMALIAN CELLS*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 1998. 1404(1-2): p. 195-209.
136. NIELSEN, M.S., ET AL., *THE SORTILIN CYTOPLASMIC TAIL CONVEYS GOLGI-ENDOSOME TRANSPORT AND BINDS THE VHS DOMAIN OF THE GGA2 SORTING PROTEIN*. EMBO J, 2001. 20(9): p. 2180-90.

137. ZHU, Y., ET AL., *BINDING OF GGA2 TO THE LYSOSOMAL ENZYME SORTING MOTIF OF THE MANNOSE 6-PHOSPHATE RECEPTOR*. SCIENCE, 2001. 292(5522): p. 1716-8.
138. DUNCAN, M.C., G. COSTAGUTA, AND G.S. PAYNE, *YEAST EPSIN-RELATED PROTEINS REQUIRED FOR GOLGI-ENDOSOME TRAFFIC DEFINE A GAMMA-ADAPTIN EAR-BINDING MOTIF*. NAT CELL BIOL, 2003. 5(1): p. 77-81.
139. RITTER, B. AND P.S. MCPHERSON, *THERE'S A GAP IN THE ENTH DOMAIN*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2006. 103(11): p. 3953-4.
140. AHLE, S. AND E. UNGEWICKELL, *PURIFICATION AND PROPERTIES OF A NEW CLATHRIN ASSEMBLY PROTEIN*. EMBO J, 1986. 5(12): p. 3143-9.
141. KALTHOFF, C., ET AL., *UNUSUAL STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE ENDOCYTIC PROTEINS AP180 AND EPSIN 1*. J BIOL CHEM, 2002. 277(10): p. 8209-16.
142. WENDLAND, B., *EPSINS: ADAPTORS IN ENDOCYTOSIS?* NAT REV MOL CELL BIOL, 2002. 3(12): p. 971-7.
143. TEBAR, F., S.K. BOHLANDER, AND A. SORKIN, *CLATHRIN ASSEMBLY LYMPHOID MYELOID LEUKEMIA (CALM) PROTEIN: LOCALIZATION IN ENDOCYTIC-COATED PITS, INTERACTIONS WITH CLATHRIN, AND THE IMPACT OF OVEREXPRESSION ON CLATHRIN-MEDIATED TRAFFIC*. MOL BIOL CELL, 1999. 10(8): p. 2687-702.
144. ENGQVIST-GOLDSTEIN, A.E., ET AL., *THE ACTIN-BINDING PROTEIN HIP1R ASSOCIATES WITH CLATHRIN DURING EARLY STAGES OF ENDOCYTOSIS AND PROMOTES CLATHRIN ASSEMBLY IN VITRO*. J CELL BIOL, 2001. 154(6): p. 1209-23.
145. MISHRA, S.K., ET AL., *CLATHRIN- AND AP-2-BINDING SITES IN HIP1 UNCOVER A GENERAL ASSEMBLY ROLE FOR ENDOCYTIC ACCESSORY PROTEINS*. J BIOL CHEM, 2001. 276(49): p. 46230-6.
146. POLO, S., ET AL., *A SINGLE MOTIF RESPONSIBLE FOR UBIQUITIN RECOGNITION AND MONOUBIQUITINATION IN ENDOCYTIC PROTEINS*. NATURE, 2002. 416(6879): p. 451-5.
147. AGUILAR, R.C., H.A. WATSON, AND B. WENDLAND, *THE YEAST EPSIN ENT1 IS RECRUITED TO MEMBRANES THROUGH MULTIPLE INDEPENDENT INTERACTIONS*. J BIOL CHEM, 2003. 278(12): p. 10737-43.
148. HICKE, L. AND H. RIEZMAN, *UBIQUITINATION OF A YEAST PLASMA MEMBRANE RECEPTOR SIGNALS ITS LIGAND-STIMULATED ENDOCYTOSIS*. CELL, 1996. 84(2): p. 277-87.
149. CONNER, S.D. AND S.L. SCHMID, *DIFFERENTIAL REQUIREMENTS FOR AP-2 IN CLATHRIN-MEDIATED ENDOCYTOSIS*. J CELL BIOL, 2003. 162(5): p. 773-9.
150. MOTLEY, A.M., ET AL., *FUNCTIONAL ANALYSIS OF AP-2 ALPHA AND MU2 SUBUNITS*. MOL BIOL CELL, 2006. 17(12): p. 5298-308.
151. WANG, Y.J., ET AL., *PHOSPHATIDYLINOSITOL 4 PHOSPHATE REGULATES TARGETING OF CLATHRIN ADAPTOR AP-1 COMPLEXES TO THE GOLGI*. CELL, 2003. 114(3): p. 299-310.
152. HUSSAIN, N.K., ET AL., *A ROLE FOR EPSIN N-TERMINAL HOMOLOGY/AP180 N-TERMINAL HOMOLOGY (ENTH/ANTH) DOMAINS IN TUBULIN BINDING*. J BIOL CHEM, 2003. 278(31): p. 28823-30.
153. QUALMANN, B. AND M.M. KESSELS, *ENDOCYTOSIS AND THE CYTOSKELETON*. INT REV CYTOL, 2002. 220: p. 93-144.
154. MCPHERSON, P.S., *THE ENDOCYTIC MACHINERY AT AN INTERFACE WITH THE ACTIN CYTOSKELETON: A DYNAMIC, HIP INTERSECTION*. TRENDS CELL BIOL, 2002. 12(7): p. 312-5.
155. BARRIERE, H., ET AL., *MOLECULAR BASIS OF OLIGOUBIQUITIN-DEPENDENT INTERNALIZATION OF MEMBRANE PROTEINS IN MAMMALIAN CELLS*. TRAFFIC, 2006. 7(3): p. 282-97.
156. HOFMANN, K. AND L. FALQUET, *A UBIQUITIN-INTERACTING MOTIF CONSERVED IN COMPONENTS OF THE PROTEASOMAL AND LYSOSOMAL PROTEIN DEGRADATION SYSTEMS*. TRENDS BIOCHEM SCI, 2001. 26(6): p. 347-50.
157. AGUILAR, R.C. AND B. WENDLAND, *UBIQUITIN: NOT JUST FOR PROTEASOMES ANYMORE*. CURR OPIN CELL BIOL, 2003. 15(2): p. 184-90.
158. PELHAM, H.R., *MEMBRANE TRAFFIC: GGAS SORT UBIQUITIN*. CURR BIOL, 2004. 14(9): p. R357-9.
159. GABERNET-CASTELLO, C., J.B. DACKS, AND M.C. FIELD, *THE SINGLE ENTH-DOMAIN PROTEIN OF TRYPANOSOMES; ENDOCYTIC FUNCTIONS AND EVOLUTIONARY RELATIONSHIP WITH EPSIN*. TRAFFIC, 2009. 10(7): p. 894-911.

160. BRADY, R.J., Y. WEN, AND T.J. O'HALLORAN, *THE ENTH AND C-TERMINAL DOMAINS OF DICTYOSTELIUM EPSIN COOPERATE TO REGULATE THE DYNAMIC INTERACTION WITH CLATHRIN-COATED PITS*. J CELL SCI, 2008. 121(Pt 20): P. 3433-44.
161. BROMBERG, Y., G. YACHDAV, AND B. ROST, *SNAP PREDICTS EFFECT OF MUTATIONS ON PROTEIN FUNCTION*. BIOINFORMATICS, 2008. 24(20): P. 2397-8.
162. HYLEMON, P.B., ET AL., *BILE ACIDS AS REGULATORY MOLECULES*. J LIPID RES, 2009. 50(8): P. 1509-20.
163. LUJAN, H.D. AND L.S. DIAMOND, *CHOLESTEROL REQUIREMENT AND METABOLISM IN ENTAMOEBA HISTOLYTICA*. ARCH MED RES, 1997. 28 SPEC NO: P. 96-7.
164. HOHENESTER, S., ET AL., *PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE P110GAMMA CONTRIBUTES TO BILE SALT-INDUCED APOPTOSIS IN PRIMARY RAT HEPATOCYTES AND HUMAN HEPATOMA CELLS*. J HEPATOL. 53(5): P. 918-26.
165. YICHOY, M., ET AL., *LIPIDOMIC ANALYSIS REVEALS THAT PHOSPHATIDYLGLYCEROL AND PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE ARE NEWLY GENERATED PHOSPHOLIPIDS IN AN EARLY-DIVERGENT PROTOZOAN, GIARDIA LAMBLIA*. MOL BIOCHEM PARASITOL, 2009. 165(1): P. 67-78.
166. GALLEGO, E., M. ALVARADO, AND M. WASSERMAN, *IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF THE PROTEIN UBIQUITINATION SYSTEM IN GIARDIA INTESTINALIS*. PARASITOL RES, 2007. 101(1): P. 1-7.
167. SHIH, S.C., ET AL., *EPSINS AND Vps27p/Hrs CONTAIN UBIQUITIN-BINDING DOMAINS THAT FUNCTION IN RECEPTOR ENDOCYTOSIS*. NAT CELL BIOL, 2002. 4(5): P. 389-93.
168. DORES, M.R., ET AL., *THE FUNCTION OF YEAST EPSIN AND EDE1 UBIQUITIN-BINDING DOMAINS DURING RECEPTOR INTERNALIZATION*. TRAFFIC. 11(1): P. 151-60.
169. OVERSTREET, E., ET AL., *EITHER PART OF A DROSOPHILA EPSIN PROTEIN, DIVIDED AFTER THE ENTH DOMAIN, FUNCTIONS IN ENDOCYTOSIS OF DELTA IN THE DEVELOPING EYE*. CURR BIOL, 2003. 13(10): P. 854-60.
170. KAZAZIC, M., ET AL., *EPSIN 1 IS INVOLVED IN RECRUITMENT OF UBIQUITINATED EGF RECEPTORS INTO CLATHRIN-COATED PITS*. TRAFFIC, 2009. 10(2): P. 235-45.
171. STARUSCHENKO, A., O. POCHYNYUK, AND J.D. STOCKAND, *REGULATION OF EPITHELIAL NA⁺ CHANNEL ACTIVITY BY CONSERVED SERINE/THREONINE SWITCHES WITHIN SORTING SIGNALS*. J BIOL CHEM, 2005. 280(47): P. 39161-7.
172. ULLU, E., ET AL., *RNA INTERFERENCE: ADVANCES AND QUESTIONS*. PHILOS TRANS R SOC LOND B BIOL SCI, 2002. 357(1417): P. 65-70.
173. LI, Z., ET AL., *MECHANISMS OF CATALYSIS AND INHIBITION OPERATIVE IN THE ARGININE DEIMINASE FROM THE HUMAN PATHOGEN GIARDIA LAMBLIA*. BIOORG CHEM, 2009. 37(5): P. 149-61.
174. RIVERO, M.R., L. KULAKOVA, AND M.C. TOUZ, *LONG DOUBLE-STRANDED RNA PRODUCES SPECIFIC GENE DOWNREGULATION IN GIARDIA LAMBLIA*. J PARASITOL, 2010. 96(4): P. 815-9.
175. RIVERO, M.R., ET AL., *VACUOLAR PROTEIN SORTING RECEPTOR IN GIARDIA LAMBLIA*. PLOS ONE, 2012. 7(8): P. E43712.
176. FRIEND, D.S., *THE FINE STRUCTURE OF GIARDIA MURIS*. J CELL BIOL, 1966. 29(2): P. 317-32.
177. TURCHANY, J.M., S.B. ALEY, AND F.D. GILLIN, *GIARDICIDAL ACTIVITY OF LACTOFERRIN AND N-TERMINAL PEPTIDES*. INFECT IMMUN, 1995. 63(11): P. 4550-2.
178. TURCHANY, J.M., ET AL., *ULTRASTRUCTURAL EFFECTS OF LACTOFERRIN BINDING ON GIARDIA LAMBLIA TROPHOZOITES*. J EUKARYOT MICROBIOL, 1997. 44(1): P. 68-72.
179. VECCHI, M., ET AL., *NUCLEOCYTOPLASMIC SHUTTLING OF ENDOCYTIC PROTEINS*. J CELL BIOL, 2001. 153(7): P. 1511-7.
180. BITTENCOURT-SILVESTRE, J., L. LEMGRUBER, AND W. DE SOUZA, *ENCYSTATION PROCESS OF GIARDIA LAMBLIA: MORPHOLOGICAL AND REGULATORY ASPECTS*. ARCH MICROBIOL, 2010. 192(4): P. 259-65.
181. COX, S.S., ET AL., *EVIDENCE FROM BIOINFORMATICS, EXPRESSION AND INHIBITION STUDIES OF PHOSPHOINOSITIDE-3 KINASE SIGNALLING IN GIARDIA INTESTINALIS*. BMC MICROBIOL, 2006. 6: P. 45.
182. DE CRAENE, J.O., ET AL., *EVOLUTIONARY ANALYSIS OF THE ENTH/ANTH/VHS PROTEIN SUPERFAMILY REVEALS A COEVOLUTION BETWEEN MEMBRANE TRAFFICKING AND METABOLISM*. BMC GENOMICS, 2012. 13: P. 297.
183. GOFFEAU, A., ET AL., *LIFE WITH 6000 GENES*. SCIENCE, 1996. 274(5287): P. 546, 563-7.

184. SHERMAN, F., *GETTING STARTED WITH YEAST*. METHODS ENZYMOL, 1991. 194: p. 3-21.
185. SHERMAN, F., *GETTING STARTED WITH YEAST*. METHODS ENZYMOL, 2002. 350: p. 3-41.
186. WENDLAND, B., K.E. STEECE, AND S.D. EMR, *YEAST EPSINS CONTAIN AN ESSENTIAL N-TERMINAL ENTH DOMAIN, BIND CLATHRIN AND ARE REQUIRED FOR ENDOCYTOSIS*. EMBO J, 1999. 18(16): p. 4383-93.
187. AGUILAR, R.C., ET AL., *EPSIN N-TERMINAL HOMOLOGY DOMAINS PERFORM AN ESSENTIAL FUNCTION REGULATING CDC42 THROUGH BINDING CDC42 GTPASE-ACTIVATING PROTEINS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2006. 103(11): p. 4116-21.
188. COPIC, A., T.L. STARR, AND R. SCHEKMAN, *ENT3P AND ENT5P EXHIBIT CARGO-SPECIFIC FUNCTIONS IN TRAFFICKING PROTEINS BETWEEN THE TRANS-GOLGI NETWORK AND THE ENDOSOMES IN YEAST*. MOL BIOL CELL, 2007. 18(5): p. 1803-15.
189. AGUILAR, R.C. AND B. WENDLAND, *ENDOCYTOSIS OF MEMBRANE RECEPTORS: TWO PATHWAYS ARE BETTER THAN ONE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2005. 102(8): p. 2679-80.
190. URBANOWSKI, J.L. AND R.C. PIPER, *UBIQUITIN SORTS PROTEINS INTO THE INTRALUMENAL DEGRADATIVE COMPARTMENT OF THE LATE-ENDOSOME/VACUOLE*. TRAFFIC, 2001. 2(9): p. 622-30.
191. RIEZMAN, H., ET AL., *ACTIN-, MYOSIN- AND UBIQUITIN-DEPENDENT ENDOCYTOSIS*. EXPERIENTIA, 1996. 52(12): p. 1033-41.
192. DRUBIN, D.G., K.G. MILLER, AND D. BOTSTEIN, *YEAST ACTIN-BINDING PROTEINS: EVIDENCE FOR A ROLE IN MORPHOGENESIS*. J CELL BIOL, 1988. 107(6 Pt 2): p. 2551-61.
193. DOYLE, T. AND D. BOTSTEIN, *MOVEMENT OF YEAST CORTICAL ACTIN CYTOSKELETON VISUALIZED IN VIVO*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1996. 93(9): p. 3886-91.
194. DRUBIN, D. AND N. HIROKAWA, *CYTOSKELETON*. CURR OPIN CELL BIOL, 1998. 10(1): p. 13-5.
195. EUGSTER, A., ET AL., *ENT5P IS REQUIRED WITH ENT3P AND Vps27P FOR UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN SORTING INTO THE MULTIVESICULAR BODY*. MOL BIOL CELL, 2004. 15(7): p. 3031-41.
196. FRIANT, S., ET AL., *ENT3P IS A PTDINS(3,5)P2 EFFECTOR REQUIRED FOR PROTEIN SORTING TO THE MULTIVESICULAR BODY*. DEV CELL, 2003. 5(3): p. 499-511.
197. CHIDAMBARAM, S., ET AL., *SPECIFIC INTERACTION BETWEEN SNAREs AND EPSIN N-TERMINAL HOMOLOGY (ENTH) DOMAINS OF EPSIN-RELATED PROTEINS IN TRANS-GOLGI NETWORK TO ENDOSOME TRANSPORT*. J BIOL CHEM, 2004. 279(6): p. 4175-9.
198. PAYNE, G.S. AND R. SCHEKMAN, *CLATHRIN: A ROLE IN THE INTRACELLULAR RETENTION OF A GOLGI MEMBRANE PROTEIN*. SCIENCE, 1989. 245(4924): p. 1358-65.
199. JENSEN, R., G.F. SPRAGUE, JR., AND I. HERSKOWITZ, *REGULATION OF YEAST MATING-TYPE INTERCONVERSION: FEEDBACK CONTROL OF HO GENE EXPRESSION BY THE MATING-TYPE LOCUS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1983. 80(10): p. 3035-9.
200. CHAN, R.K. AND C.A. OTTE, *ISOLATION AND GENETIC ANALYSIS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE MUTANTS SUPERSENSITIVE TO G1 ARREST BY A FACTOR AND ALPHA FACTOR PHEROMONES*. MOL CELL BIOL, 1982. 2(1): p. 11-20.
201. CHAN, R.K. AND C.A. OTTE, *PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE MUTANTS SUPERSENSITIVE TO G1 ARREST BY A FACTOR AND ALPHA FACTOR PHEROMONES*. MOL CELL BIOL, 1982. 2(1): p. 21-9.
202. BERKOWER, C. AND S. MICHAELIS, *MUTATIONAL ANALYSIS OF THE YEAST A-FACTOR TRANSPORTER STE6, A MEMBER OF THE ATP BINDING CASSETTE (ABC) PROTEIN SUPERFAMILY*. EMBO J, 1991. 10(12): p. 3777-85.
203. NIJBROEK, G.L. AND S. MICHAELIS, *FUNCTIONAL ASSAYS FOR ANALYSIS OF YEAST STE6 MUTANTS*. METHODS ENZYMOL, 1998. 292: p. 193-212.
204. TOUZ, M.C., ET AL., *LYSOSOMAL PROTEIN TRAFFICKING IN GIARDIA LAMBLIA: COMMON AND DISTINCT FEATURES*. FRONT BIOSCI (ELITE ED), 2012. 4: p. 1898-909.
205. BYKOVA, Y.A., ET AL., *LOCALIZATION OF PHOSPHATIDYLINOSITOL (3,4,5)-TRISPHOSPHATE TO PHAGOSOMES IN ENTAMOEBA HISTOLYTICA ACHIEVED USING GLUTATHIONE S-TRANSFERASE- AND GREEN FLUORESCENT PROTEIN-TAGGED LIPID BIOSENSORS*. INFECT IMMUN. 78(1): p. 125-37.

206. ZHOU, K., ET AL., *DISRUPTION OF DICTYOSTELIUM PI3K GENES REDUCES [32P]PHOSPHATIDYLINOSITOL 3,4 BISPHOSPHATE AND [32P]PHOSPHATIDYLINOSITOL TRISPHOSPHATE LEVELS, ALTERS F-ACTIN DISTRIBUTION AND IMPAIRS PINOCYTOSIS*. J CELL SCI, 1998. 111 (Pt 2): p. 283-94.
207. LAFER, E.M., *CLATHRIN-PROTEIN INTERACTIONS*. TRAFFIC, 2002. 3(8): p. 513-20.
208. DRAKE, M.T., M.A. DOWNS, AND L.M. TRAUB, *EPSIN BINDS TO CLATHRIN BY ASSOCIATING DIRECTLY WITH THE CLATHRIN-TERMINAL DOMAIN. EVIDENCE FOR COOPERATIVE BINDING THROUGH TWO DISCRETE SITES*. J BIOL CHEM, 2000. 275(9): p. 6479-89.
209. TOUZ, M.C., *THE UNIQUE ENDOSOMAL/LYSOSOMAL SYSTEM OF GIARDIA LAMBLIA*, IN *MOLECULAR REGULATION OF ENDOCYTOSIS*, B. CERESA, EDITOR. 2012, INTECH: CROATIA. P. [HTTP://WWW.INTECHOPEN.COM/BOOKS/MOLECULAR-REGULATION-OF-ENDOCYTOSIS/THE-UNIQUE-ENDOSOMAL-LYSOSOMAL-SYSTEM-OF-GIARDIA-LAMBLIA](http://www.intechopen.com/books/molecular-regulation-of-endocytosis/the-unique-endosomal-lysosomal-system-of-giardia-lamblia)
210. NINO, C.A., ET AL., *UBIQUITINATION DYNAMICS IN THE EARLY-BRANCHING EUKARYOTE GIARDIA INTESTINALIS*. MICROBIOLOGYOPEN, 2013. 2(3): p. 525-39.
211. ECKMANN, L., *MUCOSAL DEFENCES AGAINST GIARDIA*. PARASITE IMMUNOL, 2003. 25(5): p. 259-70.
212. JIANG, R., ET AL., *APO- AND HOLO-LACTOFERRIN ARE BOTH INTERNALIZED BY LACTOFERRIN RECEPTOR VIA CLATHRIN-MEDIATED ENDOCYTOSIS BUT DIFFERENTIALLY AFFECT ERK-SIGNALING AND CELL PROLIFERATION IN CACO-2 CELLS*. J CELL PHYSIOL, 2011. 226(11): p. 3022-31.
213. HUETTINGER, M., ET AL., *LACTOFERRIN SPECIFICALLY INHIBITS ENDOCYTOSIS OF CHYLOMICRON REMNANTS BUT NOT ALPHA-MACROGLOBULIN*. J BIOL CHEM, 1992. 267(26): p. 18551-7.
214. FRESNO VARA, J.A., ET AL., *PI3K/AKT SIGNALLING PATHWAY AND CANCER*. CANCER TREAT REV, 2004. 30(2): p. 193-204.
215. BENCHIMOL, M., *GIARDIA LAMBLIA: BEHAVIOR OF THE NUCLEAR ENVELOPE*. PARASITOL RES, 2004. 94(4): p. 254-264.
216. TRAN, E.J. AND S.R. WENTE, *DYNAMIC NUCLEAR PORE COMPLEXES: LIFE ON THE EDGE*. CELL, 2006. 125(6): p. 1041-53.
217. TUMOVA, P., ET AL., *CYTOGENETIC EVIDENCE FOR DIVERSITY OF TWO NUCLEI WITHIN A SINGLE DIPLOMONAD CELL OF GIARDIA*. CHROMOSOMA, 2007. 116(1): p. 65-78.
218. SARAIYA, A.A. AND C.C. WANG, *SNO RNA, A NOVEL PRECURSOR OF MICRO RNA IN GIARDIA LAMBLIA*. PLOS PATHOG, 2008. 4(11): p. E1000224.
219. DUNCAN, M.C. AND G.S. PAYNE, *ENTH/ANTH DOMAINS EXPAND TO THE GOLGI*. TRENDS CELL BIOL, 2003. 13(5): p. 211-5.
220. THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS, AND T.J. GIBSON, *CLUSTAL W: IMPROVING THE SENSITIVITY OF PROGRESSIVE MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT THROUGH SEQUENCE WEIGHTING, POSITION-SPECIFIC GAP PENALTIES AND WEIGHT MATRIX CHOICE*. NUCLEIC ACIDS RES, 1994. 22(22): p. 4673-80.
221. KALL, L., A. KROGH, AND E.L. SONNHAMMER, *ADVANTAGES OF COMBINED TRANSMEMBRANE TOPOLOGY AND SIGNAL PEPTIDE PREDICTION--THE PHOBIUS WEB SERVER*. NUCLEIC ACIDS RES, 2007. 35(WEB SERVER ISSUE): p. W429-32.
222. KALL, L., A. KROGH, AND E.L. SONNHAMMER, *A COMBINED TRANSMEMBRANE TOPOLOGY AND SIGNAL PEPTIDE PREDICTION METHOD*. J MOL BIOL, 2004. 338(5): p. 1027-36.
223. PETERSEN, T.N., ET AL., *SIGNALP 4.0: DISCRIMINATING SIGNAL PEPTIDES FROM TRANSMEMBRANE REGIONS*. NAT METHODS, 2011. 8(10): p. 785-6.
224. NAKAI, K. AND P. HORTON, *PSORT: A PROGRAM FOR DETECTING SORTING SIGNALS IN PROTEINS AND PREDICTING THEIR SUBCELLULAR LOCALIZATION*. TRENDS BIOCHEM SCI, 1999. 24(1): p. 34-6.
225. KORADI, R., M. BILLETER, AND K. WUTHRICH, *MOLMOL: A PROGRAM FOR DISPLAY AND ANALYSIS OF MACROMOLECULAR STRUCTURES*. J MOL GRAPH, 1996. 14(1): p. 51-5, 29-32.
226. MELO, F. AND E. FEYTMANS, *ASSESSING PROTEIN STRUCTURES WITH A NON-LOCAL ATOMIC INTERACTION ENERGY*. J MOL BIOL, 1998. 277(5): p. 1141-52.
227. WAHL, S.M., ET AL., *ANATOMIC DISSOCIATION BETWEEN HIV-1 AND ITS ENDOGENOUS INHIBITOR IN MUCOSAL TISSUES*. AM J PATHOL, 1997. 150(4): p. 1275-84.
228. LOVELL, S.C., ET AL., *STRUCTURE VALIDATION BY CALPHA GEOMETRY: PHI,PSI AND CBETA DEVIATION*. PROTEINS, 2003. 50(3): p. 437-50.

229. GILLIN, F.D., ET AL., *ISOLATION AND EXPRESSION OF THE GENE FOR A MAJOR SURFACE PROTEIN OF GIARDIA LAMBLIA*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1990. 87(12): p. 4463-7.
230. DIAMOND, L.S., D.R. HARLOW, AND C.C. CUNNICK, *A NEW MEDIUM FOR THE AXENIC CULTIVATION OF ENTAMOEBA HISTOLYTICA AND OTHER ENTAMOEBA*. TRANS R SOC TROP MED HYG, 1978. 72(4): p. 431-2.
231. TOUZ, M.C., ET AL., *MEMBRANE-ASSOCIATED DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV IS INVOLVED IN ENCYSTATION-SPECIFIC GENE EXPRESSION DURING GIARDIA DIFFERENTIATION*. BIOCHEM J, 2002. 364(Pt 3): p. 703-10.
232. TOUZ, M.C., J.T. CONRAD, AND T.E. NASH, *A NOVEL PALMITOYL ACYL TRANSFERASE CONTROLS SURFACE PROTEIN PALMITOYLATION AND CYTOTOXICITY IN GIARDIA LAMBLIA*. MOL MICROBIOL, 2005. 58(4): p. 999-1011.
233. SAMBROOK J, F.E., MANIATIS T, , ED. *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. . 2 ED. 1989, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS: NEW YORK. 253.
234. SUN, H. AND W.J. CROSSLAND, *QUANTITATIVE ASSESSMENT OF LOCALIZATION AND COLOCALIZATION OF GLUTAMATE, ASPARTATE, GLYCINE, AND GABA IMMUNOREACTIVITY IN THE CHICK RETINA*. ANAT REC, 2000. 260(2): p. 158-79.
235. GARCIA PENARRUBIA, P., X. FEREZ RUIZ, AND J. GALVEZ, *QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE FACTORS THAT AFFECT THE DETERMINATION OF COLOCALIZATION COEFFICIENTS IN DUAL-COLOR CONFOCAL IMAGES*. IEEE TRANS IMAGE PROCESS, 2005. 14(8): p. 1151-8.
236. ZINCHUK, V., O. ZINCHUK, AND T. OKADA, *QUANTITATIVE COLOCALIZATION ANALYSIS OF MULTICOLOR CONFOCAL IMMUNOFLUORESCENCE MICROSCOPY IMAGES: PUSHING PIXELS TO EXPLORE BIOLOGICAL PHENOMENA*. ACTA HISTOCHEM CYTOCHEM, 2007. 40(4): p. 101-11.
237. LAEMMLI, U.K., *CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4*. NATURE, 1970. 227(5259): p. 680-5.
238. LONGTINE, M.S., ET AL., *ADDITIONAL MODULES FOR VERSATILE AND ECONOMICAL PCR-BASED GENE DELETION AND MODIFICATION IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. YEAST, 1998. 14(10): p. 953-61.
239. ROGERS, D.W., E. MCCONNELL, AND D. GREIG, *MOLECULAR QUANTIFICATION OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE ALPHA-PHEROMONE SECRETION*. FEMS YEAST RES, 2012. 12(6): p. 668-74.