

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA ENZIMA  
ARGININA DEIMINASA EN EL PROCESO DE  
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DEL  
PROTOZOARIO INTESTINAL *GIARDIA LAMBLIA***

por

*Biól. Cecilia Verónica Vranych*

*Directora: Dra. Andrea Silvana Rópolo*

Laboratorio de Microbiología e Inmunología  
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra  
INIMEC- CONICET- U.N.C.



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina  
2014

**COMISIÓN ASESORA**

Dr. Sergio Oscar Angel, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB- INTECH).  
CONICET- Universidad Nacional de General San Martín

Dra. María Angélica Perillo, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.  
Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Fabio Marcelo Cerban, CIBICI- CONICET. Facultad de Ciencias Químicas.  
Universidad Nacional de Córdoba

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

Lugar y Fecha:

Calificación:

**TRIBUNAL**

Firma: .....

Aclaración:

Firma: .....

Aclaración:

Firma: .....

Aclaración:

*A mi familia*

## Agradecimientos

*“Cada persona que pasa por nuestra vida es única.  
Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros.  
Habrá los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejarán nada.  
Esa es prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad”.*

*Jorge Luis Borges*

Finalizada esta etapa es imposible no volver la mirada atrás, recapitular y dar las gracias a todas las personas que han hecho posible, de una u otra manera, culminar este proyecto.

Mi especial agradecimiento, en principio, a las “jefas” del LabMI por ser quienes vivieron en primera persona el desarrollo y evolución de esta *Tesis*, siendo parte de mis avances, mis logros y mi crecimiento. Gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. ¡Gracias por su enorme calidez humana y su generosidad!. A la Dra. Andrea Rópolo, mi directora, por la supervisión, la motivación, y el gran apoyo recibido a lo largo de todos estos años. Por alentarme en cada decisión, confiar en mis capacidades, valorar mis ideas, respetar mis tiempos y por darme libertad para explorar y crecer. A la Dra. Carolina Touz por contribuir enormemente a mi formación científica, por sus muchos conocimientos transmitidos y su compromiso con mi trabajo, por hacerme sentir una más de sus becarios. ¡Gracias a ambas, por el inmenso cariño, y por los consejos personales y académicos recibidos en todo este tiempo!. ¡Gracias por escucharme y contenerme en los momentos más difíciles!.

Me llevo en el corazón un maravilloso grupo de amigos: Coty, Ceci, Romi, Nahuel y Gonzalo. ¡Qué hubiera hecho sin ustedes!. Más que feliz por los momentos compartidos,

por los mates y las charlitas “de terapia”, por el intercambio de ideas, por los consejos, los almuerzos y cada uno de los “*after*” organizados de improviso. Gracias, además, por el importante aporte en la revisión de este manuscrito. Por el trabajo en equipo, por las veces que me vieron desanimada y me contuvieron. Conservo cada recuerdo, cada palabra de apoyo, cada experiencia y cada emoción. ¡Creo que voy a extrañarlos muchísimo!. A Cotily, ¡mi queridísima dbf!. Gracias por tanto.... por tu alegría contagiosa, y tu empuje. Por tu sinceridad, tu generosidad y compañerismo. Por las miles de veces que me prestaste el oído en las charlitas “profundas” y las “no tanto”, por cada mirada de complicidad en la mesada... A Cecily, mi gran compañera de “modificaciones post-traduccionales”, por tus consejos “desde la experiencia”, tu paciencia, humildad y perseverancia. Por los muchos conocimientos transmitidos sin nada a cambio, por las varias “puestas a punto” compartidas y las tantas horas de trabajo en equipo. A Nahuel y, con él, al importante aporte del “departamento de Bioinformática”. Me llevo de vos la pasión por lo que hacés. Por las bromas, las risas, los tópicos de evolución, y de la vida. Creo que no podría irme sin decir: ¡Gracias al LabMI por permitir conocernos!. A Gonzalito, por su alegría. Gracias por amenizar las tardes con tu música y tus mates, por las esperas acompañando el “último experimento” y tu gran apoyo en este tiempo de descuento. A mi gran amiga Romi, mi primera compañera y mi maestra de mesada. Siempre lo digo: ¡te quiero muchísimo, mucho, un montón!. Gracias por todo lo que aprendí con vos y de vos, allá por los comienzos. Por esos largos tópicos “de esquina”, por tu generosidad, tu presencia y tu incondicionalidad, aún a lo lejos. Por celebrar cada logro y levantarme el ánimo en cada experiencia difícil... ¡A todos, gracias!.

A Belkys Maletto y Cecilia Sampedro por su asistencia técnica, su disposición y su buena onda en cada ensayo de Citometría de Flujo, y las muchas visitas al Microscopio Confocal.

Al Jurado Evaluador por los valiosos aportes y sugerencias para mejorar la calidad de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, y a quienes integran la Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas, en especial al grupo de secretarios, por la excelente disposición para hacer más sencillo el trabajo, sobre todo en las últimas instancias.

A todo el IMMF por dejarme formar parte de la familia institucional, por la calidez de quienes lo integran, por hacerme sentir siempre en casa. Un especial agradecimiento al laboratorio de los Dres. Cáceres, Paglini, Conde, Diaz Añel, López, Lorenzo, Bollo y Cambiasso; y fundamentalmente a sus becarios por las miles de visitas en busca de un equipo, un reactivo o el intercambio de conocimientos. Agradezco especialmente a Majo Virgolini, Luján Masseroni, Anahí Bignante, Flor Sanchez, Laura Gastaldi, Sole Ferreras, Flor Heredia, Vicky Rozés, Anabela Palandri, Gonzalo Quasollo, Gime Farías, Nacho Jausoro, Iván Mestres, Anita Vivinetto y Franco Mir con quienes compartí la experiencia más de cerca. ¡Gracias por ser parte y haber acompañado este camino!. ¡A Carla Cisternas y Flor Dadam, un especial agradecimiento, por la asistencia y la paciencia para con la técnica del *Real Time!*.

A Majo Virgolini y Luján Masseroni, dos amigas que me llevo... Por las charlas en los pasillos, por las risas, los mates compartidos, y los recreos con visitas al lab incluidas.

En lo personal, quisiera dar las gracias a mi familia y amigos, por haber confiado siempre en mí, por haber compartido mis ilusiones y mis inquietudes, y por haberme apoyado en los momentos más duros y difíciles de este proceso. Sus conversaciones, sus palabras de ánimo, su tiempo, sus abrazos y sonrisas me han alentado en no pocas ocasiones durante todo este tiempo. A mis hermanos, por la constancia. Por la paciencia, la confianza, y la contención. Por “soportarme” y alentarme a seguir. Por emocionarse con cada logro y perdonar cada ausencia. A mis cuñadas y sobrinos, mis padrinos, mis tíos, primos, y a Martita... por interesarse en mi trabajo y alentarme continuamente. No puedo

dejar pasar esta oportunidad sin decirles que los quiero muchísimo y que gracias a ustedes soy y estoy donde estoy.

A mis amigos de la vida, en especial a Pato: mi colega y hermana, por entender cada decisión, por las muchas charlas de catarsis compartidas. Por estar presente en cada momento de mi vida. ¡Te quiero con el alma!. A Euge, la amiga incondicional, por celebrar mis logros y alentarme en todo momento. A Yani, mi hermana, aunque lejos en distancia siempre cerca con el corazón. A mis queridos Eli, Moni, Cele, Sole, Vero A, Vero L, Lu, Ale G, Ale P, Hugo, Nico, Martita y Yanina por las palabras justas en cada momento, por el cariño y la preocupación constante. ¡Gracias por escucharme tantas veces y darme ánimo cuando más lo necesité!.

Por último, un especial ¡gracias! a mis dos grandes maestros y mis ángeles desde hace ya un tiempo. Mis papás, porque sé lo orgullosos que se sentirían al verme hoy culminar esta importante etapa de mi vida. Los quiero con el alma, los recuerdo y los extraño muchísimo, y siempre...

Esta Tesis ha sido posible gracias al financiamiento recibido a través de becas y subsidios otorgados por las siguientes instituciones:



Parte de los resultados de este *Trabajo de Tesis* han sido presentados en:

## Publicaciones

- Touz, M. C., Rópolo, A. S.; Rivero, M. C.; **Vranych, C. V.**; Conrad, J. T.; Svard, S. G.; Nash, T. E. “*Arginine Deiminase Plays Multiple Regulatory Roles In The Biology Of Giardia lamblia*”. *Journal of Cell Science* 121:2930-2938. Septiembre 2008.
- **Cecilia V. Vranych**; María C. Merino; Nahuel Zamponi; María C. Touz; Andrea S. Rópolo. “*SUMOylation in Giardia lamblia: A Conserved Post-translational Modification In One Of The Earliest Divergent Eukaryotes*”. *Biomolecules* 2:312-330. doi:10.3390/biom2030312. Julio 2012.
- **Cecilia V. Vranych**; María R. Rivero; María C. Merino; Gonzalo F. Mayol; Nahuel Zamponi; Belkys A. Maletto; María C. Pistoresi, María C. Touz; Andrea S. Rópolo. “*SUMOylation And Deimination Of Proteins: Two Epigenetic Modifications Involved In Giardia Encystation*”. *BBA- Molecular Cell Research*. En revisión.

## Presentaciones a Congresos

- 2007. **Vranych, C. V.**; Rivero, M. R.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*Biological Relevance Of Arginine Deiminase During Giardia lamblia Growth And Differentiation*” XXII Reunión Científica Anual. Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Chascomús. Buenos Aires. November 2007.
- 2007. **Vranych, C. V.**; Rivero, M. R.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*Arginine Deiminase Plays Multiple Regulatory Roles In The Biology Of Giardia lamblia*”. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular. Mar del Plata. Buenos Aires. Noviembre 2007.
- 2008. **Vranych, C. V.**; Rivero, M. R.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*The Mechanisms Of Survival Of The Parasite Giardia lamblia*”. VIII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Sociedad Argentina de Protozoología. Rosario. Santa Fe. Noviembre 2008.
- 2008. **Vranych, C. V.**; Rivero, M. R.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*Arginine Deiminase SUMOylation: A Novel Post-translational Modification In Giardia lamblia*”. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre, 2008. Villa Carlos Paz. Córdoba.
- 2009. **Vranych, C. V.**; Rivero, M. R.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*The SUMO Conjugating System In Giardia lamblia*”. XIII International Congress of Protistology/ XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas’ Disease”. Armação dos Búzios. Río de Janeiro. Brasil. Agosto, 2009.



- 2010. **Vranych, C. V.**; Merino, M. C.; Rivero, M. R.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*SUMOylation In Giardia lamblia: A Complex Post-translational Modification In One Of The Most Primitive Eukaryotic Cells*”. XXIV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Protozoología. Reunión Anual. Ascochinga. Córdoba. Argentina. Noviembre, 2010.
- 2011. **Vranych, C. V.**; Merino, M. C.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*Understanding Post-translational Modifications In G. lamblia: One Of Earliest Divergent Eukaryotes*”. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Potrero de los Funes. San Luis. Argentina. Octubre- Noviembre, 2011.
- 2011. **Vranych, C. V.**; Merino, M. C.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*Arginine Deiminase In Giardia lamblia And Its Novel Role As Peptidyl- Arginine Deiminase During The Encystation Process*”. IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Mar Del Plata. Buenos Aires. Argentina. Noviembre, 2011.
- 2012. **Vranych, C. V.**; Mayol, G. F.; Rivero, M. R.; Merino, M. M.; Maletto, B. A.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*The SUMOylated Arginine Deiminase Is Critical For Giardia lamblia Differentiation And Survival*”. 23<sup>nd</sup> Annual Molecular Parasitology Meeting. Marine Biological Laboratory. Woods Hole, MA (USA). Septiembre, 2012.
- 2012. **Vranych, C. V.**; Merino, M. C.; Mayol, G. F.; Touz, M. C.; Rópolo, A. S. “*Deep Inside The Nuclei: Decoding The Role Of Arginine Deiminase During Encystation Of Giardia lamblia*”. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular. Mendoza. Argentina. Octubre- Noviembre, 2012.

## Lista de Abreviaturas

**A:** Alanina

**Ac:** Anticuerpo

**Acm:** Anticuerpo monoclonal

**ADH:** Vía Arginina Deshidrolasa

**ADI:** Arginina Deiminasa

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido Desoxirribonucleico copia del ARN.

**ARG:** Arginasa

**ARID:** Factor de transcripción (del inglés, *AT-Rich Interaction Domain*)

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero

**ARNt:** Ácido Ribonucleico de transferencia

**ATP:** Adenosin Trifosfato

**β(1,3)-D-GalNAc:** Homopolímero de N-acetil- galactosamina

**BiP:** Proteína BiP (del inglés, *Inmunoglobulin heavy chain-Binding Protein*)

**BLASTp:** (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool protein*)

**C:** Cisteína

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio

**CDK2:** Enzima Quinasa dependiente de Ciclina-2 (del inglés, *Cyclin-Dependent Kinase 2*)

**CK:** Enzima Carbamato quinasa (del inglés, *Carbamate Kinase*)

**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*)

**D:** Ácido aspártico

**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*).

**E:** Ácido glutámico

**EF-1 y 2:** Factor de elongación 1 y 2 (del inglés, *Elongation Factor 1 and 2*)

**EGFCP:** Proteína del quiste EGFCP (del inglés, *Epidermal Growth Factor (EGF) - like Cyst Protein*)

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

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

**G:** Glicina

**GARP:** Factor de transcripción (del inglés, *Golden Arabidopsis response Regulator Protein*)

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

**GDH:** Glutamato Dehidrogenasa

**GG:** Motivo diglicina

**G6PI:** Enzima glucosamina-6-fosfato isomerasa (del inglés, *Glucosamine 6-Phosphate Isomerase*)

**GST:** Glutation S-Transferasa

**H:** Histidina

**HA:** Epitope de Hemaglutinina.

**HCNCp:** Proteína del quiste no variante rica en cisteína (del inglés, *High Cysteine Non-variant Cyst protein*)

**HDACs:** Histonas Deacetilasas

**HRP:** Peroxidasa de rábano (del inglés: *Horse radish Peroxidase*)

**IF:** Inmunofluorescencia

**IFI:** Inmunofluorescencia Indirecta

**Ig:** Inmunoglobulina

**iNOS:** Enzima Óxido Nítrico Sintetasa inducible (del inglés, *inducible Nitric Oxide Sintase*)

**IP:** Inmunoprecipitación

**JMJD:** Enzima Demetilasa (del inglés, *Jumonji domain-containing protein*)

**K:** Lisina

**kDa:** Kilodalton

**LB:** Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertoni.

**LRRs:** Repeticiones adyacentes ricas en leucina (del inglés, *Leucine Rich Repeats*)

**LSD1/KDM1:** Enzima Lisina Demetilasa (del inglés, *Lysine-Specific Demethylase 1*)

**M:** Coeficiente de solapamiento de *Manders* para el análisis de colocalización cuantitativa

**MALDI-ToF-MS:** Espectrometría de masas (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*)

**Myb2:** Factor de transcripción (del inglés, *Myeloblastosis-related transcription factors*)

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**NES:** Señal de exportación nuclear (del inglés, *Nuclear Exportation Signal*)

**NLS:** Señal de localización nuclear (del inglés, *Nuclear Localization Signal*)

**NOS:** Enzima Óxido Nítrico Sintetasa (del inglés, *Nitric Oxide Sintase*)

**NPC:** Complejo del Poro Nuclear (del inglés, *Nuclear Pore Complex*)

**OTC:** Enzima Ornitina Transcarbamilasa (del inglés, *Ornithine Transcarbamoylase*)

**ORF:** Marco abierto de lectura (del inglés, *Open Reading Frame*)

**ON:** Óxido Nítrico

**PADs:** Peptidil-Arginina Deiminasas

**Pax:** Factor de transcripción (del inglés, *Paired Box*)

**pb:** Pares de bases.

**PBS:** (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polimerase Chain Reaction*)

**PDB:** Base de datos de estructuras proteicas (del inglés, *Protein Structure Database*)

**PE:** Pre-enquistamiento

**PFR1:** Proteína paraflagelar de *Trypanosoma cruzi* (del inglés, *Paraflagellar Rod Protein*)

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

**Q:** Glutamina

**R:** Arginina

**RE:** Retículo Endoplasmático.

**RdRP:** ARN polimeras dependiente de ARN (del inglés, *RNA-dependent-RNA Polymerase*)

**RTPCR:** Transcripción reversa del ARN seguida de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Retrotranscription-PCR*).

**SAE1 y SAE2:** Subunidades SAE1 y SAE2 (del inglés, *SUMO Activation Enzyme 1 and 2*)

**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*)

**SENPs:** Proteasas de SUMO en mamíferos (del inglés, *Sentrin Proteases*)

**SP:** Proteasa de SUMO en *Giardia lamblia*

**SUMO:** Proteína SUMO (del inglés: *Small Ubiquitin-like Modifier*)

**TOPO:** Factor de transcripción. Enzima Topoisomerasa II

**TBS:** (del inglés, *Tris Buffered Saline*)

**Ulp1 y Ulp2:** Proteasas de SUMO en levaduras (del inglés, *UBL-specific Protease 1 and 2*)

**VA:** Variación Antigénica

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VSPs:** Proteínas variables de superficie (del inglés, *Variant Specific-Proteins*)

**Zn<sup>2+</sup>:** Zinc

# Índice

<b>Comisión Asesora- Defensa Oral y Pública.....</b>	<b>i</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Publicaciones .....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice .....</b>	<b>xii</b>
<b><i>Lista de Tablas y Figuras</i> .....</b>	<b>1</b>
<b><i>Resumen</i> .....</b>	<b>4</b>
<b><i>Summary</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>Capítulo 1: <i>Introducción General</i>.....</b>	<b>6</b>
1.1. Relación Parásito- Hospedador .....	7
1.2. Giardiasis .....	9
1.3. <i>Giardia</i> .....	11
1.3.1. Ubicación Taxonómica y Evolución .....	11
1.3.2. Nomenclatura .....	12
1.3.3. Biología Celular: Características Morfológicas Generales de <i>Giardia</i> .....	14
1.3.3.1. El Trofozoíto .....	15
1.3.3.2. El Quiste.....	19
1.3.4. Ciclo de Vida de <i>Giardia lamblia</i> .....	21
1.3.5. Mecanismos de Adaptación en <i>Giardia lamblia</i> .....	22
1.3.5.1. Desenquistamiento .....	22
1.3.5.2. Variación Antigénica.....	23
1.3.5.3. Enquistamiento .....	26
1.4. Modificaciones Post-traduccionales de Proteínas .....	30
1.4.1. Deiminación (Citrulinación) de Proteínas.....	30
1.4.2. Citrulinación de Proteínas en <i>Giardia lamblia</i> .....	33
1.4.3. SUMOilación de Proteínas.....	37
<b><i>Objetivos</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo 2:<i>SUMOilación en Giardia lamblia y ADI como sustrato de SUMOilación</i> .....</b>	<b>41</b>
2.1. SUMOilación en <i>Giardia lamblia</i> .....	42
2.1.1. SUMO: Una proteína conservada en <i>Giardia lamblia</i> .....	42
2.1.2. Cascada de SUMOilación en <i>Giardia lamblia</i> .....	44
2.1.2.1. Enzima SUMO Proteasa (SP-HA).....	44
2.1.2.2. Enzima SUMO E1 (SAE2-HA).....	48
2.1.2.3. Enzima SUMO E2 (SUMO E2-HA).....	51
2.1.3. Expresión de la proteína SUMO en <i>Giardia</i> .....	54
2.1.3.1. Sobre-expresión de la proteína SUMO en <i>Giardia lamblia</i> .....	54
2.1.3.2. Estudio de la forma nativa de SUMO a través de la producción de anticuerpos monoclonales .....	56
2.2. ADI como sustrato de SUMOilación en <i>Giardia lamblia</i> .....	61

2.2.1. ADI contiene un motivo con alta probabilidad de unión a SUMO en la K101 ...	61
2.2.2. ADI es una enzima SUMOilada .....	62
2.2.3. El residuo K101 como sitio de SUMOilación en ADI.....	64
Conclusiones Parciales:.....	67
<b>Capítulo 3: ADI durante el Enquistamiento de Giardia lamblia .....</b>	<b>69</b>
3.1. ADI es translocada desde el citoplasma a los núcleos durante el enquistamiento ..	70
3.2. La translocación de ADI al núcleo durante el enquistamiento depende parcialmente de la SUMOilación .....	73
3.3. Las NLSs participan en la translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento .....	83
3.4. ADI actúa como PAD sobre histonas durante el enquistamiento .....	87
3.5. La translocación de ADI al núcleo regula negativamente el proceso de enquistamiento .....	90
Conclusiones Parciales:.....	97
<b>Capítulo 4: Discusión General .....</b>	<b>98</b>
<b>Capítulo 5: Conclusiones Generales .....</b>	<b>111</b>
<b>Capítulo 6: Materiales y Métodos .....</b>	<b>116</b>
6.1. Organismos y Cultivo <i>in vitro</i> :.....	117
6.2. Análisis Bioinformáticos ( <i>in silico</i> ) .....	118
6.3. Purificación y Análisis de Ácidos Nucleicos .....	119
6.4. Retrotranscripción por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	119
6.5. PCR en Tiempo Real.....	120
6.6. Amplificación y Clonado de Proteínas.....	122
6.6.1. Amplificación por PCR .....	122
6.6.2. Expresión de las Variantes de ADI .....	123
6.6.3. Construcción de los Vectores de Expresión en <i>Giardia lamblia</i> .....	124
6.6.4. Expresión y Purificación de la Proteína Recombinante de SUMO fusionada a GST .....	126
6.6.5. Corte del Vector e Inserto utilizando Enzimas de Restricción .....	127
6.6.6. Ligación del Producto de Corte .....	127
6.6.7. Preparación de Bacterias Competentes <i>XL-Blue</i> .....	127
6.6.8. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	128
6.6.9. Chequeo de Colonias por PCR .....	128
6.6.10. Purificación del Plásmido .....	128
6.7. Transfección de Trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> cepa <i>WB/1267</i> .....	129
6.8. Generación del Acm anti-SUMO en <i>Giardia lamblia</i> .....	129
6.8.1. Inmunización .....	129
6.8.2. Producción del Acm anti-SUMO .....	130
6.8.3. Consideraciones Éticas .....	131
6.9. Análisis de Hibridización en <i>Slot blot</i> .....	131
6.10. IF .....	131
6.11. Análisis de Colocalización Cuantitativa (QCA del inglés, <i>Quantitative Colocalization Analysis</i> ).....	133
6.12. Citometría de Flujo .....	134

6.13. Determinación del Contenido Total de Proteínas.....	134
6.14. Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida ( <i>SDS-PAGE</i> ).....	134
6.15. Inmunotransferencia .....	135
6.16. Ensayos de <i>Dot blot</i> .....	136
6.17. Fraccionamiento Subcelular .....	136
6.18. IP .....	136
6.19. Aislamiento de Histonas e Identificación por Espectrometría de Masas.....	137
6.20. Ensayo de Citrulinación .....	137
<b>Capítulo 7: Bibliografía .....</b>	<b>139</b>

## ***Lista de Tablas y Figuras***

### **Capítulo 1**

#### **Tablas:**

**Tabla 1.1:** Grupos genéticos de *Giardia* y sus hospedadores

#### **Figuras:**

**Figura 1.1:** El trofozoíto y quiste de *Giardia lamblia*

**Figura 1.2:** El disco ventral en *Giardia lamblia*

**Figura 1.3:** VSPs

**Figura 1.4:** Ciclo biológico de *Giardia lamblia*

**Figura 1.5:** Estadios del desenquistamiento en *Giardia lamblia*

**Figura 1.6:** Variación Antigénica en *Giardia lamblia*

**Figura 1.7:** Factores de Transcripción involucrados en el enquistamiento de *Giardia lamblia*

**Figura 1.8:** Cascada de SUMOilación

### **Capítulo 2**

#### **Figuras:**

**Figura 2.1:** Análisis comparativo de proteínas SUMO

**Figura 2.2:** SUMO de *Giardia lamblia* y *Trypanosoma brucei*

**Figura 2.3:** Representación esquemática de la SP de *Giardia lamblia*

**Figura 2.4:** Producto de PCR del gen *sp* en *Giardia lamblia*

**Figura 2.5:** Expresión de la proteína SP-HA en *Giardia lamblia*

**Figura 2.6:** Localización citoplasmática y en membrana plasmática de la proteína SP-HA en *Giardia lamblia* por IFI

**Figura 2.7:** Localización nuclear de la proteína SP-HA en *Giardia lamblia* por IFI

**Figura 2.8:** Análisis de la secuencia de *SAE2* en *Giardia lamblia*

**Figura 2.9:** Expresión del gen *sae2* y de la proteína SAE2-HA por IFI

**Figura 2.10:** Análisis de la secuencia de la SUMO E2 en *Giardia lamblia*

**Figura 2.11:** Expresión del gen *sumo e2* y de la proteína SUMO E2-HA en *Giardia lamblia* por IFI

**Figura 2.12:** Producto de PCR del gen *sumo* en *Giardia lamblia*

**Figura 2.13:** Expresión de la proteína SUMO-HA en *Giardia lamblia* por inmunotransferencia

**Figura 2.14:** Expresión de la proteína SUMO-HA en *Giardia lamblia* por IFI

**Figura 2.15:** Proteína recombinante SUMO-GST

**Figura 2.16:** Producción del Ac policlonal anti-SUMO en *Giardia lamblia*

**Figura 2.17:** Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-SUMO en *Giardia lamblia*

**Figura 2.18:** Reactividad del Acm anti-SUMO 13C5 en *Giardia lamblia* por IFI

**Figura 2.19:** Reactividad del Acm anti-SUMO 13C5 en *Giardia lamblia* por inmunotransferencia

**Figura 2.20:** Estructura tridimensional de ADI y localización del sitio de conjugación a SUMO

**Figura 2.21:** El Acm anti-SUMO 13C5 es capaz de inmunoprecipitar la banda SUMOilada de ADI en trofozoítos ADI-HA

**Figura 2.22:** El Acm anti-GMP1 es capaz de inmunoprecipitar la banda SUMOilada de ADI en trofozoítos salvajes WB/1267



**Figura 2.22:** Expresión de la mutante ADI<sub>K101A</sub>-HA por IFI

**Figura 2.24:** Expresión de la mutante ADI<sub>K101A</sub>-HA por inmunotransferencia

**Figura 2.25:** La mutante ADI<sub>K101A</sub>-HA no expresa la forma SUMOilada de ADI

## Capítulo 3

### Tablas:

**Tabla 3.1:** Mutaciones en las NLSs de ADI y la predicción *in silico* de su participación en la translocación de la proteína al núcleo

### Figuras:

**Figura 3.1:** ADI transloca a los núcleos durante el enquistamiento en *Giardia lamblia*

**Figura 3.2:** ADI-HA transloca a los núcleos en las últimas etapas del enquistamiento

**Figura 3.3:** Altos niveles de expresión de ADI-HA en núcleo reducen la expresión de *CWP1*

**Figura 3.4:** La forma SUMOilada de ADI aumenta su expresión en núcleo a medida que transcurre el enquistamiento

**Figura 3.5:** Colocalización ADI-HA y SUMO en trofozoítos transgénicos ADI-HA

**Figura 3.6:** Colocalización SUMO-HA y ADI en trofozoítos transgénicos SUMO-HA

**Figura 3.7:** La translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento, reduce la expresión de *CWP1* en trofozoítos SUMO-HA

**Figura 3.8:** La mutación en el sitio de unión a SUMO reduce la eficiencia de translocación de ADI al núcleo

**Figura 3.9:** La mutación en la K101 de ADI muestra ausencia de SUMOilación en ADI<sub>K101A</sub>-HA

**Figura 3.10:** Translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento en ausencia de SUMOilación

**Figura 3.11:** Secuencia de aminoácidos de ADI y sus dos NLSs

**Figura 3.12:** Mutaciones en las NLSs alteran la translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento

**Figura 3.13:** ADI como PAD en *Giardia lamblia*

**Figura 3.14:** ADI citrulina histonas en *Giardia lamblia* durante el enquistamiento

**Figura 3.15:** *adi* incrementa su expresión en trofozoítos ADI-HA

**Figura 3.16:** La sobre-expresión de ADI-HA reduce la expresión de *CWP2* durante el enquistamiento

**Figura 3.17:** Efecto de ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA en la expresión de genes de enquistamiento *cwp1*, *cwp2*, *cwp3*

**Figura 3.18:** Efecto de ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA en la producción de quistes en *Giardia lamblia*

**Figura 3.19:** Efectos de *mNLS1*, *mNLS2* y *mNLS3* en la expresión de genes de enquistamiento *cwp1*, *cwp2*, *cwp3*

**Figura 3.20:** Efecto de *mNLS1*, *mNLS2* y *mNLS3* en la producción de quistes en *Giardia lamblia*

**Figura 3.21:** Efecto de ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA en la expresión de los factores de transcripción *myb2* y *wrky*

## Capítulo 5:

### Figuras:

**Figura 5.1:** Representación esquemática de las funciones de ADI durante el crecimiento de *Giardia lamblia*

**Figura 5.2:** Representación esquemática de la función de ADI durante el enquistamiento de *Giardia lamblia*

## **Capítulo 6:**

### **Tablas:**

**Tabla 6.1:** Cebadores utilizados en el ensayo de *RT-PCR*

**Tabla 6.2:** Secuencia de cebadores utilizados en el ensayo de *PCR* en tiempo real

**Tabla 6.3:** Secuencia de cebadores diseñados para el clonado y expresión de proteínas

**Tabla 6.4:** Cebadores diseñados para el clonado y expresión de las variantes de ADI

**Tabla 6.5:** Anticuerpos utilizados en los ensayos de IF (e inmunotransferencia)

### **Figuras:**

**Figura 6.1:** Vector pTubApa-H7-HA<sub>pac</sub>

**Figura 6.2:** Vector pTub-HA

**Figura 6.3:** Vector pGEX-4T-3

## **Resumen**

En este *Trabajo de Tesis* se estudiaron SUMOilación y citrulinación de proteínas en el parásito *Giardia lamblia*. Se demostró que tanto la proteína SUMO como las enzimas que participarían en la vía de SUMOilación se encuentran presentes en *Giardia*, identificándose a la enzima Arginina Deiminasa (ADI) como una proteína SUMOilada. ADI participa en la producción de energía y en el proceso de variación antigénica en el parásito, y durante el enquistamiento es translocada desde el citoplasma a los núcleos regulando negativamente la expresión de genes específicos del enquistamiento. Mutaciones puntuales en el sitio de SUMOilación de ADI mostraron que la translocación de la enzima al núcleo disminuye en las etapas tempranas de la diferenciación a quiste, aunque la enzima localiza en los núcleos en las últimas etapas del enquistamiento, participando en este proceso las señales de localización nuclear presentes en la secuencia de la proteína. Dentro del núcleo, ADI posiblemente citrulina histonas, encontrándose involucrada esta modificación en la menor expresión de las proteínas de enquistamiento y en la formación del quiste. Estos resultados indican que ADI desempeña un rol regulatorio en el proceso de enquistamiento, siendo las modificaciones post-traduccionales, mecanismos claves en este proceso.

## Summary

*SUMOylation of proteins has been recently described as a vital process in eukaryotic cells. In our work, we analyzed the role of SUMO protein and the genes encoding the putative enzymes of the SUMOylation pathway in the parasite Giardia lamblia. Although we observed several SUMOylated proteins, only the Arginine Deiminase (ADI) enzyme was confirmed as a SUMOylated substrate. ADI is involved in the survival of the parasite and, besides its role in ATP production it also catalyzes the modification of arginine residues to citrulline in the cytoplasmic tail of surface proteins. During encystation process, ADI translocates to the nuclei and downregulates the expression of the Cyst Wall Protein 2 (CWP2). In this work, we made site-specific mutation of the ADI SUMOylation site (K101) and we observed that transgenic trophozoites did not translocate to the nuclei at the first steps of encystation but shuttled in the nuclei late during this process, through classical nuclear localization signals. Inside the nuclei, ADI modifies histones by citrullination, and this modification is probably involved in the downregulation of CWPs expression and cyst wall formation. Our results strongly indicate that ADI plays a regulatory role during encystation in which post-translational modifications of proteins are key players.*

***Capítulo 1:***  
***Introducción General***

## **Capítulo 1: Introducción General**

### **1.1. Relación Parásito- Hospedador**

**A** lo largo del ciclo de vida, los organismos se encuentran expuestos a constantes interacciones con el ambiente que lo rodea y con otros seres vivos. Las consecuencias de esas interacciones pueden ser beneficiosas, neutrales o nocivas para al menos alguno de los organismos asociados. El parasitismo es una asociación entre especies que le permite a una (el parásito) proliferar y diferenciarse a expensas de otra (el hospedador), generalmente perjudicada por tal interacción. Aunque el parasitismo puede ser de tipo oportunista, facultativo u obligado, la asociación parásito-hospedador es un fenómeno general de adaptación y dependencia entre especies, establecida a partir de la selección natural. Así, a lo largo de la evolución, los eucariotas superiores han desarrollado mecanismos de adaptación tendientes a evitar procesos infecciosos. Del mismo modo, los microorganismos patógenos han elaborado estrategias para evadir estas defensas y prolongar su permanencia en el hospedero, facilitando la transmisión de la enfermedad a otros organismos susceptibles. El efecto de las presiones selectivas que ejercen patógeno y hospedador entre sí, sienta las bases de la coevolución adaptativa entre especies. Un microorganismo potencialmente infeccioso puede estar presente en el cuerpo del hospedador sin invadirlo, denominándose contaminante. Sin embargo, cuando los efectos acumulativos de la infección dañan los tejidos del hospedador, producen una enfermedad infecciosa. No todos los contaminantes acaban en infección, y no todas las infecciones terminan en enfermedad, dependiendo este desenlace tanto de la capacidad del hospedador de desarrollar una efectiva respuesta inmune, como del microorganismo de adaptarse y evadir esa respuesta.

Tanto en organismos procariotas como eucariotas, algunos procesos de adaptación a las variaciones del ambiente se encuentran asociados a cambios en las características morfológicas y fisiológicas de las células involucradas; transformaciones conocidas

generalmente con el nombre de diferenciación celular. Indudablemente, la capacidad celular de detectar cambios en las condiciones de su entorno, y de responder a ello eficazmente es fundamental para su supervivencia. Una característica importante de los parásitos es su gran capacidad de adaptación a los cambios del ambiente. La mayoría de estos organismos, ya sean unicelulares o multicelulares, ocupan diferentes nichos en su travesía por vectores y hospedadores, desarrollando mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales que de otro modo los destruirían. De esta manera, los ciclos biológicos de los parásitos surgen como excelentes modelos experimentales para la comprensión de mecanismos básicos de la diferenciación celular, la regulación de la expresión génica diferencial, los procesos de transducción de señales y la biogénesis de organelas subcelulares (Ropolo and Touz, 2010).

Un proceso dinámico de adaptación ocurre en el protozoario parásito unicelular *Giardia lamblia*: organismo de importancia médica como uno de los agentes más comunes causantes de diarrea (Nash, 1997; Adam, 2001), y de interés biológico por su condición de eucariota tempranamente divergente en la historia evolutiva (Adam, 2001; Morrison et al., 2007). Para *Giardia*, mantener una infección se traduce en su capacidad de sobrevivir y diferenciarse en ambientes potencialmente hostiles. Así, para permanecer en el intestino del hospedero *Giardia* debe, entre otras cosas, tener la capacidad de adherirse al epitelio intestinal y evadir la respuesta inmune del hospedador, o diferenciarse a su forma infectiva con una estructura celular más resistente que le permita soslayar factores ambientales desfavorables. Lo notable de este parásito es que a pesar de existir disponibilidad de tratamiento y medidas de prevención simples para evitar el contagio, ha logrado permanecer a través de los siglos, siendo en la actualidad uno de los principales parásitos intestinales hallados en muestras fecales de individuos. Ésto se traduce en la increíble capacidad de adaptación de *Giardia* tanto al microambiente dentro del hospedador como a las condiciones ambientales fuera del mismo (Adam, 2001).

## 1.2. Giardiasis

La enfermedad provocada por *Giardia* se conoce con el nombre de “giardiasis”: parasitosis transmitida a través de la ruta oro-fecal, sea indirectamente por comida o agua contaminada o directamente a través del contacto inter-personal (Thompson et al., 2000; Bernander et al., 2001). Aunque de distribución cosmopolita, con alrededor de 300 millones de infectados por año (Ankarklev et al., 2010), la infección por *Giardia* prevalece considerablemente en países en desarrollo, asociándose en general a la deficiencia de recursos sanitarios (Adam, 2001; Savioli et al., 2006). En tanto, en países desarrollados, la giardiasis se presenta en brotes o episodios que generalmente se relacionan al consumo de agua contaminada con materia fecal. La infección afecta fundamentalmente a la población infantil, tanto por la falta de hábitos de higiene frecuentes, como por los hábitos relacionados directamente a su desarrollo. Entre éstos se destaca el juego grupal en recintos reducidos y/o áreas susceptibles de contaminación como los areneros presentes en plazas y escuelas (Adam, 2001). En nuestro país, la recopilación de estudios aislados reveló una prevalencia de giardiasis de entre 25 y 50% de la población infantil.

La presencia de *Giardia* no siempre se traduce en el desarrollo de la enfermedad, pudiendo la misma presentarse desde casos asintomáticos, a infecciones agudas o crónicas. La duración de la infección fluctúa, además, entre distintos hospedadores, y el período de incubación varía entre 9 a 15 días. Se han identificado múltiples factores que podrían ser responsables de esta desigualdad en la presentación de la infección. Éstos incluyen: la virulencia de la cepa infectante, la dosis y la edad del hospedador y sus características nutricionales e inmunológicas al momento de la infección (Davids et al., 2006). En este sentido, resultan particularmente susceptibles al contagio los individuos inmunodeficientes, como los portadores de VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), donde la infección se desarrolla en general como un proceso crónico (Adam, 2001).

Los síntomas más frecuentes de la giardiasis aguda son dolor abdominal, diarrea, náuseas y pérdida de peso (Adam, 2001; Ankarklev et al., 2010). Aunque en la mayoría de los casos la infección se resuelve espontáneamente, una proporción de pacientes (entre el 30-50%) puede desarrollar giardiasis crónica; presentando dos o más años de diarreas



intermitentes acompañadas de debilidad, dolor de cabeza, deshidratación, pérdida continua de peso (Thompson et al., 1993), anorexia y mala absorción (Thompson et al., 1993; Adam, 2001). La mala absorción intestinal conduce generalmente a una insuficiencia nutricional (Korman et al., 1992), que 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 (Fraser et al., 2000). Urticaria, colecistitis, pancreatitis y síndrome de Chron son algunas de las enfermedades que pueden desarrollarse durante o después de la infección con *Giardia* (Fraser et al., 1997; Adam, 2001).

Hasta el momento, no han podido dilucidarse los mecanismos por los que el parásito altera el funcionamiento intestinal produciendo diarrea y mala absorción (Thompson and Meloni, 1993). Sin embargo, se ha sugerido que *Giardia* produce obstrucción mecánica de la mucosa intestinal impidiendo la absorción de nutrientes. Estudios histológicos de la mucosa del duodeno y yeyuno de personas infectadas asintomáticas (portadores sanos) habitualmente no muestran anormalidades. Personas sintomáticas, sin embargo, manifiestan atrofia de las vellosidades intestinales, daño epitelial e infiltración de la lámina propia por células plasmáticas, linfocitos y macrófagos (Meyer and Radulescu, 1979). El hospedador posee barreras naturales para evitar la infección por *Giardia* que incluyen: el pH, la tensión de oxígeno, el potencial redox y la disponibilidad de nutrientes, como así también: la flora normal bacteriana (Perez et al., 2001), la capa mucosa del intestino (Roskens and Erlandsen, 2002), las defensinas liberadas por las células de Paneth (Aley et al., 1994; Eckmann, 2003) y las proteasas intestinales (Nash et al., 1991; Papanastasiou et al., 1997). A su vez, se genera una respuesta inmune innata que, a pesar de ser inespecífica, es rápida y parcialmente efectiva (Nash et al., 1990b). El Óxido Nítrico (ON) es un radical libre altamente reactivo y antimicrobiano para un amplio rango de bacterias y parásitos patógenos. Se ha demostrado que la producción de ON por los enterocitos altera, por un mecanismo desconocido, el ciclo de vida de *Giardia*, aunque no afecta la viabilidad del parásito (Kukuruzovic et al., 2002). El desarrollo de la respuesta inmune adquirida, tanto celular

como humoral, es la que conlleva a la eliminación del parásito en un período que varía entre 15 y 20 días (Nash, 2001).

Hasta el presente, el control de la giardiasis se haya 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 (Gardner and Hill, 2001). Aunque efectivas en un 85% y 95% para resolver la enfermedad, estas drogas presentan diversos efectos colaterales como el sabor metálico, molestia abdominal, dolor de cabeza (Upcroft et al., 1990) e incluso se han informado efectos carcinogénicos en animales de experimentación (Goldman et al., 1980). Otras drogas de uso común como el benzemidazol y albendazol, desestabilizan el citoesqueleto del parásito. Estos medicamentos resultan económicos y parcialmente efectivos para el tratamiento de la giardiasis, pero su utilización ha sido cuestionada por los efectos colaterales observados en los pacientes y por la generación de cepas resistentes a largo plazo en reiterados casos clínicos (Lalle, 2010).

### **1.3. *Giardia***

#### **1.3.1. Ubicación Taxonómica y Evolución**

*Giardia* fue descubierta en 1681 por el científico holandés *Anton Van Leewenhoek*, descrita detalladamente por *Vilem Dusan Lambl* recién en 1859, y reconocida como género por *Kunstlerm* en 1882 (Feely and Erlandsen, 1981) incluyendo a todos los organismos comprendidos taxonómicamente en el Phylum Metamonada (Cavalier-Smith, 1981), Subphylum Trichozoa (Cavalier-Smith and Chao, 1996; Cavalier-Smith, 1998; Cavalier-Smith, 2003), Superclase Eopharyngia, Clase Diplomonada, Subclase Diplozoa, Orden Giardiida (Cavalier-Smith and Chao, 1996), Familia Giardiidae (Cavalier-Smith, 2003), de acuerdo a los criterios sistemáticos basados en genética, estructura y bioquímica.

Dentro de los protozoarios, *Giardia* pertenece al grupo de los diplomonadidos, organismos de ambientes anaeróbicos o microaerófilos descritos como verdaderos “fósiles vivientes” por la presencia de un código genético diferencial, la pérdida de una mitocondria aeróbica y un aparato de Golgi típico y la conservación de ciertas características propias de bacterias y arqueobacterias, como por ejemplo la presencia de enzimas metabólicas bacterianas. Estudios de comparación de ARN nucleolares pequeños de Arqueas y eucariotas unicelulares, ubican taxonómicamente a *Giardia* dentro de la rama Excavata, cerca del punto de divergencia entre bacterias y eucariotas, y la definen como una célula eucariota ancestral (Wielinga and Thompson, 2007; Dacks et al., 2008; Ankarklev et al., 2010); condición confirmada por los 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, *Factor Elongation 1 and 2*) (Sogin et al., 1989; Hashimoto et al., 1994; Hashimoto et al., 1995; Baldauf et al., 2000). Estos hallazgos reflejan, para algunos autores, la adaptación a un ambiente microaerófilo más que una divergencia temprana en la evolución (Hashimoto et al., 1998; Landweber and Katz, 1998; Roger et al., 1998; Smith et al., 1998; Andersson et al., 2003). Aún discutida su condición de célula eucariota ancestral y simple, o de eucariota complejo derivado de eventos de evolución reductiva, la simplicidad y reducción de los sistemas eucariotas estándares presentes en *Giardia* acrecientan su importancia como sistema modelo para el estudio de la maquinaria macromolecular de eucariotas (Gillin et al., 1996; Lujan et al., 1997).

### **1.3.2. Nomenclatura**

Una apropiada clasificación para las especies de *Giardia* resulta crítica para la comprensión de la patogénesis y epidemiología de la infección. Inicialmente, el género *Giardia* fue dividido en especies en base al hospedador original del patógeno. No obstante, la presencia de parásitos morfológicamente idénticos obtenidos de diferentes especies animales, demostró la necesidad de complementar los estudios para su clasificación. Así, por ensayos de microscopia óptica y microscopia electrónica, se identificaron seis especies con características celulares y formas diferentes (Adam, 2001). Cinco de ellas representan aislados específicos de anfibios (*G. agilis*), aves (*G. ardeae*, *G.*

*psittaci*), ratas y ratones (*G. muris*) y ratón de campo (*G. microti*) (McRoberts et al., 1996; Adam, 2001; Lalle et al., 2005). La sexta especie, en tanto, afecta un amplio rango de mamíferos hospedadores, incluyendo al hombre, y fue denominada *G. duodenalis* (idem *intestinalis, lamblia*) por Filice en 1952 (Wielinga and Thompson, 2007). Aún cuando en la actualidad no se haya establecido un criterio que avale el uso de uno u otro nombre, el término de *Giardia lamblia*, introducido en 1915 por Charles Wardell Stiles y sus colaboradores, es el empleado en la mayoría de los trabajos científicos y resultará la denominación empleada en este *Trabajo de Tesis*.

Por otra parte, han sido detectadas diferencias sustanciales en la secuencia de genes que codifican para las diversas enzimas y proteínas dentro de la misma especie *G. lamblia*, dando origen a una nueva nomenclatura que agrupa a genotipos cercanos en grupos genéticos o ensamblajes, luego de que diversos estudios filogenéticos eliminaran la posibilidad de que estas diferencias se debieran a heterogeneidad entre copias del gen o a variaciones intragenotípicas (Monis et al., 2003). Se definieron entonces los grupos A, B, C, D, E, F, G y H, demostrándose por estudios moleculares que la mayoría de los genotipos presentan diferentes preferencias por los hospedadores (**Tabla 1.1**) (Thompson et al., 2000; Monis et al., 2003).

**Tabla 1.1: Grupos genéticos de *Giardia* y sus hospedadores**

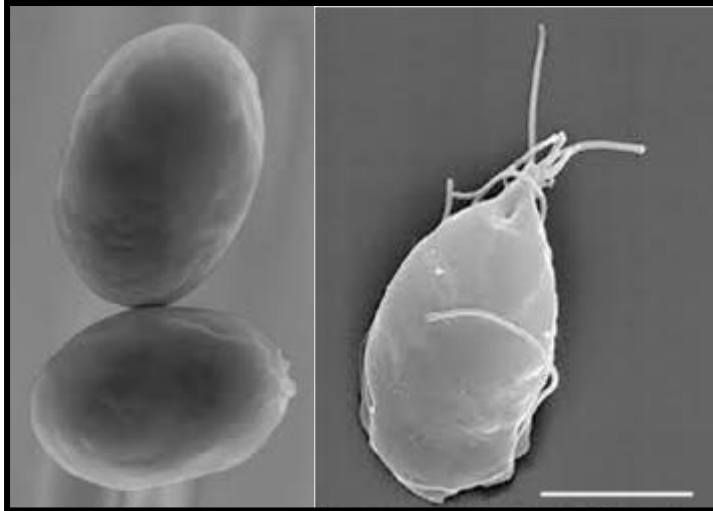
Grupo	Hospedador/es
A	Humanos, Perros, Gatos, Ovinos, Porcinos, Chinchillas, Bovinos, Caballos, Castores, Alpaca
B	Humanos, Perros, Ratas, Ratones, Chinchillas, Castores
C	Perros
D	Perros
E	Bovinos, Porcinos, Ovinos
F	Gatos
G	Ratas
H	Focas, Gaviotas

De los grupos A y B que infectan humanos, los aislados pertenecientes al grupo A han sido los más estudiados a nivel celular y molecular; en tanto, los aislados pertenecientes al grupo B presentan mayor prevalencia a nivel mundial (Caccio et al.,

2008). De ambos grupos, sólo dos aislados se han establecido en cultivos *in vitro*, uno de ellos se obtuvo de un paciente infectado en Afganistán (cepa *WB*, grupo A) y el otro proviene de Alaska (cepa *GS*, grupo B). A su vez, se puede cultivar *in vitro* la cepa *P15*, del grupo E. A lo largo del tiempo se han observado claras diferencias entre los grupos A y B, como la capacidad de proliferar y de formar quistes *in vitro* y la capacidad de generar infecciones en ratones. Se han informado también diferencias bioquímicas y relacionadas a los síntomas clínicos que ambas cepas (*WB* y *GS*) producen. Desde hace varios años se pretende establecer una relación entre virulencia (y por lo tanto severidad de la infección) y la presencia de una determinada cepa de *Giardia*. Sin embargo, hasta el momento los resultados son contradictorios debido, en parte, a la escasez de datos publicados y a la falta de genotipificación de las cepas en casos de giardiasis (Mahbubani et al., 1992; Homan et al., 1998; Hopkins et al., 1999; Monis et al., 1999; Sulaiman et al., 1999; McIntyre et al., 2000; Amar et al., 2002; Caccio et al., 2002). Hace unos años se secuenció completamente el genoma de la cepa *WB* y recientemente el de la cepa *GS*, compartiendo ambas un 85% aproximadamente de similitud en sus genomas. Todos estos hallazgos han llevado a plantear si ambos genotipos pertenecen o no a la misma especie, una discrepancia que, hasta el momento, no ha sido resuelta (Wielinga and Thompson, 2007).

### **1.3.3. Biología Celular: Características Morfológicas Generales de *Giardia***

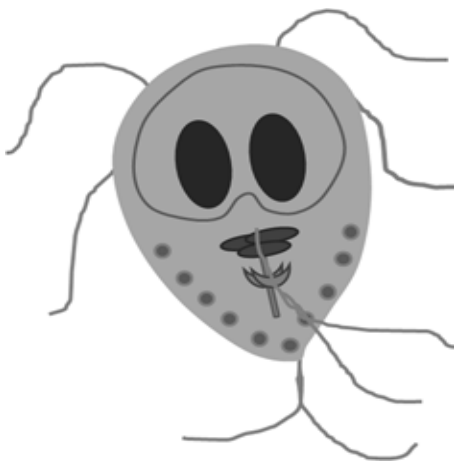
Durante su ciclo de vida, *Giardia lamblia* experimenta cambios bioquímicos y morfológicos significativos que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables (Lujan, 2011). En el ciclo de vida de *Giardia* predominan dos formas o estadios diferentes (**Figura 1.1**). Dentro del intestino delgado del hospedador vive y prolifera el trofozoíto: la forma celular activa que coloniza y parasita las células del intestino delgado (Panel derecho). Fuera del ambiente nutricional que le provee el hospedero, el parásito vive como quiste: estructura resistente de muy baja actividad metabólica que constituye la forma de diseminación a otros hospedadores susceptibles (Panel izquierdo) (Adam, 2001).



**Figura 1.1: El trofozoíto y quiste de *Giardia lamblia*.** Microscopía electrónica de barrido mostrando a la derecha un trofozoíto de *Giardia* (vista dorsal) y a la izquierda la forma quística. Escala: 5 µm.

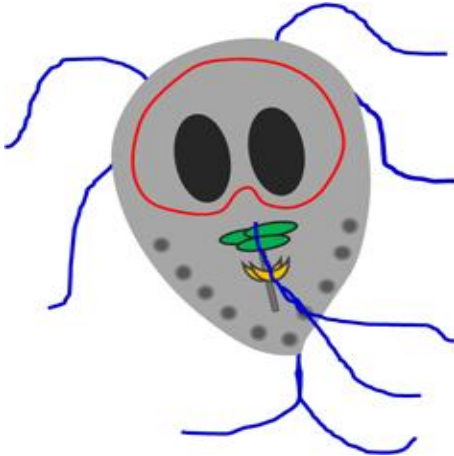
*Giardia* no requiere hospedador intermedio ni posee reproducción sexual, siendo su ciclo de vida tan simple que en la actualidad es posible reproducirlo enteramente *in vitro* (cultivo axénico), imitando los estímulos fisiológicos característicos del hospedador (Boucher and Gillin, 1990). Esta herramienta representa un instrumento útil no sólo para estudiar procesos generales de la diferenciación celular, sino también mecanismos de adaptación desarrollados por *Giardia* y otros parásitos intestinales que manifiestan conductas similares.

### 1.3.3.1. El Trofozoíto



El trofozoíto de *Giardia* mide de 9 a 15 µm de largo y de 5 a 9 µm de ancho y es de morfología piriforme, como se muestra en el esquema, convexo dorsalmente y con una concavidad ventral, presentando simetría bilateral. Posee dos núcleos ovoides y diploides con membrana nuclear, sin nucléolos distinguibles morfológicamente. 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 (Bingham et al., 1979; Yu et al., 2002) y contienen la misma cantidad de ADN y el mismo número de genes y

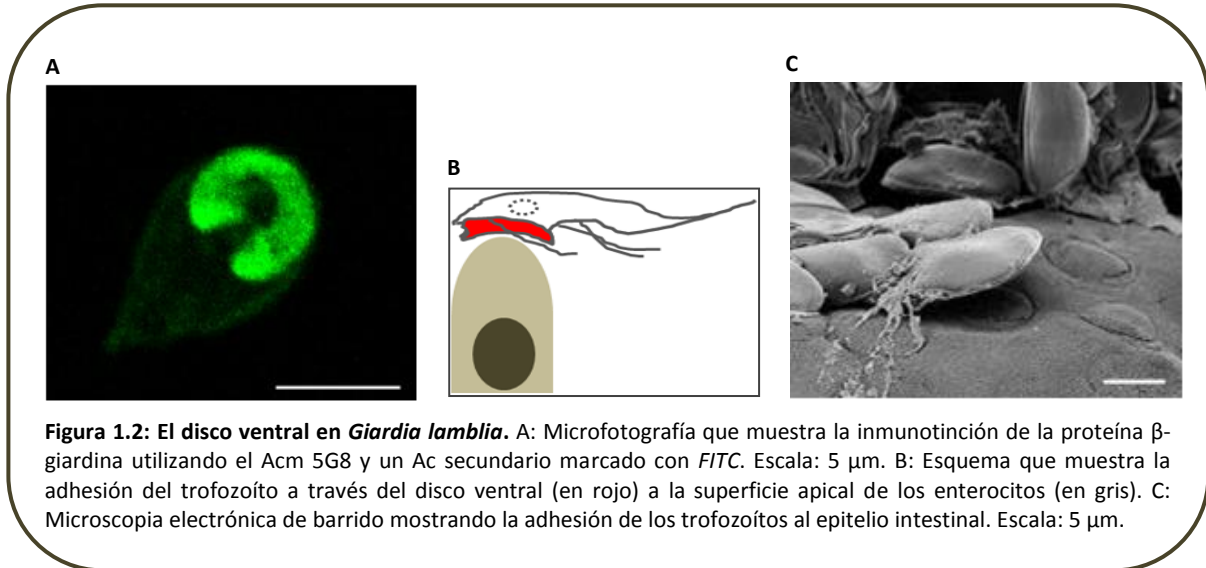
cromosomas (cinco principales), aunque algunos estudios sugieren diferencias entre ellos (Ankarklev et al., 2010).



El citoesqueleto de *Giardia* se encuentra formado por estructuras microtubulares y constituye un factor determinante en la virulencia del parásito, interviniendo en funciones como locomoción, adhesión celular, mantenimiento de la morfología celular y replicación. Como se muestra en el esquema, incluye cuatro pares de flagelos, un disco ventral, un cuerpo medio y una estructura denominada funis. Los flagelos y el disco ventral se

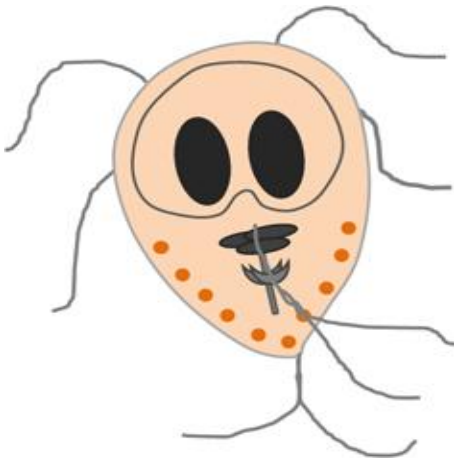
componen de proteínas típicas del citoesqueleto, como las  $\alpha$  y  $\beta$  tubulinas y proteínas ácidas con un alto contenido de  $\alpha$ -hélices, conocidas como giardinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  giardinas) que son características de las especies de *Giardia*. Los cuatro pares de flagelos (en color azul en el esquema) 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 otorgar motilidad al parásito, permitiéndole movilizarse dentro de la cavidad intestinal (Elmendorf et al., 2003). Además, se sugiere que pueden ser importantes durante el desenquistamiento, ya que son las primeras estructuras que emergen del quiste (Buchel et al., 1987). El disco ventral o adhesivo (en color rojo en el esquema) es una estructura cóncava, con un ancho de 0.4  $\mu$ m, que media la unión mecánica no sólo a la pared intestinal sino también a la superficie del contenedor utilizado para el cultivo axénico. Como tal, se halla constituido por proteínas contráctiles como  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, actina,  $\alpha$ -actinina, miosina, tropomiosina (Feely et al., 1982) y giardinas (Peattie et al., 1989). En la **Figura 1.2** se observa una inmunofluorescencia (IF) del disco ventral utilizando un anticuerpo monoclonal (Acm) dirigido contra  $\beta$ -giardina en trofozoítos en crecimiento (**Figura 1.2A**). 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 (**Figura 1.2By C**) (Adam, 2001).



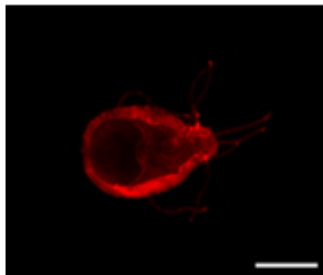
Además de su función en la adhesión celular, recientemente se propuso que el disco ventral también estaría involucrado en el proceso de cariocinesis durante la división celular de *Giardia* (Solari et al., 2003; Benchimol, 2004). El cuerpo medio (en color verde en el esquema) se localiza en la línea media del trofozoíto siendo una estructura microtubular única del género *Giardia*. Su morfología ayuda a definir diferentes especies, utilizándose como herramienta taxonómica. Aunque su función es todavía desconocida se sugiere que podría estar relacionada a la progénesis del disco ventral (Campanati et al., 2003; Benchimol, 2004). El funis (en color amarillo en el esquema) 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* (Benchimol et al., 2004).



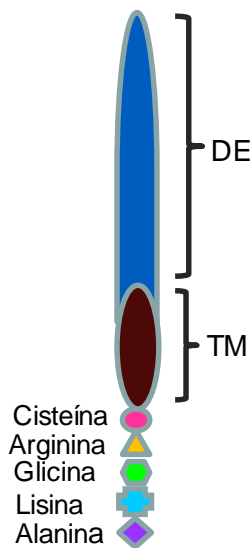


*G. lamblia* presenta un sistema de endomembranas atípico (Gillin et al., 1996; Lujan and Touz, 2003), caracterizado por la presencia de Retículo Endoplásmico (RE) y vacuolas periféricas (PVs del inglés, Peripheral Vacuoles) y por la ausencia de otras organelas típicas de eucariotas superiores como por ejemplo endosomas, lisosomas, mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi. Las PVs (círculos de color naranja en el esquema) se ubican en la periferia de los trofozoítos y son compartimientos ácidos con actividad hidrolítica. La propiedad de estas vesículas periféricas de acumular macromoléculas exógenas y enzimas hidrolíticas sugiere que este parásito posee un sistema endosomal/lisosomal representado en esta última organela (Lanfredi-Rangel et al., 1998; Rivero et al., 2010). Las enzimas hidrolíticas presentes en estas vesículas no sólo cumplen un rol en la subsistencia del parásito sino que también participan en distintos procesos como el desenquistamiento (Slavin et al., 2002) o el procesamiento de proteínas para la formación de la pared del quiste (Touz et al., 2002), siendo estas organelas fundamentales para que se complete el ciclo de vida del parásito.

La superficie del trofozoíto de *Giardia* (incluyendo los flagelos y el disco ventral) se encuentra completamente cubierta por un miembro perteneciente a una familia de proteínas ricas en cisteínas denominadas VSPs (del inglés, Variant- Specific Surface Proteins) (Pimenta et al., 1991; Nash and Mowatt, 1992; Nash, 1997; Prucca and Lujan, 2009) (Figura 1.3).



**Figura 1.3: VSPs.** Microfotografía de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) realizada en trofozoítos de *Giardia* incubados con el Acm anti-VSP9B10, revelado con un Ac secundario marcado con *Texas Red* (en rojo). Escala: 5  $\mu$ m



A pesar de mostrar gran variabilidad en su masa molecular, de entre 22 y 200 kDa (Nash and Mowatt, 1992; Prucca and Lujan, 2009), todas las *VSPs* son proteínas integrales de membrana y cubren la superficie del parásito formando una verdadera interface entre éste y el medio extracelular (Pimenta et al., 1991; Prucca and Lujan, 2009). Estructuralmente, las *VSPs* se caracterizan por poseer un extremo N-terminal expuesto al medio extracelular (DE: Dominio Extracelular en la representación gráfica), altamente variable entre los miembros de la familia y rico en cisteínas (motivos CXXC) con capacidad de unir zinc y hierro (Adam,

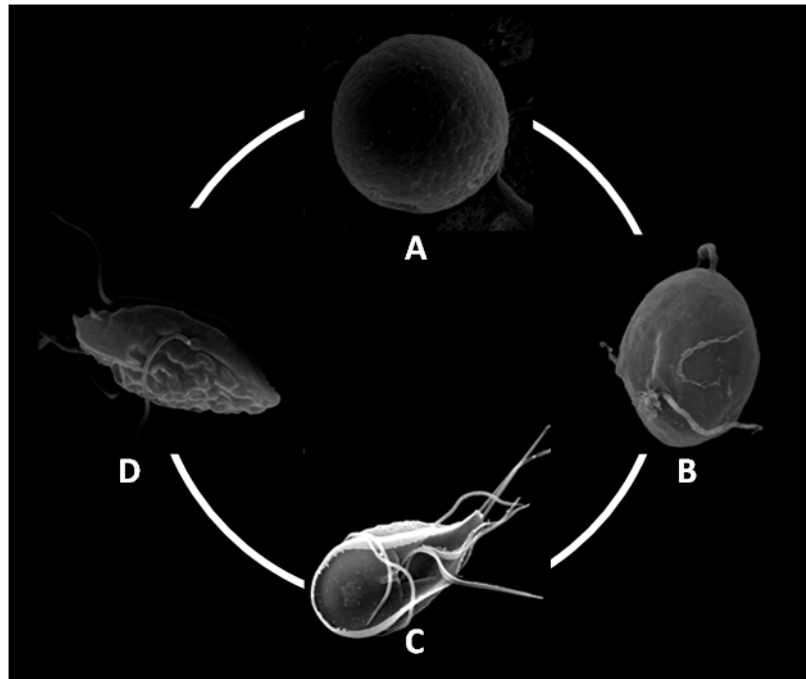
2001; Prucca and Lujan, 2009). Por el contrario, el dominio C-terminal de aproximadamente 38 aminoácidos es muy conservado entre las *VSPs*, presentando un segmento hidrofóbico que le permite anclarse a la membrana plasmática (TM: Transmembrana) (Mowatt et al., 1991; Prucca and Lujan, 2009), y un extremo citosólico invariable compuesto por sólo 5 aminoácidos: Cisteína (C), Arginina (R), Glicina (G), Lisina (K) y Alanina (A) (Nash and Mowatt, 1992; Prucca and Lujan, 2009) y una señal de poliadenilación (Mowatt et al., 1991; Nash and Mowatt, 1992; Zhang et al., 1993). A pesar de la conservación en la estructura primaria del tallo citosólico, el repertorio de *VSPs* difiere ampliamente entre los grupos de *Giardia*, añadiendo diversidad antigénica a la variedad de hospedadores (Nash and Mowatt, 1992) y, aunque extensos datos revelan la caracterización estructural de las *VSPs*, pocos estudios han logrado relacionar estas características con la biología del parásito.

### 1.3.3.2. El Quiste

El quiste de *Giardia* es una estructura de morfología elipsoidal con 9 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud por 5 a 8  $\mu\text{m}$  de ancho, caracterizado por la presencia de una pared quística refráctil de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor adosada a la membrana plasmática, y constituida por proteínas y filamentos de carbohidratos (Jarroll et al., 1989; Manning et al., 1992). En su interior, el quiste contiene: cuatro núcleos, restos de flagelos, vesículas periféricas,

cuerpos basales y los axonemas de los flagelos, como así también el axostilo asociado con el flagelo caudal, fragmentos cortos del RE, cuerpo medio y porciones fragmentadas del disco ventral (Loftness et al., 1984). La pared del quiste consiste de una capa externa filamentosa de aproximadamente de 7 a 20 nm de espesor que envuelve una doble membrana interna, separadas entre sí por el espacio periplásmico (Erlandsen et al., 1989). 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. La red filamentosa impide el pasaje de grandes moléculas, mientras que las membranas controlan el ingreso de las pequeñas haciendo de la pared del quiste una estructura con permeabilidad selectiva (Adam, 2001). Análisis bioquímicos de la capa filamentosa demuestran que se haya constituida por proteínas (37%) y carbohidratos (63%), siendo el azúcar predominante un homopolímero de N-acetil-galactosamina ( $\beta(1,3)$ -D-GalNAc) (Jarroll et al., 1989; Manning et al., 1992). En cuanto a las proteínas que forman la pared quística, hasta el momento se han descrito cuatro polipéptidos: tres de ellos se conocen con el nombre de *CWPs* (del inglés, *Cyst Wall Proteins*) y, el otro, una proteína de superficie rica en cisteína, tipo proteína variable de superficie, denominado *HCNCp* (del inglés, *High Cysteine Non-variant Cyst protein*) (Lujan et al., 1995b; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003; Davids et al., 2006). Estas proteínas se encuentran ausentes en el estadio de trofozoíto, y su síntesis es regulada particularmente durante el proceso de formación del quiste.

### 1.3.4. Ciclo de Vida de *Giardia lamblia*



**Figura 1.4:** Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. Los quistes (A) a través de un proceso de desenquistamiento (B) que comienza en el estómago, 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.

La infección por *Giardia* se inicia con la ingesta de los quistes que, por exposición al contenido ácido del estómago y a proteasas del duodeno, liberan los trofozoítos en un proceso denominado **desenquistamiento (Figura 1.4A.B.C)** (Bernander et al., 2001). Dado que de otra forma serían destruidos por el medio ácido estomacal, los trofozoítos no emergen del quiste sino hasta llegar al intestino delgado (Bingham et al., 1979), donde se multiplican y colonizan el epitelio del yeyuno. La infección puede permanecer por semanas, meses e incluso años (Smith et al., 1983). Los trofozoítos se adhieren a los enterocitos a través del disco ventral (**Figura 1.2**), causando la sintomatología característica de la enfermedad sin disparar una respuesta inflamatoria pronunciada (Kim et al., 2009; Ropolo and Touz, 2010). La adhesión a la superficie de las células intestinales es crucial para que la división celular, a través de fisión binaria, se lleve a cabo. Mediante movimientos progresivos (tendiendo a rotar alrededor de su eje longitudinal), los trofozoítos se desprenden del enterocito adhiriéndose a la superficie de otro, resultando

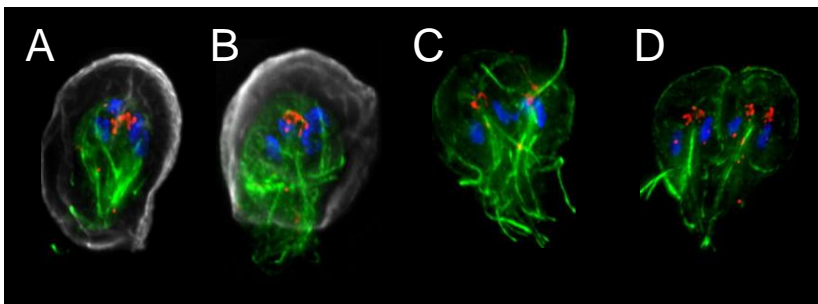
este ciclo de adhesión-disociación necesario para asegurar la colonización del epitelio intestinal del hospedador (Elmendorf et al., 2003). Un mecanismo clave que le permite al trofozoíto permanecer en el intestino, evadiendo la respuesta inmune humoral es el proceso de **variación antigénica** (ver en detalle más abajo). Luego de un período de tiempo variable, algunos de estos parásitos descienden por el tracto intestinal, disparándose en las porciones más bajas del yeyuno su diferenciación a quiste o **enquistamiento** (Figura 1.4C.D.A) que completa así el ciclo de vida del parásito (Thompson, 2000). Finalmente, los quistes son liberados con las heces, donde pueden permanecer durante meses en el estadio de latencia.

Durante todo su ciclo de vida, *G. lamblia* experimenta cambios bioquímicos y morfológicos significativos, desarrollando diversos mecanismos de adaptación a las diversas condiciones por las que atraviesa. Mecanismos como el desenquistamiento, la variación antigénica y el enquistamiento le permiten sobrevivir en condiciones altamente desfavorables, y se describen en detalle a continuación.

### 1.3.5. Mecanismos de Adaptación en *Giardia lamblia*

#### 1.3.5.1. Desenquistamiento

Aunque poco se conoce sobre los mecanismos moleculares que lo regulan, el desenquistamiento se origina en el estómago del hospedador y se completa en el intestino delgado, ocasionando la diferenciación rápida (aproximadamente 15 min) de los quistes a la forma vegetativa del parásito (Figura 1.5).



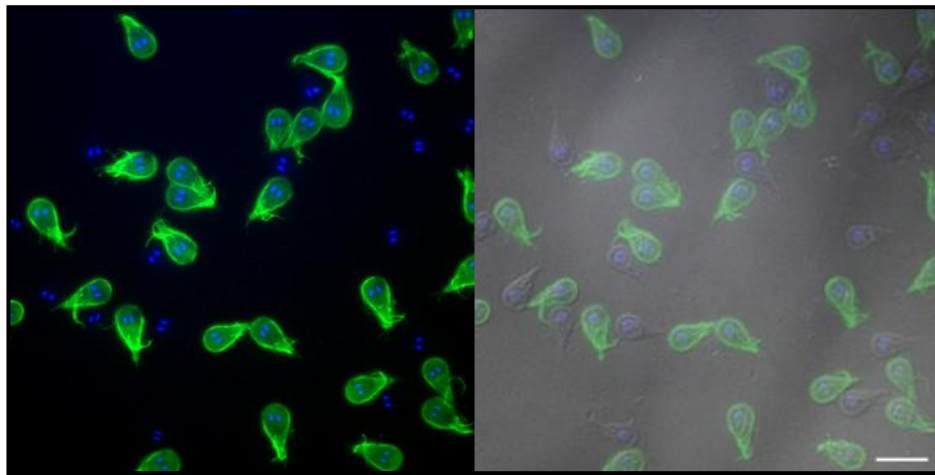
**Figura 1.5: Estadios del desenquistamiento en *Giardia lamblia*.** Ensayo de IFI en donde se observa el proceso de desenquistamiento de *Giardia* mostrando la proteína tubulina (en verde), los núcleos en DAPI (del inglés, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (en azul), la proteína centrina (en rojo) y la pared del quiste (en gris) (Carpenter et al., 2012).

Se ha sugerido que cuando *Giardia* se encuentra en el estómago, genera una señal mediada por calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en respuesta al ambiente ácido, que es captada a través de la pared quística causando la respuesta molecular, estructural y fisiológica que induce el desenquistamiento (Bernal et al., 1998; Hetsko et al., 1998; Reiner et al., 2003). Este estímulo, activa la liberación de enzimas presentes en las PVs al espacio periplásmico. En un primer paso, una fosfatasa ácida que se localiza en las PVs desfosforila las CWP (Slavin et al., 2002) para luego permitir la acción de proteasas intestinales y la digestión de la pared quística (Ward et al., 1997). Luego de la ruptura de la pared del quiste, se produce la separación del espacio periplásmico de la cara prefrontal del trofozoíto emergente (**Figura 1.5A**), y la salida del flagelo (a través de uno de los polos de la pared del quiste) que es seguida por la del trofozoíto entero (**Figura 1.5B**). La cariocinesis ocurre durante el desenquistamiento, razón por la cual el trofozoíto emergente posee cuatro núcleos (**Figura 1.5C**). En el paso final, el trofozoíto sufre una citocinesis dando lugar a dos células formadas a partir de un único quiste (**Figura 1.5D**), que emergen de la pared quística degradada mediante rápidos movimientos de su cuerpo celular y de los ocho flagelos (Boucher and Gillin, 1990). Inmediatamente después de la liberación, los trofozoítos sufren divisiones sucesivas, se adhieren al epitelio intestinal y colonizan el intestino delgado. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  junto a la fosforilación y desfosforilación de proteínas, representan actores claves en la coordinación del proceso de desenquistamiento (Reiner et al., 2003).

### 1.3.5.2. Variación Antigénica

En *Giardia*, la Variación Antigénica (VA) involucra el continuo cambio de antígenos de superficie altamente inmunogénicos con el fin de confrontar el ambiente hostil del intestino superior (Nash et al., 2001; Prucca and Lujan, 2009), diversificar la infección a un amplio rango de hospedadores (Nash, 2002; Prucca and Lujan, 2009) y evadir la respuesta inmune del hospedador (Pimenta et al., 1991; Nash, 1997; Prucca and Lujan, 2009), causando infecciones crónicas y recurrentes. Inicialmente la VA fue descrita como un fenómeno *in vitro* (Nash and Keister, 1985; Nash and Aggarwal, 1986; Muller and Gottstein, 1998; Prucca and Lujan, 2009), observándose luego en infecciones humanas y

animales de laboratorio (Nash et al., 1988; Nash et al., 1990a; Muller and Gottstein, 1998). Se demostró así, que utilizando un Ac dirigido hacia una determinada *VSP* sólo una parte de la población de trofozoítos da reacción positiva, mostrando otra población ausencia de marcación debido a que expresan otra *VSP* en su superficie (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6. Variación Antigénica en *Giardia lamblia*.** Ensayo de IFI mostrando la expresión de la *VSP9B10* revelada con un Ac secundario marcado con *FITC* (en verde), en algunos de los trofozoítos de una población de la cepa *WB*. En azul: *DAPI*. Escala: 10µm

En la mayoría de los microorganismos parásitos el proceso de VA se asocia principalmente con la evasión de la respuesta inmune. En numerosos trabajos realizados tanto en pacientes como en animales de experimentación infectados con *Giardia*, se observó que la presencia de anticuerpos dirigidos contra las *VSPs* es de suma importancia, principalmente en las primeras etapas de la respuesta inmune, aunque se ha informado que son prescindibles para la resolución de la infección (Singer et al., 2001). Se ha descrito además que la VA ocurre incluso en ausencia de presión inmunológica (Nash, 2002; Prucca and Lujan, 2009), sugiriendo que este proceso es determinado genéticamente (Prucca and Lujan, 2009). En estudios *in vivo* a través de infecciones con una cepa clonal de *Giardia lamblia* en animales inmunocompetentes, se observó un cambio en la proteína expresada en superficie concomitantemente con la aparición en suero de anticuerpos contra la *VSP* de la cepa inmunizante. En el caso de infecciones en

animales inmunodeprimidos, sin embargo, no se observó VA de los trofozoítos en el intestino delgado, incluso luego de varias semanas posteriores a la infección (Stager and Muller, 1997; Singer and Nash, 2000). Coincidente con estos resultados, se demostró en ensayos *in vitro*, que la VA depende de la concentración de anticuerpos que se agregue en los cultivos de *Giardia* (Nash and Aggarwal, 1986). De este modo, se observó que altas concentraciones de anticuerpos generan una inmediata inmovilización, seguida del desprendimiento y agregación de de la población inmunoreactiva, y el desarrollo de una nueva población de células sobrevivientes al efecto citotóxico que expresa un antígeno de superficie diferente (Nash and Aggarwal, 1986; Prucca and Lujan, 2009). Sin embargo, concentraciones de anticuerpos moderadas o bajas, no producen citotoxicidad pero inducen el proceso de VA, reemplazándose la VSP expresada en la superficie del trofozoíto por otra antigénicamente diferente (Nash and Aggarwal, 1986).

En los últimos 20 años, varios laboratorios han hecho grandes esfuerzos por esclarecer los mecanismos que regulan la VA en *G. lamblia*. Los primeros estudios se basaron en la premisa de que el cambio de expresión de los genes que codifican VSPs se realizaba en la fase de transcripción y en regiones o dominios reguladores con la información necesaria para la expresión diferencial de estos genes (Adam, 2001). No obstante, se encontró que muchos de los genes que codifican para VSPs no poseen esas regiones reguladoras o muestran una gran variabilidad en las mismas, impidiendo una regulación a nivel transcripcional. Recientemente, se propuso que el control de la expresión de las VSPs sería post-transcripcional involucrando un mecanismo similar al ARN de interferencia. En células eucariotas, se demostró que la generación de un ARN antisentido homólogo a la secuencia a silenciar, conduce a la formación de ARN de doble hebra que es rápidamente degradado por una ARNasa específica, impidiendo la transcripción del gen en cuestión y la expresión de la proteína asociada. Para el caso de *Giardia*, se encontró que todas las VSPs son transcriptas al mismo tiempo y que la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (*RdRP* del inglés, *RNA-dependent-RNA Polymerase*) genera ARNs antisentidos homólogos a las secuencias de ARN de las VSPs, y capaces de formar ARNs de doble hebra posteriormente reconocidos por las enzimas ARN helicasa y



*Dicer*, y clivados en fragmentos de 22 a 25 nucleótidos de largo (ARNs cortos). Aún falta determinar de qué manera sólo un transcripto evade este mecanismo de ARN de interferencia, postulándose que la *VSP* que posee mayor concentración citoplasmática es capaz de superar este mecanismo de “control” y evadir el silenciamiento, para ser traducida y expresada en la superficie del parásito (Prucca and Lujan, 2009).

### 1.3.5.3. Enquistamiento

El enquistamiento consiste, en términos generales, en la transformación gradual del trofozoíto móvil, binucleado y de forma piriforme a la forma inmóvil, tetranucleada y ovalada del quiste (Gottig et al., 2006; Lauwaet et al., 2007). Esta transformación puede ser reproducida *in vitro* tan sólo por el cambio en el medio de cultivo (Gillin et al., 1987), lo que permite utilizar a este mecanismo como modelo experimental para estudiar los eventos bioquímicos y genéticos fundamentales de la diferenciación celular y del tráfico vesicular de células eucariotas. El enquistamiento de *G. lamblia* involucra la síntesis de las proteínas *CWPs* que, luego de ser transportadas en vesículas de enquistamiento (*ESVs* del inglés, *Encystation Specific Vesicles*) hacia la membrana plasmática, se liberan por un mecanismo de exocitosis para formar la pared del quiste (Adam, 2001). Se han descrito tres fases claramente distinguibles en el proceso, e involucran: (a) la recepción del estímulo de enquistamiento, el envío de la señal a los núcleos y la activación de genes específicos, (b) la síntesis de componentes de la pared del quiste y la biogénesis de organelas secretoras necesarias para el transporte de estos componentes, (c) el ensamblado de materiales para formar la pared extracelular. En los próximos párrafos se describen cada uno de estos mecanismos en detalle.

#### **a) Recepción del estímulo de enquistamiento, envío de la señal a los núcleos y activación de genes específicos:**

La privación de colesterol es necesaria y suficiente para iniciar el proceso de enquistamiento en *Giardia*. Este parásito no puede sintetizar colesterol *de novo* y debe incorporarlo del intestino delgado del hospedador. Debido a que el éste absorbe casi por completo este lípido en el yeyuno e íleon, la concentración de colesterol va disminuyendo a lo largo del tracto intestinal, que sensada por el parásito genera una señal que dispara el

proceso de enquistamiento (Lujan et al., 1996a). Se ha encontrado que las sales biliares también inducen el proceso de diferenciación a quiste en *Giardia*, aunque por un mecanismo indirecto debido a que forman micelas estables con el colesterol, reduciendo aún más la disponibilidad del lípido para el parásito. Aún cuando todavía se desconoce de qué manera *Giardia* detecta los bajos niveles de colesterol y cómo esta señal se traduce en una regulación de los genes específicos del enquistamiento, es posible que un cambio en la fluidez de la membrana modifique la actividad de enzimas ancladas a la misma, produciendo la activación de vías de transducción de señales específicas hacia los núcleos (Lujan et al., 1997).

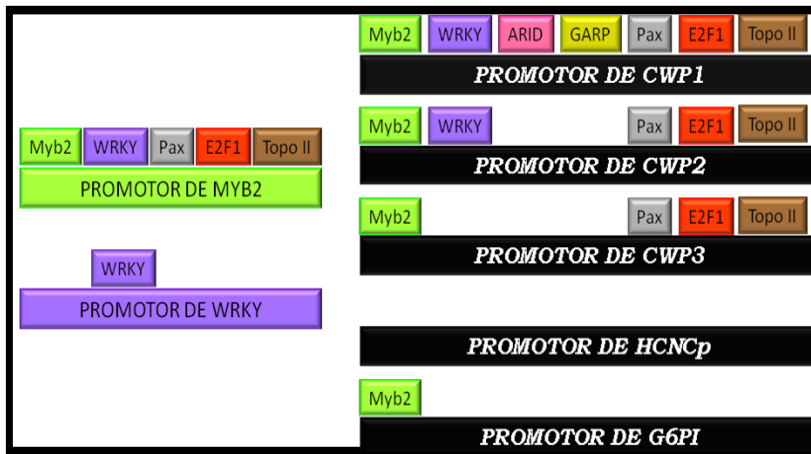
**b) Síntesis de componentes de la pared del quiste y biogénesis de organelas secretoras necesarias para el transporte de estos componentes:**

Las proteínas que han sido caracterizadas como formadores de la pared del quiste son los tres miembros de la familia de las *CWPs*, la proteína *HCNCp* y, más recientemente, una familia de proteínas denominadas *EGFCP* (del inglés, *Epidermal Growth Factor (EGF) - like Cyst Protein*) (Chiu et al., 2010). Se ha determinado que la expresión de estas proteínas aumenta considerablemente cuando los trofozoítos son inducidos a enquistarse (Gottig et al., 2006). El enquistamiento involucra, además, una serie de cambios morfológicos en los trofozoítos que pierden su capacidad de adhesión, se redondean y se cargan de *ESVs*. Estas vesículas, ausentes en trofozoítos en crecimiento, son gránulos electrodensos formados *de novo*, grandes y morfológicamente irregulares, que transportan las proteínas del enquistamiento y polisacáridos liberados luego al exterior para constituir la pared del quiste (Faubert et al., 1991; Gottig et al., 2006; Touz et al., 2008).

*CWP1*, *CWP2* y *CWP3* son proteínas ácidas de 26, 39 y 27 kDa, respectivamente; y a nivel estructural, se caracterizan por presentar un péptido señal N-terminal hidrofóbico que dirige las proteínas al RE y de allí a la vía secretora (Hehl et al., 2000; Sun and Soutar, 2003). La región central de las *CWPs* contienen repeticiones adyacentes ricas en leucina (*LRRs* del inglés, *Leucine-Rich Repeats*) asociadas a interacciones proteína-proteína que serían necesarias para el ingreso de las *CWPs* a las *ESVs* y para su incorporación a la pared

del quiste (Lujan et al., 1995a). En su extremo C-terminal, las *CWPs* presentan un dominio rico en cisteínas, que participa en la formación de puentes disulfuro y permite la formación de oligómeros entre ellas (Lujan et al., 1995b). Una característica diferencial de la *CWP2* es la presencia de una extensión C-terminal básica, de 121 residuos de aminoácidos (13 kDa), que es clivada proteolíticamente antes del ensamble de la pared del quiste (Gottig et al., 2006).

La expresión de las *CWPs* incrementa inmediatamente después de la inducción del enquistamiento (Mowatt et al., 1995) al igual que otras proteínas como la glucosamina-6-fosfato isomerasa (*G6PI* del inglés, *Glucosamine 6 Phosphate Isomerase*), involucrada en la biosíntesis del carbohidrato  $\beta(1,3)$ -D-GalNAc (Knodler et al., 1999) y la proteína *BiP* (del inglés, *Immunoglobulin heavy chain-Binding Protein*) (Lujan et al., 1996b; Kim et al., 2009). Se han descrito, además, varios factores de transcripción involucrados en la regulación del enquistamiento, cuya expresión también aumenta durante el proceso, aún cuando resta dilucidar de qué manera se produce la cascada que activa la transcripción génica. Estos factores de transcripción son análogos a los involucrados en la diferenciación y regulación del ciclo celular de células eucariotas superiores, e incluyen al *Myb2* (del inglés, *Myeloblastosis-related transcription factors*); *WRKY*, *Pax* (del inglés, *Paired Box*), *E2F1*, la enzima Topoisomerasa II (Topo), *ARID* (del inglés, *AT-rich interaction domain*) y *GARP* (del inglés, *Golden Arabidopsis response Regulator Protein*) (**Figura 1.7**). *Myb2* es capaz de unirse a regiones promotoras de los genes *cwp1*, *cwp2*, *cwp3*, *g6pi* y a su propio promotor, y se ha demostrado que *WRKY*, *Pax*, *E2F1* y TOPO se unen a regiones promotoras de los genes de *cwps* y al promotor de *myb2*. *WRKY* también se une a su propio promotor, en tanto *ARID* y *GARP* se expresan durante el crecimiento y enquistamiento, incrementando su expresión muy levemente durante el proceso de diferenciación a quiste, poniendo en duda su participación al respecto.



**Figura 1.7: Factores de transcripción involucrados en el enquistamiento de *Giardia lamblia*.** Representación esquemática de los factores de transcripción y su participación en la regulación de la expresión de genes de enquistamiento (*cwp1*, *cwp2*, *cwp3*, *hcncp* y *g6pi*) y en la auto-regulación de los factores de transcripción *myb2* y *wrky*. Adaptado de (Carranza and Lujan, 2010)

Se propone, además, que debido a que la transcripción en *Giardia* es relativamente relajada, podrían existir factores que actúen como represores transcripcionales bloqueando la expresión de los genes específicos del enquistamiento durante el proceso de crecimiento del parásito, debiendo escindirse del ADN al momento de la diferenciación a quiste. Recientemente se ha descrito que modificaciones epigenéticas como la acetilación/deacetilación de histonas regulan el proceso de enquistamiento, posiblemente alterando la accesibilidad de factores de transcripción como *Myb2* a las regiones promotoras de los genes específicos del enquistamiento (Sonda et al., 2010). También se ha descrito una enzima, la Quinasa dependiente de Ciclina-2 (*CDK2* del inglés, *Cyclin-Dependent Kinase 2*), que mediante la fosforilación de *Myb2* induce la expresión de los genes de las *CWPs* durante el enquistamiento. De esta manera, *Myb2* parece representar un factor de transcripción clave en la diferenciación del parásito, teniendo además las modificaciones post-traduccionales de proteínas importantes implicancias en este proceso.

**c) Ensamblado de la pared quística:**

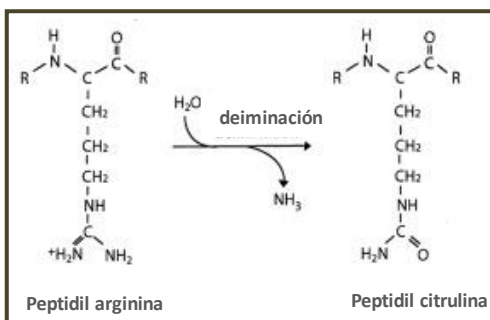
Se postula que las proteínas formadoras de la pared del quiste son liberadas a la periferia de los trofozoítos por las *ESVs* mediante exocitosis, depositándose inicialmente en la superficie del trofozoíto, mientras que los precursores de  $\beta(1,3)$ -D-GalNAc se integran luego a la pared para finalmente co-polimerizarse y formar la malla fibrilar (Gillin

et al., 1987; Mowatt et al., 1995). La formación de la pared del quiste se realiza por regiones, observándose parches de malla fibrilar dispersos en la superficie de los trofozoítos inducidos a enquistamiento, evidentes a las 15-18h posterior a la inducción. Estos parches aparecen al azar, se unen entre sí al multiplicarse y en ocasiones se superponen engrosando la malla fibrilar (Arguello-Garcia et al., 2002). Ensamblada la pared del quiste, las *ESVs* desaparecen y dentro del quiste ocurre replicación del ADN, cariocinesis y una citocinesis incompleta, razón por la que cada quiste contiene en su interior, cuatro núcleos (Gillin et al., 1987; Adam, 2001). Aunque las modificaciones post-traduccionales de proteínas parecen desempeñar un rol clave, poco se conoce acerca de cómo se regula negativamente la expresión de las *CWPs* en esta última etapa del enquistamiento, evento necesario para que se complete exitosamente el proceso.

#### 1.4. Modificaciones Post-traduccionales de Proteínas

La expresión génica en eucariotas es ejecutada por un número pequeño de reguladores, resultando este espectro incrementado por las modificaciones post-traduccionales de proteínas (Issar et al., 2008). Ampliamente distribuidas, y con alto grado de conservación en el linaje eucariota, las modificaciones post-traduccionales constituyen procesos reversibles capaces de regular la función, interacción y localización de proteínas pre-existentes permitiendo a la célula responder con rapidez a una multiplicidad de estímulos y controlando una amplia variedad de procesos celulares.

##### 1.4.1. Deiminación (Citrulinación) de Proteínas



En células eucariotas, la deiminación de proteínas es un proceso catalizado por enzimas denominadas Peptidil-Arginina Deiminasas (PADs) que transforman peptidil-arginina en peptidil-citrulina, en presencia de iones Ca<sup>2+</sup>.

La citrulina no es un aminoácido clásico y debe su nombre a *Citrullus vulgaris*, el organismo del cual fue aislado por primera vez en 1914 (Anzilotti et al., 2010).

La ausencia de ARNs de transferencia (ARNt) para este aminoácido, explica la presencia de residuos citrulina en una proteína como producto de una modificación post-traducciona que produce un aumento en la masa molecular de la proteína (de 0,984 Da), la pérdida de una carga positiva por cada arginina modificada, el cambio de su punto isoeléctrico (Orgovan and Noszal, 2011), y la habilidad para formar puentes de hidrógeno e interactuar con otras proteínas (Vossenaar et al., 2003a; Anzilotti et al., 2010). El reemplazo de un aminoácido cargado positivamente (arginina) por uno neutro (citrulina) mediante la acción de PADs, induce cambios conformacionales en la proteína que llevan, en muchos casos, a cambios en su función específica (Vossenaar et al., 2003a; Vossenaar et al., 2003b). Aunque la reacción química catalizada por las PADs es oficialmente denominada deiminación, suele emplearse el término citrulinación, dado la formación de peptidil-citrulina como producto de la reacción; término que será utilizado en el presente manuscrito.

La citrulinación ha sido descrita en muchos procesos fisiológicos como apoptosis (Liu et al., 2006), diferenciación de los queratinocitos (Ying et al., 2009), modificación de histonas (Vossenaar et al., 2003b; Esposito et al., 2007) y también en patologías como cáncer (Chang and Fang, 2010), Alzheimer (Ishigami et al., 2005), glaucoma (Bhattacharya et al., 2006) y en enfermedades de tipo autoinmunes como artritis reumatoidea (Van Venrooij et al., 2004) y esclerosis múltiple (Moscarello et al., 2007). A nivel molecular, se ha demostrado que la citrulinación influye en la interacción proteína-proteína y en la señalización celular, e interfiere con la susceptibilidad a la degradación proteolítica (Tutturen et al., 2010). Aunque el rol fisiológico de las PADs se hizo evidente debido al efecto de inhibidores y pruebas químicas contra estas enzimas, la comprensión de los mecanismos que regulan la actividad de las PADs es menos conocido, aún cuando se sabe que son enzimas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes (Vossenaar et al., 2003b). Se postula además, que factores adicionales, como por ejemplo otras modificaciones post-traduccionales, regulan la actividad de las PADs *in vivo*. Esta última opción es particularmente plausible si se

considera que numerosas proteínas de señalización celular se encuentran sujetas a múltiples modificaciones post-traduccionales (como fosforilación, acetilación y metilación), que regulan las interacciones proteína-proteína, la actividad enzimática y la localización celular (Slack et al., 2011).

Las bases de datos genómicas revelan la existencia de cinco isoformas de PADs en mamíferos, radicando la principal diferencia entre ellas en su expresión característica en determinados tejidos. PAD1 se expresa principalmente en epidermis y útero, y se relaciona a la citrulinación de la filagrina asociada a la queratina durante la diferenciación del queratinocito. PAD2 se encuentra presente fundamentalmente en músculo esquelético, cerebro, bazo y glándulas secretorias, resultando la mielina y vimentina dos de sus sustratos naturales. La expresión de PAD3 se restringe a los folículos pilosos, mostrando colocalización con su sustrato natural, la tricohialina. PAD4 (en ratas)/PAD5 (en humanos) se expresa fundamentalmente en los glóbulos blancos de la sangre (granulocitos y monocitos) y es el único tipo de PAD que reside en el núcleo de la célula, siendo las histonas y la proteína nucleofosmina/B23 sus sustratos principales. PAD6 se expresa en células madre y embriones y, aunque su función es desconocida, se sugiere que participa en la reorganización de estas estructuras durante el desarrollo (Vossenaar et al., 2003b).

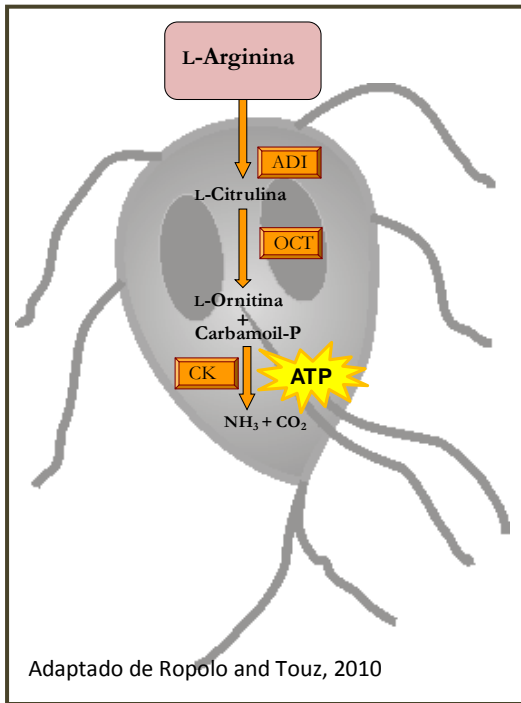
En histonas, las modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y citrulinación, se hallan estrechamente relacionadas a la regulación en la transcripción de genes, ejerciendo influencia en la regulación de la cromatina (Jenuwein and Allis, 2001; Margueron et al., 2005; Berger, 2007); aunque se desconoce cómo estos cambios estructurales de la cromatina influyen de manera específica en esta regulación. Muchas de las modificaciones post-traduccionales descritas en histonas son dinámicas, y por tanto, reversibles. Así, los niveles de acetilación y fosforilación dependen del balance entre las reacciones donde están involucradas acetilasas/deacetilasas y quinasas/fosfatasa, respectivamente (Khorasanizadeh, 2004). Las histonas pueden encontrarse metiladas, tanto en las lisinas como en las argininas, habiéndose descrito en los últimos años las enzimas responsables

de antagonizar la metilación de histonas. Las enzimas que demetilan lisinas se denominan Lisina-Demetilasas, e incluyen entre ellas a la *LSD1/KDM1* (del inglés, *Lysine-Specific Demethylase 1*) y a la familia de *JMJD2* (del inglés, *Jumonji domain-containing protein*) (Metzger et al., 2005; Tsukada et al., 2006; Yamane et al., 2006). Hasta el momento, se han descrito dos enzimas que demetilan arginina, la *JMJD6* que actúa sobre las histonas H3 y H4, y la PAD4 que remueve un grupo metilo (junto al grupo imino de la arginina) de un residuo de metilarginina convirtiéndolo en un residuo citrulina (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004), pudiendo citrulinar múltiples residuos arginina en la histona H3 (R2, R8, R17 y R26) y en la histona H4 (R3) (Wang et al., 2004). El resultado final de la demetilación de histonas se relaciona con el silenciamiento en la expresión de genes (Cuthbert et al., 2004). Así, la metilación de los residuos arginina y su posterior citrulinación por PAD4 parecería participar en la regulación de encendido y apagado (“*on-and-off*”) del ciclo fisiológico de la transcripción de genes. En los últimos años se ha descrito una relación entre citrulinación y acetilación de histonas, observándose que PAD4 interacciona con la enzima histona deacetilasa (HDAC), provocando una pérdida de metilación en arginina, adquisición de citrulina, deacetilación de histonas y la liberación de la ARN polimerasa II del promotor de estrógenos *p52* (Denis et al., 2009).

#### **1.4.2. Citrulinación de Proteínas en *Giardia lamblia***

La enzima Arginina Deiminasa (ADI) es una importante enzima metabólica capaz de convertir L-Arg en L-citrulina durante el período el crecimiento de *Giardia lamblia*. No obstante, ADI presenta un sitio activo constituido por Cisteína (C), Histidina (H), Ácido glutámico (E) similar al de las PADs, razón por la que se planteó la posibilidad de que esta enzima actúe además sobre argininas presentes en péptidos (Shirai et al., 2001; Touz et al., 2008). Considerando que *Giardia* muestra una reducción de la maquinaria celular eucariota y que posee un ciclo de vida en el cual se enfrenta a diversas situaciones de adaptación, no es extraño pensar que frente a la presión que sufra por parte del hospedador o del ambiente, se adapte modificando la función de sus enzimas según los requerimientos externos.



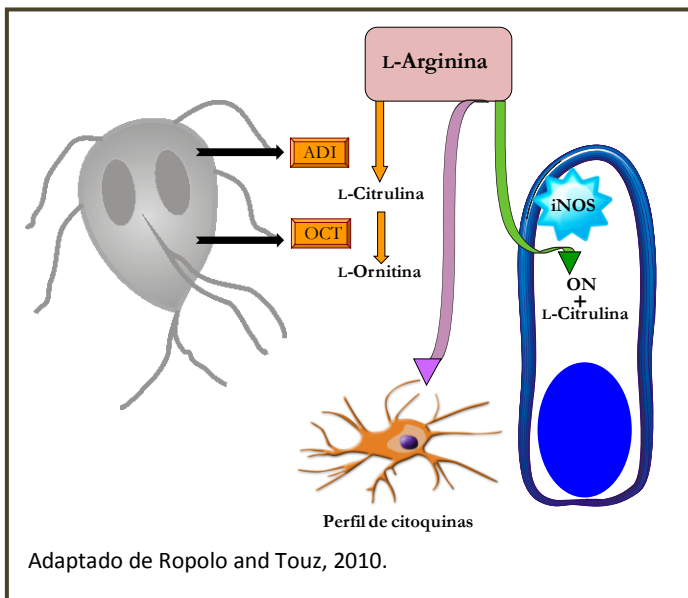


a) ADI como enzima metabólica:

*Giardia* utiliza la vía Arginina Deshidrolasa (ADH) para la producción de energía. La vía ADH fue descrita originalmente en procariontes y posee un rol esencial en eucariotes tempranamente divergentes como *Giardia*, *Trichomonas*, el alga verde *Clamydomonas reinhardtii* y *Hexamita inflata*. Como se muestra en el esquema adjunto, esta vía consiste de tres etapas que involucra a tres enzimas: Arginina Deiminasa (ADI), Ornitina Transcarbamilasa (*OTC* del inglés, *O*rnithine *T*rans*c*arbamoylase) y Carbamato quinasa (*CK* del inglés, *C*arbamate *K*inase), dando como resultado final la producción de ATP a partir de L-Arg, como principal materia prima (Edwards et al., 1992; Bronte and Zanovello, 2005; Ropolo and Touz, 2010).

Dos enzimas de la vía, ADI y CK, son poco comunes en eucariotes y no se encuentran presentes en animales superiores, siendo consideradas por muchos autores como posibles blancos terapéuticos para tratar la giardiasis. En la primera etapa de la vía ADH, ADI cataliza la hidrólisis de L-Arg a citrulina e ion amonio (Ropolo and Touz, 2010). En mamíferos, por el contrario, la L-Arg puede ser catabolizada por la Óxido Nítrico Sintetasa (*NOS* del inglés, *N*itric *O*xide *S*intase), la Arginasa (ARG), la L-Arg Glicina Amidinotransferasa o la L-Arg Decarboxilasa. Entre ellas, las dos principales enzimas catabólicas son *NOS* y ARG. La ARG hidroliza L-Arg a L-ornitina, un precursor para la síntesis de poliaminas y de L-prolina. Las poliaminas se encuentran involucradas en el crecimiento y diferenciación celular, mientras que la L-prolina afecta la producción de colágeno (Bronte and Zanovello, 2005). Por otro lado, se han descrito tres isoformas de *NOS* en mamíferos (Wu and Morris, 1998; Bogdan, 2001; Alderton et al., 2001): dos de ellas constitutivas (endotelial y neuronal) y una inducida (*iNOS*) expresada principalmente

por las células epiteliales del intestino (Salzman et al., 1996). Durante la reacción enzimática L-Arg es metabolizada por NOS para producir L-citrulina y ON, un radical libre altamente reactivo esencial para la función endotelial, antitumoral y la respuesta inmune innata (Moncada et al., 1991; Peranzoni et al., 2007; Tripathi, 2007; Daubener et al., 2009). El ON es, además, un antimicrobiano para un amplio rango de bacterias y parásitos patógenos (James, 1995; Clark and Rockett, 1996), y posee múltiples funciones incluyendo un rol en la neurotransmisión, en la regulación de la integridad de la barrera mucosa y del tono muscular del intestino (Alican and Kubes, 1996). Las células epiteliales dependen de la disponibilidad de L-Arg presente en el lumen intestinal para la producción de ON. Sin embargo, el sistema de transporte de arginina en el parásito presenta una capacidad de transporte 10 o 20 veces más alta que la de las células epiteliales (Cendan et al., 1995; Knodler et al., 1995; Mailliard et al., 1995; Pan and Stevens, 1995), siendo ésta la razón por la cual los trofozoítos de *Giardia* pueden reducir indirectamente la producción de ON por parte de las células epiteliales, disminuyendo la respuesta inmune innata y facilitando su permanencia en el intestino delgado (Eckmann et al., 2000).



b) Liberación de ADI al medio extracelular:

Svard y colaboradores han demostrado que ADI, la enzima Enolasa y la *OTC* son liberadas al medio extracelular cuando los trofozoítos toman contacto con células epiteliales *in vitro*. De esta manera, y como se muestra en el esquema, el consumo de L-Arg del medio extracelular se debe, en

parte, a la incorporación de este aminoácido por el parásito y también a la conversión de L-Arg por la enzima ADI presente en el medio extracelular (Ringqvist et al., 2008). La menor disponibilidad de L-Arg, para la ya descrita producción de ON por las células

epiteliales, afecta su proliferación. En relación a la respuesta inmune adaptativa, se ha observado que el consumo de L-Arg por ADI tiene influencia en la expresión de las moléculas co-estimuladoras y en el perfil de citoquinas que liberan las células dendríticas humanas, las cuales son claves en el inicio de cualquier respuesta inmune debido a que orquestan el tipo de respuesta que se va a generar contra el microorganismo (Eckmann et al., 2000; Palm et al., 2003; Banik et al., 2013).

c) ADI como una PAD:

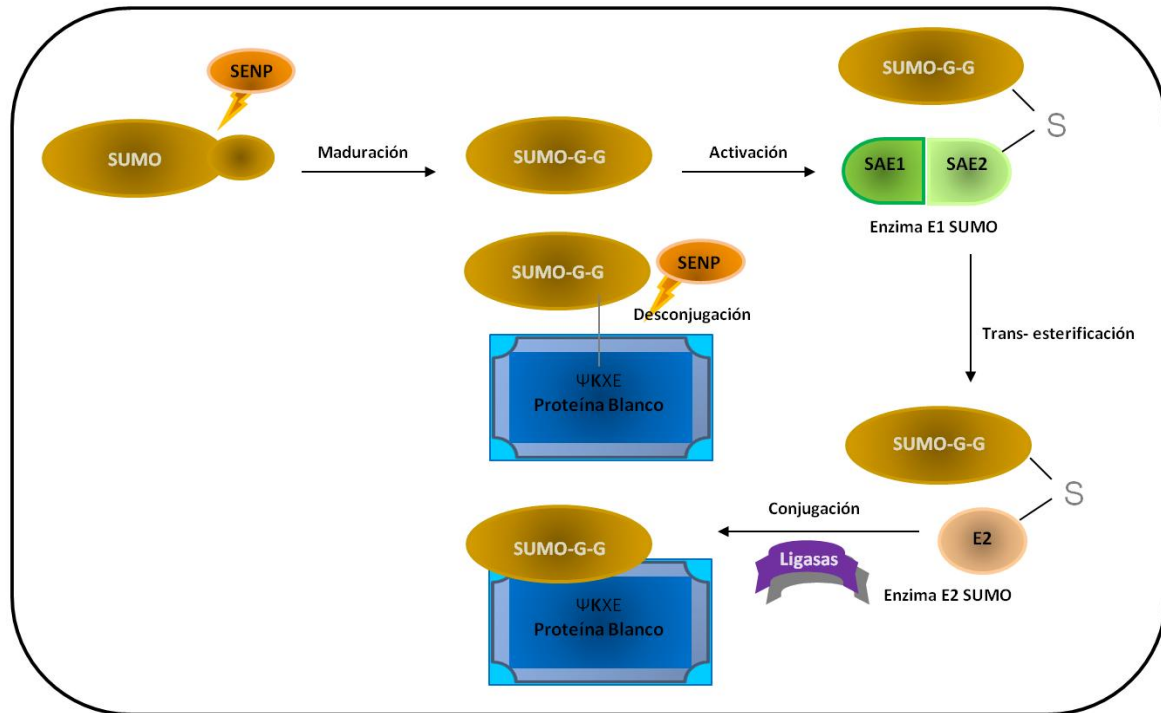
Hasta el momento sólo se ha descrito en *Porphyromonas gingivalis* (bacteria asociada con la iniciación y progresión de la periodontitis en adultos) una enzima capaz de modificar tanto arginina libre como unida a péptidos (McGraw et al., 1999). Aunque no ha sido evolutivamente relacionada a otras PADs de vertebrados, esta enzima actúa de manera independiente de  $Ca^{2+}$ , mostrando homología con varias Arginina Deaminasas (Shirai et al., 2001). En nuestro grupo de trabajo, exploramos la posibilidad de que ADI se comporte como una PAD, basados en el hecho de que esta enzima colocalizó con las VSPs en ensayos de IFI. Ensayos funcionales de citrulinación mostraron, además, que ADI es capaz de citrulinar a las VSP, y por ensayos *in vitro* sobre un péptido sintético conteniendo el extremo citosólico de las VSP (CRGKA) se demostró que esta enzima citrulina peptidil-arginina, siendo la arginina presente en el extremo CRGKA el sitio de citrulinación. La citrulinación ha sido vinculada al proceso de VA, dado que mutaciones en la arginina causan desregulación del cambio de una VSP por otra, en tanto que la sobre-expresión de ADI, aumenta también la tasa de cambio de VSP, bajo la inducción mediada por anticuerpos (Touz et al., 2008). El mecanismo por el cual ADI actúa no fue descrito hasta el momento, postulándose su posible participación como una molécula clave en la señalización intracelular que finalmente lleva al cambio de una VSP por otra.

ADI presenta un peso molecular de aproximadamente 65 kDa. Sin embargo, se ha observado también, en ensayos de inmunotransferencia, como una banda de mayor peso molecular (~85 kDa) al predicho para la enzima, pudiendo explicarse este retardo electroforético por alguna modificación post-traducciona. Análisis bioinformáticos, a partir de la secuencia de la proteína, han demostrado ausencia de sitios probables de

glicosilación, miristolación, prenilación o unión a glicoinositolfosfolípidos en ADI, revelando además varias posiciones en las que resultaría posible la fosforilación, y la presencia de un motivo con alta probabilidad de unión a una proteína denominada *SUMO* (Touz et al., 2008).

### 1.4.3. *SUMO*ilación de Proteínas

La *SUMO*ilación es uno de los más complejos e interesantes mecanismos que regulan la función de proteínas en eucariotas, presentando diversas proteínas blanco y amplias funciones celulares tales como: regulación transcripcional (Girdwood et al., 2004), mantenimiento de la integridad del genoma (Kim et al., 2007), transporte de proteínas hacia el núcleo (Gill, 2004) y transducción de señales (Schwartz and Hochstrasser, 2003; Seeler and Dejean, 2003; Gill, 2004), entre otras. La proteína *SUMO* (del inglés, *Small Ubiquitin-like Modifier*) pertenece a la gran familia de modificadores relacionados a Ubiquitina, mostrando una estructura tridimensional similar a ésta, aunque sólo posee un 18% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Melchior, 2000). Al igual que Ubiquitina, *SUMO* se sintetiza como una proteína precursora, y requiere un proceso de maduración que involucra *SUMO* proteasas (*SEN*P del inglés, *Sentrin Protease*) para exponer un motivo di-glicina (GG) en el extremo carboxilo-terminal necesario en la conjugación a la proteína blanco (**Figura 1.8**) (Bossis and Melchior, 2006). Esta conjugación involucra, además, una cascada enzimática en la que participan la enzima *SUMO* E1 (activación), la enzima *SUMO* E2 o Ubc9 (conjugación), y en algunos casos la asistencia de una ligasa (*SUMO* E3) que incrementa la eficiencia de transferencia al sustrato (Gareau and Lima, 2010).



**Figura 1.8: Cascada de SUMOilación.** *SUMO* es expresado como un propéptido inactivo y es procesado por una proteasa específica (*SENP*) para exponer el motivo GG C-terminal requerido para la conjugación de *SUMO* a sus proteínas blanco (maduración). *SUMO* maduro es luego activado por la enzima *SUMO* E1 (de activación) y es transferido a través de un proceso de transesterificación a *SUMO* E2 (de conjugación). *SUMO* es luego conjugado a una K dentro de un motivo consenso ( $\Psi$ KXE) de la proteína blanco. Enzimas *SUMO* E3 ligasas pueden facilitar el proceso. *SENPs* remueven *SUMO* del sustrato modificado, manteniendo la reserva de *SUMO* libre. Adaptado desde (Dorval and Fraser, 2007)

La enzima E1 consiste en un heterodímero compuesto por dos polipéptidos denominados *SAE1* y *SAE2* (del inglés, *SUMO Activation Enzyme 1* y 2). *SAE1* adenila la proteína *SUMO* mientras que *SAE2* media la interacción E1-*SUMO* (Lois and Lima, 2005; Wang and Chen, 2010). A través de una reacción de transesterificación, la proteína *SUMO* activada es luego transferida a la Cisteína (C) de la enzima E2, capaz de reconocer proteínas blanco y catalizar la formación de una unión isopeptídica entre la G del extremo C-terminal de *SUMO* y un residuo K en la proteína blanco presente en una región consenso ( $\Psi$ KXE: donde  $\Psi$  es un aminoácido hidrofóbico, K es la lisina, X es cualquier aminoácido y E es Ácido glutámico) (Tatham et al., 2003; Okada et al., 2009). Ensayos *in vitro* han demostrado que las proteínas recombinantes E1, E2, y *SENP* son suficientes para *SUMO*ilar sustratos de manera dependiente de ATP (Leach et al., 2011). La *SUMO*ilación de proteínas es un proceso dinámico y reversible, y requiere de *SENPs* para remover

*SUMO* de las proteínas blanco, manteniendo la reserva de la proteína *SUMO* libre (Gill, 2004). A pesar de los extensos estudios llevados a cabo respecto a la *SUMO*ilación de proteínas en células eucariotas, pocos estudios han sido realizados en protozoarios parásitos describiéndose la presencia de *SUMO* en *Toxoplasma gondii* (Braun et al., 2009), *Plasmodium falciparum* (Issar et al., 2008) y *Trypanosoma* (Liao et al., 2010; Bayona et al., 2011). En *Giardia lamblia*, no existen hasta el momento evidencias de *SUMO*ilación.

## **Objetivo General**

El objetivo general del presente *Trabajo de Tesis* consiste en determinar de qué manera dos modificaciones post-traduccionales, como son la *SUMO*ilación y la citrulinación de proteínas regulan procesos básicos involucrados en la sobrevivencia del parásito intestinal *Giardia lamblia*.

## **Objetivos Específicos**

- 1- Estudiar el proceso de *SUMO*ilación en *Giardia lamblia* y analizar a la enzima Arginina Deiminasa (ADI) como sustrato de *SUMO*ilación.**
  - 1.1 Identificar por análisis *in silico* en el genoma de *Giardia lamblia* las enzimas involucradas en la cascada de *SUMO*ilación, estudiando su expresión y localización en trofozoítos transfectados con cada una de ellas.
  - 1.2 Identificar por análisis *in silico* en el genoma de *G. lamblia* a la proteína *SUMO* y estudiar su localización y expresión, a través de la sobre-expresión de la proteína en trofozoítos transgénicos y de la producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína *SUMO* nativa.
  - 1.3 Analizar si ADI es un sustrato de *SUMO*ilación, realizando tanto estudios de biología celular como a través de la mutación del sitio de unión a *SUMO*.
  
- 2- Estudiar el rol de la enzima ADI durante el proceso de enquistamiento.**
  - 2.1 Analizar la expresión y localización de la enzima ADI durante el proceso de enquistamiento.
  - 2.2 Estudiar la participación del motivo de *SUMO*ilación y de las señales de localización nuclear en la translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento.
  - 2.3 Examinar si ADI se comporta como una Peptidil-Arginina Deiminasa.
  - 2.4 Analizar el rol de ADI en la regulación del proceso de enquistamiento.

***Capítulo 2:***  
***SUMOilación en Giardia lamblia y***  
***ADI como sustrato de SUMOilación***



## **Capítulo 2: SUMOilación en *Giardia lamblia* y ADI como sustrato de SUMOilación**

### **RESULTADOS:**

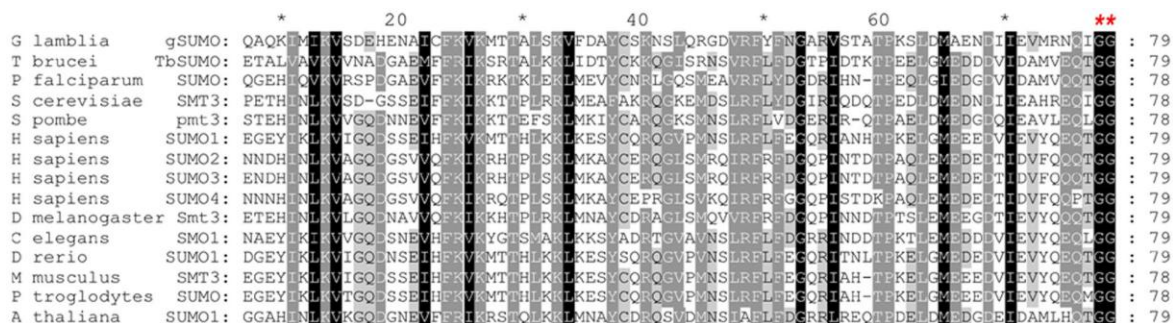
#### **2.1. SUMOilación en *Giardia lamblia***

##### **2.1.1. SUMO: Una proteína conservada en *Giardia lamblia***

El proyecto de secuenciación del genoma de *Giardia lamblia* se inició en el año 1998 y se completó en el 2007 para las cepas *WB*, *GS* y *P15*. Desde entonces, la información obtenida representa una herramienta fundamental para la realización de análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos y bioinformáticos en general. El genoma de *Giardia* es compacto en estructura y contenido, presenta pocos intrones, y posee una maquinaria simplificada para la replicación del ADN, la transcripción, el procesamiento de ARN y varias vías de señalización metabólicas (Morrison et al., 2007). Haciendo uso de esta herramienta, y con vistas a estudiar la SUMOilación en este parásito, se realizó en primera instancia una búsqueda en la base de datos del genoma de *Giardia* (*GDB* del inglés, *Giardia Database*), identificándose en la cepa *WB* un único gen (GL50803\_7760) que codifica para *SUMO*. *SUMO* es una proteína compuesta por 102 aminoácidos y una masa molecular aproximada de 11 kDa, en concordancia a lo informado para otros organismos. Algo similar ocurre en las cepas restantes de *Giardia* para las cuales se identificaron los genes GL50801\_3210 y GLP15\_4605 que codifican para *SUMO* en las cepas *GS* y *P15*. Estas proteínas muestran un 93% y un 97% de identidad en su secuencia respecto a la isoforma de *SUMO* de la cepa *WB*, respectivamente.

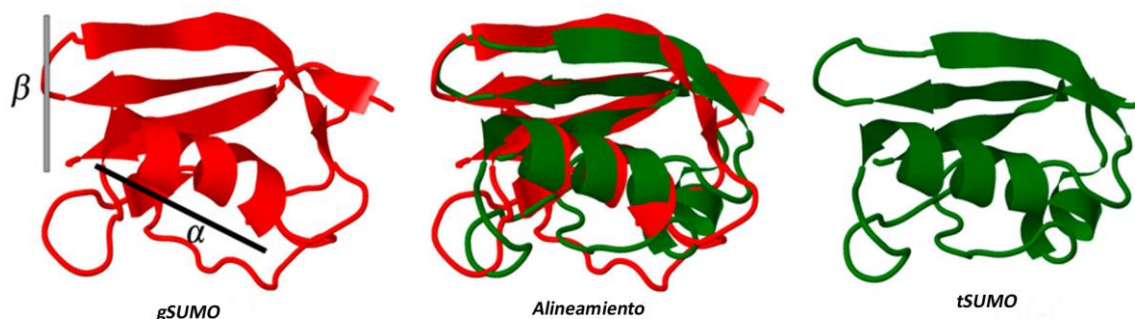
Dado que *SUMO* es una proteína presente en todo el linaje eucariota, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (**Figura 2.1**) entre la proteína de *Giardia* (cepa *WB*) y miembros de la familia de *SUMO* descritos en otros organismos. Este análisis demostró un alto grado de similitud en las secuencias de proteínas con la presencia de residuos conservados en el extremo C-terminal y del característico motivo GG (en asteriscos rojos),

necesario para la formación de la unión isopeptídica entre *SUMO* y sus sustratos. La identificación de este motivo GG sugiere que, como sus homólogas, la proteína es sintetizada como un pro-péptido en *Giardia* y requiere un proceso de clivado por hidrolasas, para la producción de su forma madura, con el motivo GG disponible para la conjugación al sustrato.



**Figura 2.1: Análisis comparativo de proteínas SUMO.** Alineamiento múltiple de secuencias entre el dominio conservado de *SUMO* en *Giardia*, y de secuencias provenientes de *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Mus musculus*, *Pan troglodytes*, y *Arabidopsis thaliana*. En sombreado oscuro se muestran los residuos idénticos entre las respectivas secuencias. En sombreado claro, los residuos similares. Los asteriscos en rojo indican el motivo GG conservado.

Empleando la estructura cristalográfica de la isoforma *SUMO1* humana (código *PDB* 1A5R) se realizó la predicción de la estructura tridimensional de la proteína *SUMO* de *Giardia*. Utilizando como base la estructura cristalográfica disponible de *SUMO* en *Trypanosoma brucei* se llevó a cabo, además, un alineamiento estructural (**Figura 2.2**) de las regiones de alfa-hélice y lámina-beta (entre las posiciones 23 y 96) de *SUMO* en *Giardia* y la cadena A de la proteína *SUMO* proveniente de *T. brucei* (código *PDB* 2K8H) (Shang et al., 2009), lo que mostró un alto grado de superposición entre la estructura predicha para *Giardia* con la estructura cristalográfica proveniente del tripanosomátido.



**Figura 2.2:** *SUMO* de *Giardia lamblia* y *Trypanosoma brucei*. Alineamiento estructural construido con las porciones de alfa-hélice ( $\alpha$ ) y lámina- beta ( $\beta$ ) de la estructura tridimensional predicha para *SUMO* de *Giardia lamblia* (*gSUMO*) y la cadena A de la proteína *SUMO* de *Trypanosoma brucei* (*tSUMO*).

Los resultados demuestran, en conjunto, que *SUMO* está presente en *Giardia lamblia*, y que por su secuencia y estructura conservada la proteína ejercería el mismo rol que en eucariotas más derivados, siendo esta función de carácter esencial y conservado a lo largo de la filogenia.

### 2.1.2. Cascada de SUMOilación en *Giardia lamblia*

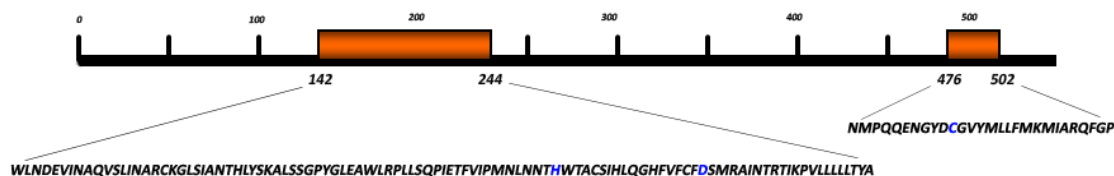
El proceso de SUMOilación involucra una compleja cascada enzimática. Para corroborar si las enzimas requeridas en el procesamiento y ligación de *SUMO* a su sustrato, y las proteasas involucradas en los procesos de maduración y desconjugación, están presentes en *Giardia* se investigó en *GDB* encontrándose sólo un gen que codifica para la proteasa de *SUMO* (GL50803\_16438) en la cepa *WB*.

#### 2.1.2.1. Enzima *SUMO* Proteasa (SP-HA)

El gen *sp* de 1620 pb codifica para SP: una proteína cuya masa molecular predicha es de ~60 kDa. Como se describió para *SUMO*, la proteasa también fue identificada en las cepas *GS* (GL50801\_3900) y *P15* (GLP15\_2816), mostrando estas proteínas un 58% y 78% de identidad respecto a la isoforma presente en la cepa *WB*, respectivamente.

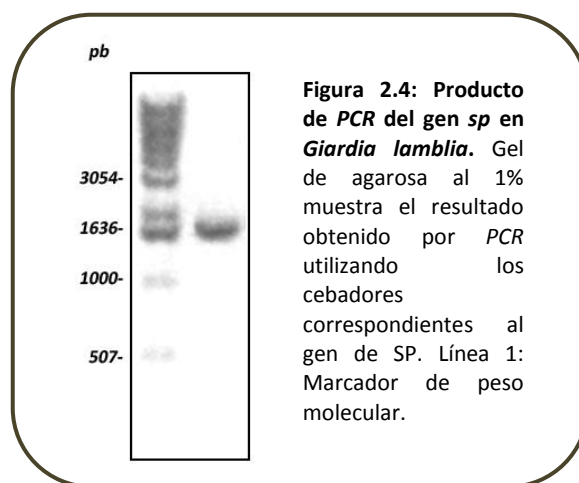
Todas las proteasas de *SUMO* son cisteínas proteasas caracterizadas por la presencia de un extremo C-terminal conservado de ~200 residuos, y una región N-terminal variable que regula su localización intracelular. El dominio C-terminal de estas proteínas contiene una tríada catalítica constituida por los residuos Histidina (H), Ácido aspártico (D)

y Cisteína (C), que participa de la ruptura del enlace isopeptídico durante el proceso de desconjugación, y del clivaje del motivo GG durante la maduración de las formas de SUMO precursoras (Hickey et al., 2012). Análisis *in silico* permitieron identificar en SP (Figura 2.3) la presencia de dos dominios C-terminales conservados (posición 142-244 y 476-502) (en naranja) y un posible sitio catalítico representado por los residuos H, D y C (en azul) (Ihara et al., 2007; Ponder et al., 2011).



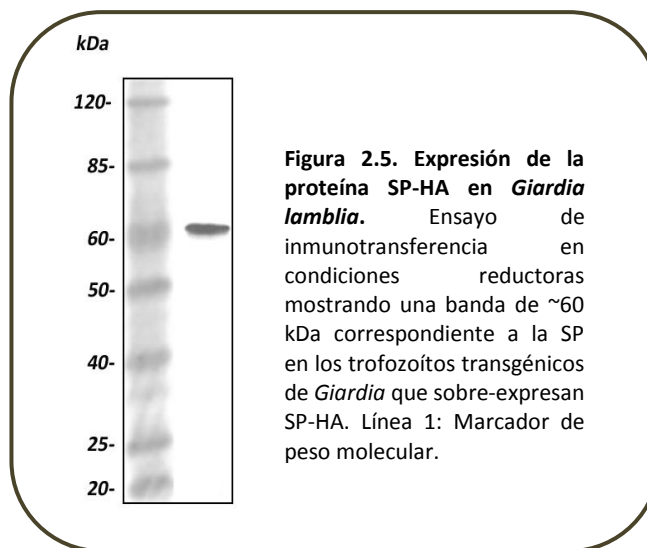
**Figura 2.3: Representación esquemática de la SP de *Giardia lamblia*.** Representación esquemática de la SP de *Giardia* conteniendo dos dominios C-terminal catalíticos (en naranja) con los probables residuos catalíticos H-D-C (en azul).

A los fines de analizar la expresión y localización celular de SP en *Giardia*, se sobre-expresó la proteína en trofozoítos. Para ello, se amplificó el gen correspondiente, purificando luego el producto de PCR de 1620 pb (Figura 2.4) el cual se clonó en el vector de expresión p-TubH7HApac, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos (MyM).

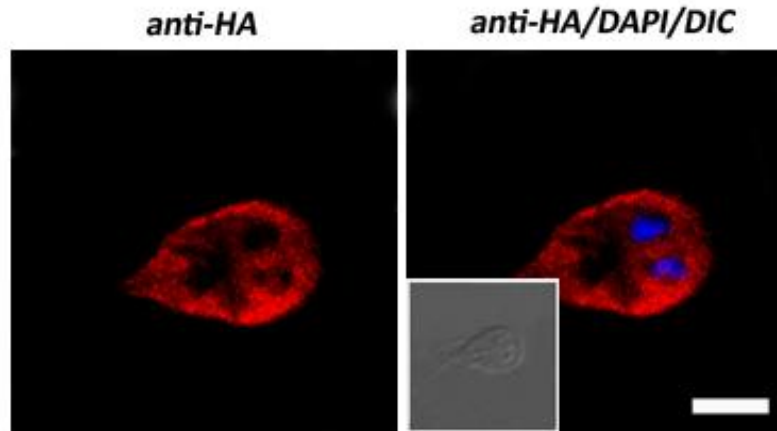


El vector pTubApa-H7-HApac permite la expresión constitutiva de genes en *G. lamblia* mediante la presencia del promotor de tubulina y posteriormente la generación de líneas estables por selección con el antibiótico puromicina. Los genes son expresados

como proteínas de fusión presentando el extremo C-terminal el epítoto HA (epítoto de la proteína hemaglutinina del virus influenza), ampliamente utilizado para analizar la localización de proteínas empleando anticuerpos anti-HA. Se ha demostrado en distintos trabajos que la incorporación del epítoto HA no tiene efecto sobre el comportamiento de las proteínas expresadas (Touz et al., 2002; Touz et al., 2003; Touz et al., 2004). De esta manera, se transformaron bacterias con el constructo, y a partir de las colonias positivas identificadas se extrajo el plásmido, confirmando por *PCR* la presencia de la proteína de interés. El plásmido obtenido fue secuenciado y luego transfectado a trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa *WB/1267*. Los trofozoítos transfectados que expresaron el plásmido de manera estable se identificaron por IFI, utilizando el Acm anti-HA, confirmando además la expresión de la proteína por inmunotransferencia (**Figura 2.5**).

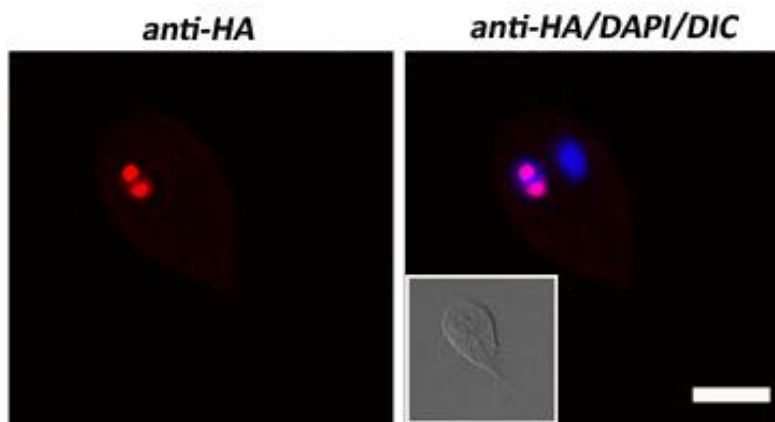


Con el fin de determinar la localización subcelular de la SP, se realizaron ensayos de IFI en los trofozoítos transgénicos *SP-HA*, revelando la mayoría de las células marca citosólica, como así también en membrana plasmática y flagelos (**Figura 2.6**).



**Figura 2.6:** Localización citoplasmática y en membrana plasmática de la proteína SP-HA en *Giardia lamblia* por IFI. IFI y microscopía confocal utilizando un Acm anti-HA marcado con Alexa 546 (en rojo) muestran la expresión de SP-HA en citoplasma y membrana plasmática. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Los insertos muestran microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). Escala: 5  $\mu$ m.

Sin embargo, en algunos trofozoítos la proteína localizó en núcleo, en un patrón que no es característico en *Giardia*, ya que generalmente las proteínas nucleares se localizan en ambos núcleos por igual (**Figura 2.7**). Los análisis *in silico* indicaron la presencia de un motivo de localización nuclear en la posición 333, pudiendo explicar la localización nuclear observada de la proteína (Muller et al., 2001; Ponder et al., 2011).



**Figura 2.7:** Localización nuclear de la proteína SP-HA en *Giardia lamblia* por IFI. IFI y microscopía confocal utilizando un Acm anti-HA marcado con Alexa 546 (en rojo) muestran la expresión nuclear de SP-HA. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Los insertos muestran microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). Escala: 5  $\mu$ m.

La localización variable de la proteína en *Giardia* podría deberse a la presencia de una única *SUMO* proteasa en el parásito, a diferencia de lo que sucede en otros organismos en donde se han descrito varias isoformas que tienden a localizar en compartimentos subcelulares específicos. Sumado a esto, se ha demostrado mediante análisis estructurales y funcionales que la localización celular de las proteasas de *SUMO* depende de su especificidad para con determinados sustratos. De esta manera, *Giardia* poseería una única enzima responsable de los procesos de maduración y desconjugación, que modifica su localización en respuesta a los procesos adaptativos del parásito.

### **2.1.2.2. Enzima *SUMO* E1 (*SAE2*-HA)**

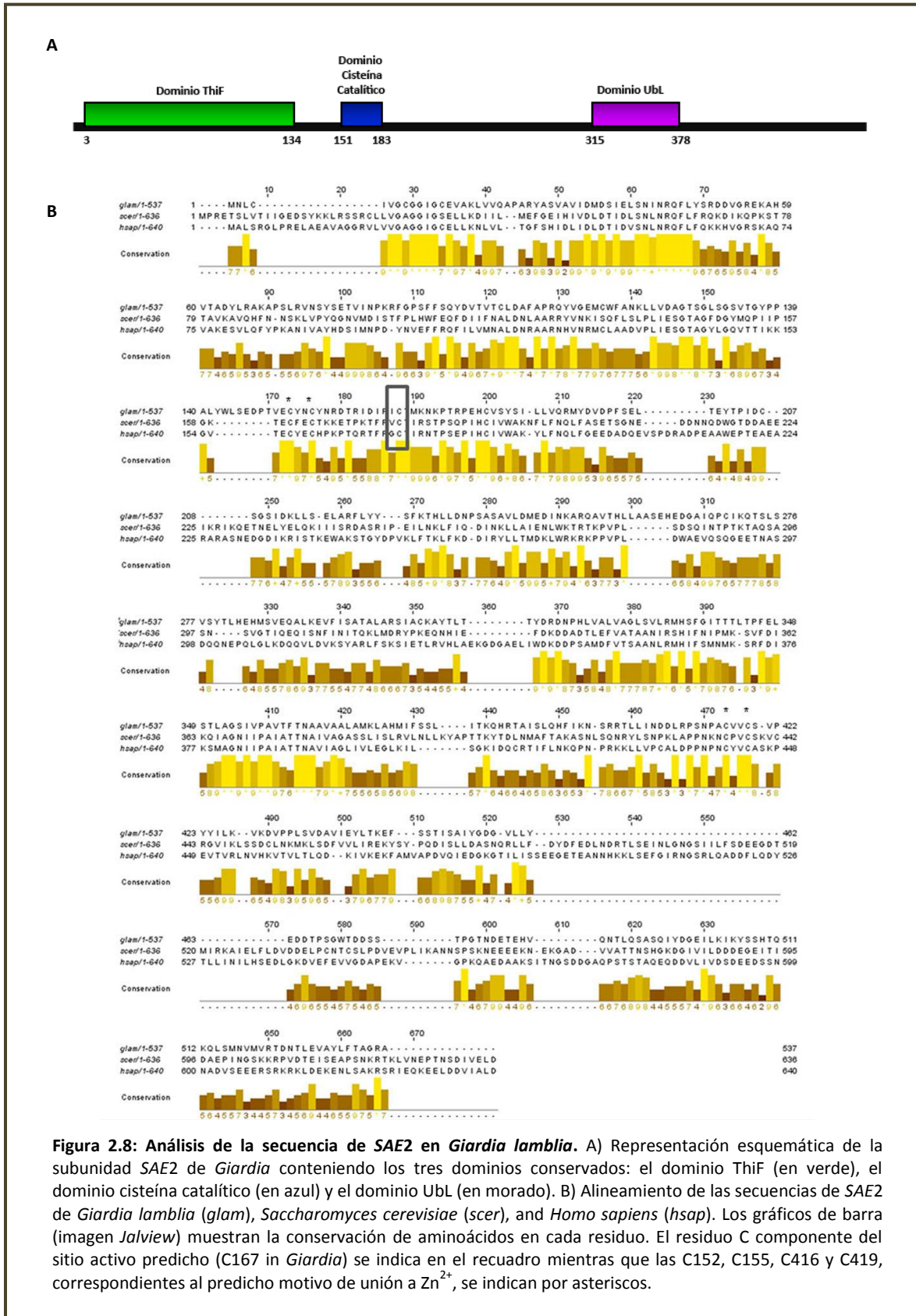
En vistas a identificar los demás componentes de la vía de *SUMO*ilación, se realizó una búsqueda de las enzimas involucradas en la activación y conjugación de *SUMO* en *GDB*, utilizando como plantados diferentes ortólogos de dichas proteínas (*H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *P. falciparum* y *T. gondii*). Para la selección de las secuencias candidatas se realizó una revisión de la literatura, identificando los dominios y residuos catalíticos característicos de cada una de ellas (Miura et al., 2007).

A diferencia de la enzima E1 ubiquitinante que funciona como una unidad simple, la enzima E1 de *SUMO* es un heterodímero constituido por dos polipéptidos conocidos como *SAE1* y *SAE2* (Johnson, 2004). Se ha descrito que *SAE1* es homóloga a la porción N-terminal de la enzima E1 de ubiquitina y que contiene un dominio único que adenila *SUMO* (Lois and Lima, 2005). *SAE2*, en tanto, resulta homóloga a la porción C-terminal de la enzima E1 ubiquitinante y media exclusivamente la interacción E1-*SUMO* (Johnson, 2004; Lois and Lima, 2005). Según se ha informado, *SUMO* es reconocida exclusivamente por residuos presentes en *SAE2* (Lois and Lima, 2005), y aunque no se han observado interacciones directas entre *SUMO* y la subunidad *SAE1*, los monómeros de E1 (*SAE1/SAE2*) nunca se han encontrado en forma individual, asumiendo que son incapaces de funcionar independientemente (Azuma et al., 2001). En *Giardia*, no pudo identificarse la subunidad *SAE1* por comparación de secuencias. Sin embargo, se han encontrado en *GDB* proteínas homólogas a la porción N-terminal de la enzima E1 involucrada en la ubiquitinación, que poseen un dominio conservado de adenilación surgiendo como

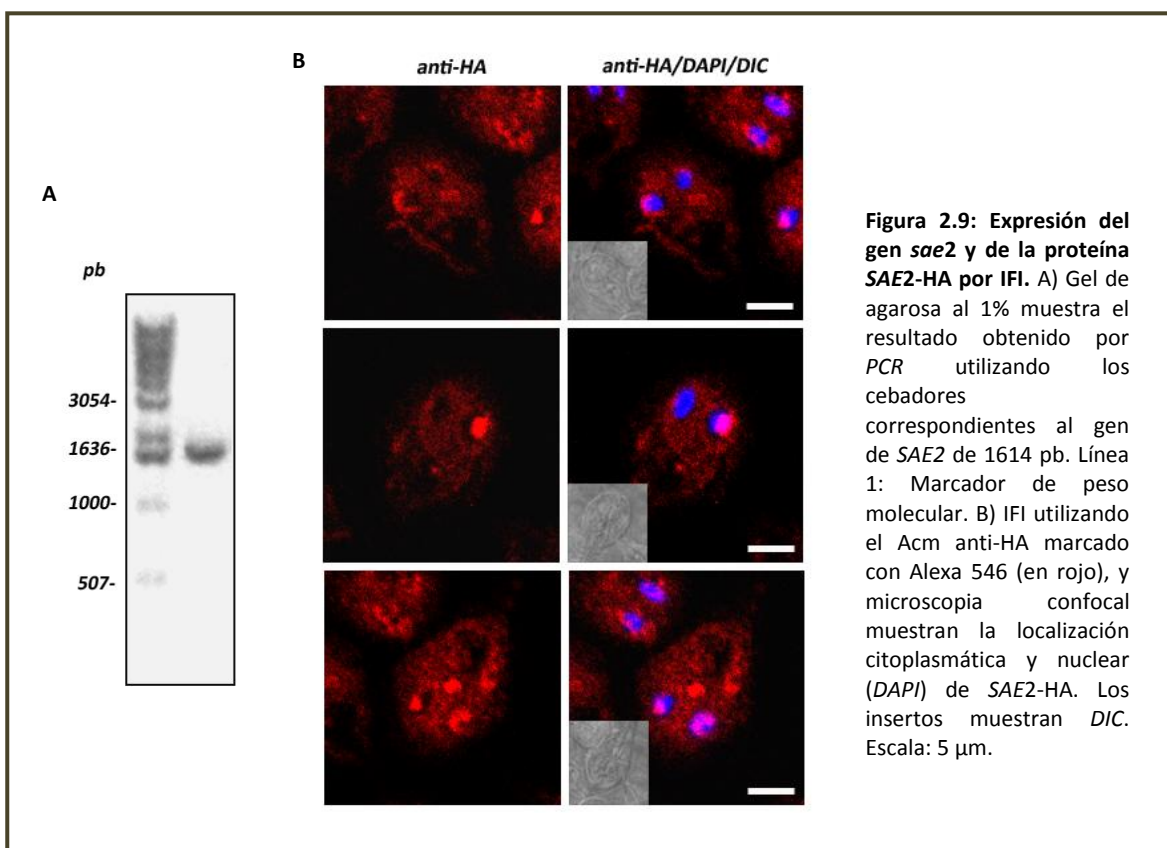
subunidades SAE1 candidatas, aunque se requieren análisis bioinformáticos y funcionales más profundos para su correcta caracterización.

Los análisis *in silico* mostraron que SAE2 (GL50803\_6288) en *Giardia* (**Figura 2.7**) es una proteína homóloga a la propia de levaduras y humanos, presentando tres dominios conservados en su secuencia. Éstos comprenden: el dominio ThiF (de adenilación) (3-134) que une SUMO y ATP, el dominio cisteína catalítico (151-183) que contiene a la C catalítica (C167 en *Giardia*) responsable del enlace tioester E1-SUMO, y el dominio relacionado a ubiquitina o UbL (315-378), dada su similitud estructural con ésta y otros modificadores relacionados (**Figura 2.8A**). El alineamiento de la secuencia de SAE2 de *Giardia* con las provenientes de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, mostró además la existencia de un probable motivo de unión a Zinc ( $Zn^{2+}$ ) (característico de esta subunidad) (Wang and Chen, 2010), constituido por los residuos C152, C155, C416 y C419 (asteriscos en la **Figura 2.8B**) e involucrado en la interacción de SAE2 con SUMO.





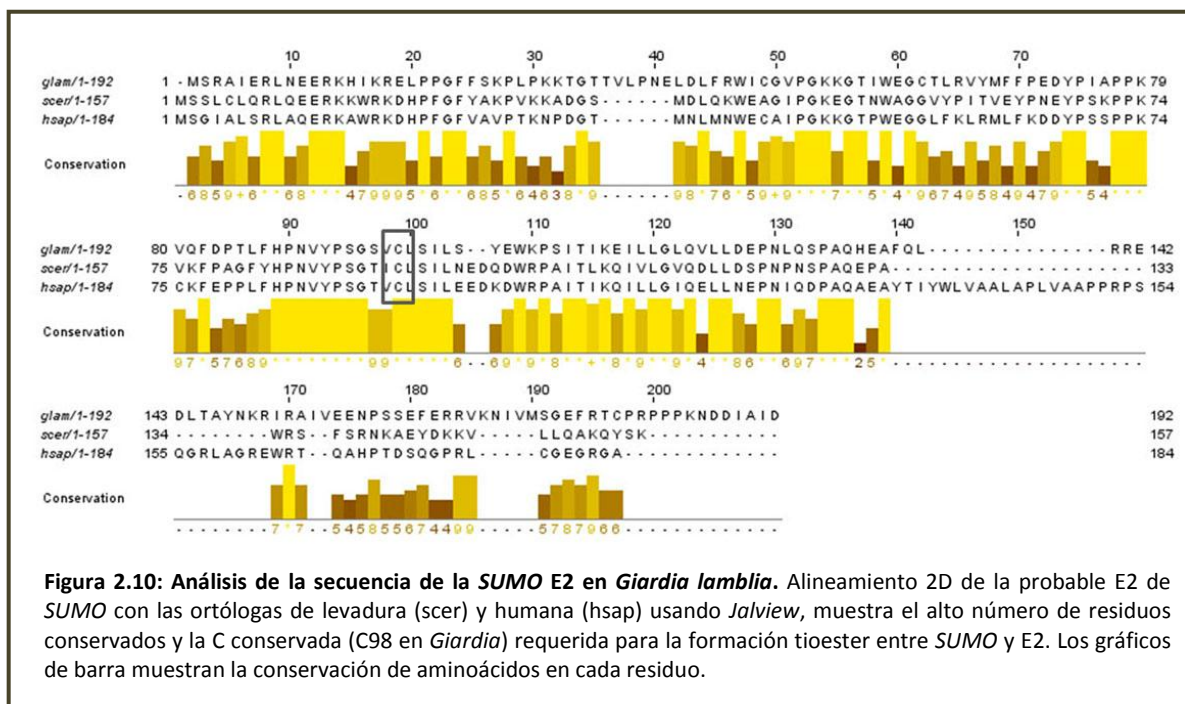
Con el fin de estudiar la expresión de *SAE2* en *Giardia*, se sobre-expresó la proteína *SAE2*-HA (**Figura 2.9A**), acorde a lo expuesto en la sección de MyM. Posterior a la secuenciación del plásmido obtenido, se transfectaron trofozoítos de la cepa *WB/1267*, y se realizaron ensayos de IFI para determinar la localización subcelular de la proteína que resultó estar presente en el citoplasma, aunque también en la zona perinuclear y en los núcleos, como se observa en la **Figura 2.9B**.



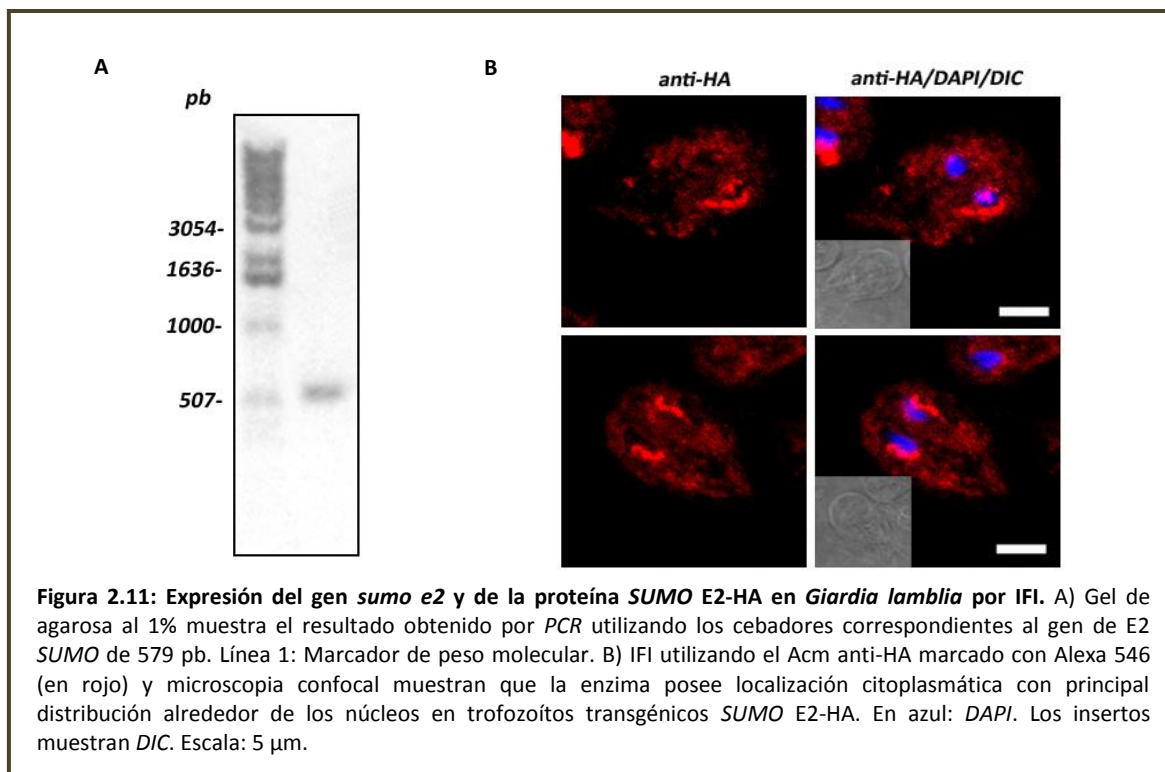
### 2.1.2.3. Enzima *SUMO* E2 (*SUMO* E2-HA)

En hongos, invertebrados y probablemente todos los vertebrados, la enzima E2 de *SUMO* es codificada por un único gen (Colby et al., 2006), y muestra considerable similitud de secuencia y a nivel estructural con la enzima E2 de ubiquitinación. No obstante, en contraste a las enzimas E2 ubiquitinantes que requieren la asistencia de ligasas, la enzima E2 de *SUMO* es capaz de reconocer la proteína sustrato y catalizar directamente la formación de un enlace isopeptídico entre la G C-terminal de *SUMO* y el grupo  $\epsilon$ -amino de

la K sustrato (Johnson, 2004). Se ha demostrado que enzimas recombinantes E1 y E2 son suficientes para la modificación dependiente de ATP de sustratos *in vitro* (Seeler and Dejean, 2003; Gill, 2004), siendo fuente de debate el requerimiento de enzimas SUMO E3 ligasas (Lois and Lima, 2005). Dado que no se identificaron proteínas homólogas a las SUMO E3 ligasas en *GDB* a partir de los dominios conservados en otras enzimas descritas, es posible que E2 sea suficiente para que la SUMOilación resulte funcional en este parásito (Seeler and Dejean, 2003). Aunque resulta dificultoso distinguir por su secuencia primaria la enzima E2 de SUMO de la que participa en el proceso de ubiquitinación (Wang et al., 2008), se identificó un gen que codificaría para la enzima de conjugación de SUMO E2 (GL50803\_24068). Esta proteína, de manera similar a otros miembros de la familia E2 descritos, presenta un dominio UbL de ~14kDa (31-153) y contiene el residuo de C conservado (C98 en *Giardia*) esencial para la formación de la unión tioester entre SUMO y E2 (Duan et al., 2009) (Figura 2.10).



Para analizar la expresión de E2 en *Giardia*, se sobre-expresó la proteína SUMO E2-HA (Figura 2.11A) en trofozoítos salvajes según se describe en la sección de MyM, y se realizaron ensayos de IFI para determinar su localización subcelular (Figura 2.11B).



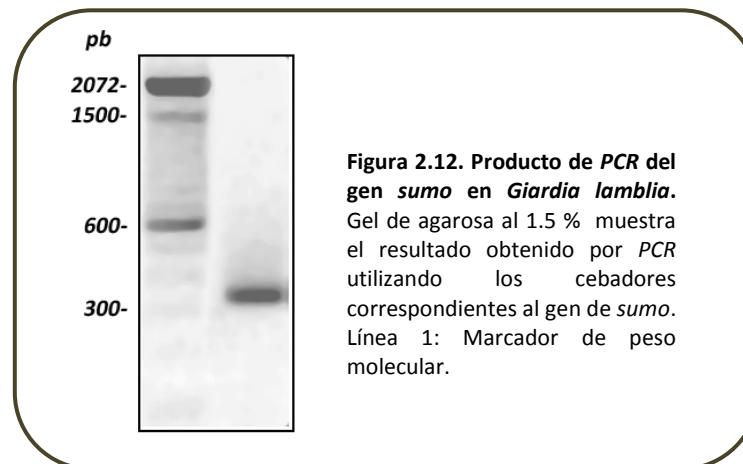
Aunque los análisis *in silico* predijeron una localización nuclear de SUMO E2 en *Giardia*, los ensayos de IFI en trofozoítos transfectados mostraron que SUMO E2-HA localizó en citoplasma y alrededor de los núcleos, aunque no dentro de los mismos. En otros organismos, SUMO E2 se encuentra presente en diferentes compartimentos subcelulares. En levaduras, la proteína sobre-expresada localiza en el núcleo, similar a la SUMO E2 endógena de *Drosophila*, y en mamíferos se ha detectado en el citoplasma y nucleoplasma, aunque enriquecida alrededor de la envoltura nuclear (Melchior, 2000).

Habiendo identificado por análisis *in silico* la proteína SUMO y las posibles enzimas involucradas en la vía de SUMOilación, el próximo paso fue analizar si la proteína SUMO se expresa en el parásito siguiendo dos estrategias complementarias. Éstas incluyeron por un lado, la sobre-expresión de SUMO en células transgénicas y, por otro, la caracterización de la proteína nativa a partir de la producción de anticuerpos anti-SUMO de *Giardia*.

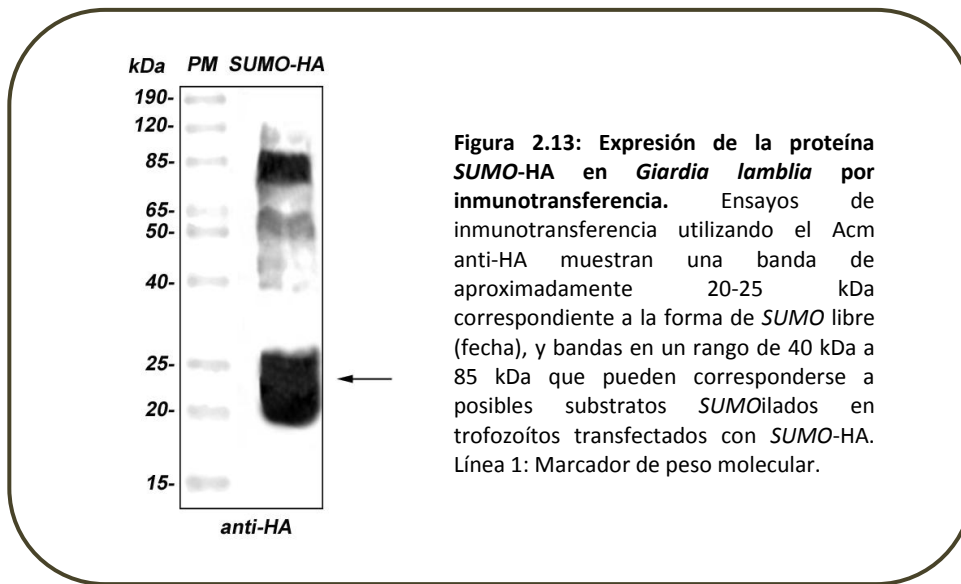
### 2.1.3. Expresión de la proteína *SUMO* en *Giardia*

#### 2.1.3.1. Sobre-expresión de la proteína *SUMO* en *Giardia lamblia*

Con el objeto de sobre-expresar la proteína *SUMO* en *Giardia*, se generó una construcción que expresa *SUMO*-HA. Para ello se amplificó el gen, se purificó el producto de *PCR* de 309pb (**Figura 2.12**) y se clonó la proteína a sobre-expresar en el vector de expresión pTub-HA como se describe en la sección de MyM. El vector específico para *Giardia lamblia* permite la expresión de proteínas con una etiqueta HA en el extremo N-terminal, de utilidad en este caso debido a la presencia del motivo GG en el extremo C-terminal de *SUMO*, y acorde a otros trabajos informados en la literatura (Peroutka et al., 2008).

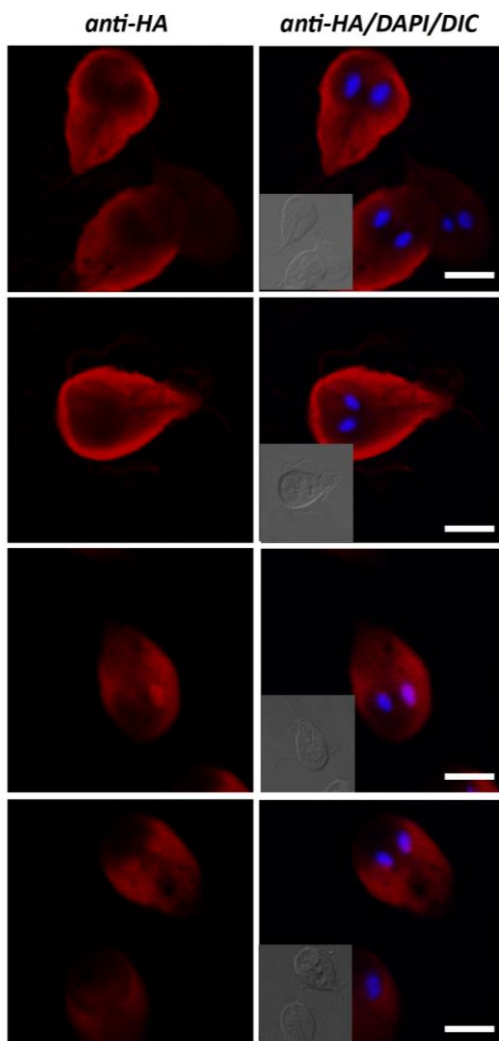


Se transfectaron trofozoítos de la cepa *WB/1267* con el plásmido *SUMO*-HA secuenciado, y se realizaron ensayos de IFI e inmunotransferencia para identificar la proteína *SUMO* y determinar posibles sustratos conjugados a ésta. Ensayos de inmunotransferencia (**Figura 2.13**) revelaron la presencia de bandas proteicas de diferentes masas moleculares (entre 40 y 85 kDa) correspondientes a posibles proteínas *SUMO*iladas, y de una banda de ~20-25 kDa correspondiente a la forma libre de *SUMO*. Este aumento en el peso molecular con respecto al tamaño teórico de *SUMO* (12 kDa) en los ensayos de inmunotransferencia es observado comúnmente y ha sido informado en trabajos previos (Colby et al., 2006; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007)



A fines de determinar la localización subcelular de SUMO-HA, se llevaron a cabo ensayos de IFI (**Figura 2.14**). Aunque la modificación por SUMO es conocida por dirigir las proteínas principalmente hacia el núcleo, SUMO-HA mostró una localización variable que resultó citoplasmática, por debajo de la membrana plasmática y en los núcleos (considerando los diferentes planos focales de la microscopia confocal). Ésto sugiere la presencia de distintas proteínas conjugadas a SUMO, con localización subcelular variable.



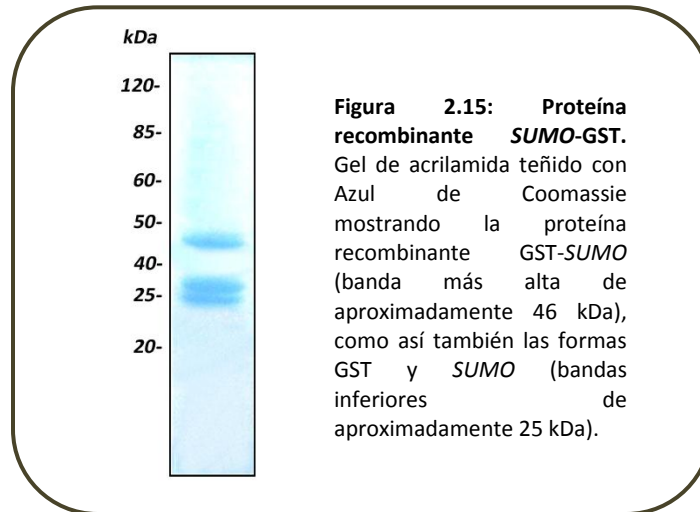


**Figura 2.14: Expresión de la proteína SUMO-HA en *Giardia lamblia* por IFI.** Ensayos de IFI utilizando un Acm anti-HA marcado con Alexa 546 (en rojo) y microscopía confocal, muestran que SUMO-HA presenta un patrón de localización variable por debajo de la membrana plasmática, citoplasma y núcleo. En azul: DAPI. Los insertos muestran DIC. Escala: 5  $\mu$ m

### 2.1.3.2. Estudio de la forma nativa de SUMO a través de la producción de anticuerpos monoclonales

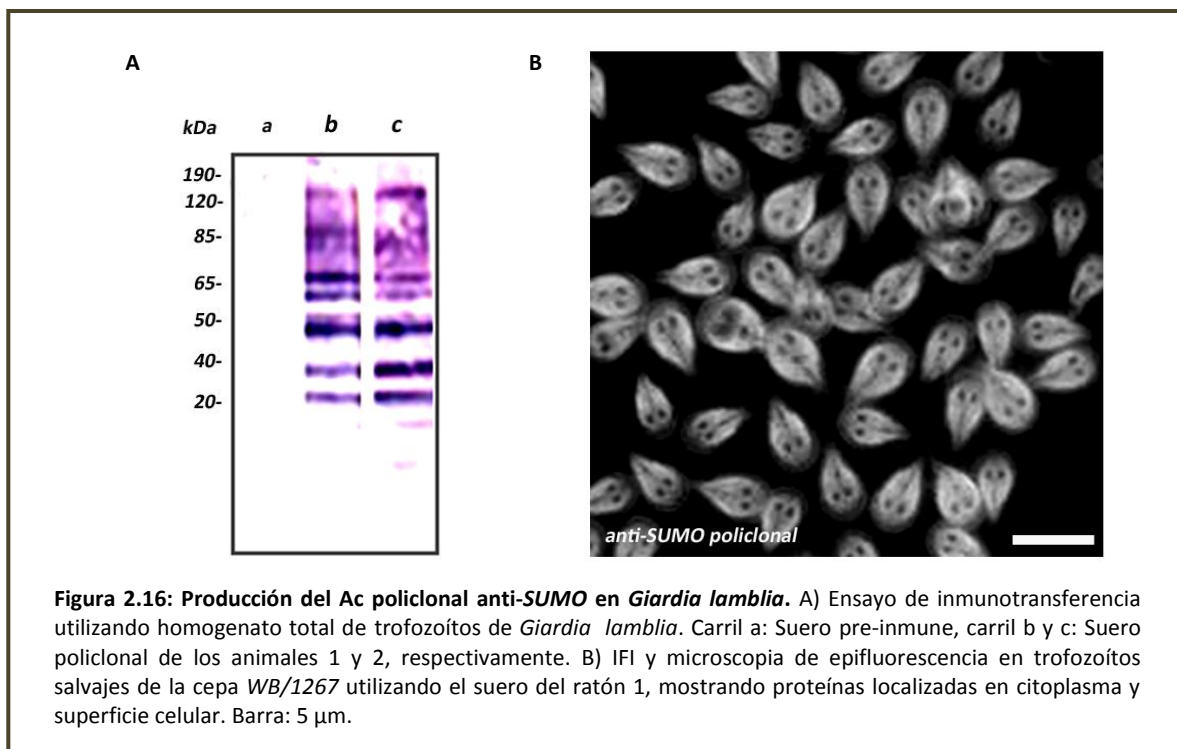
En paralelo a la estrategia de sobre-expresión de la proteína SUMO en trofozoítos transgénicos, y a fines de identificar la proteína nativa, se desarrolló un Acm dirigido contra la proteína recombinante SUMO de *Giardia*. Esta proteína fue producida en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo, a partir del plásmido de SUMO inserto en el vector pGEX-4T-3 como se describe en detalle en la sección de MyM. Brevemente, se amplificó el gen de SUMO en *Giardia* y se clonó en el vector pGEX-4T-3. Utilizando el sistema de fusión GST se expresó la proteína, y se purificó

a través de columnas constituidas por perlas de agarosa acopladas a glutatión. En la **Figura 2.15**, se muestra la proteína eluída sembrada en un gel de poliacrilamida teñido con solución azul de Coomassie, correspondiéndose la banda de mayor tamaño a la proteína *SUMO* unida a GST, y las bandas inferiores a las formas de GST y *SUMO* libres.

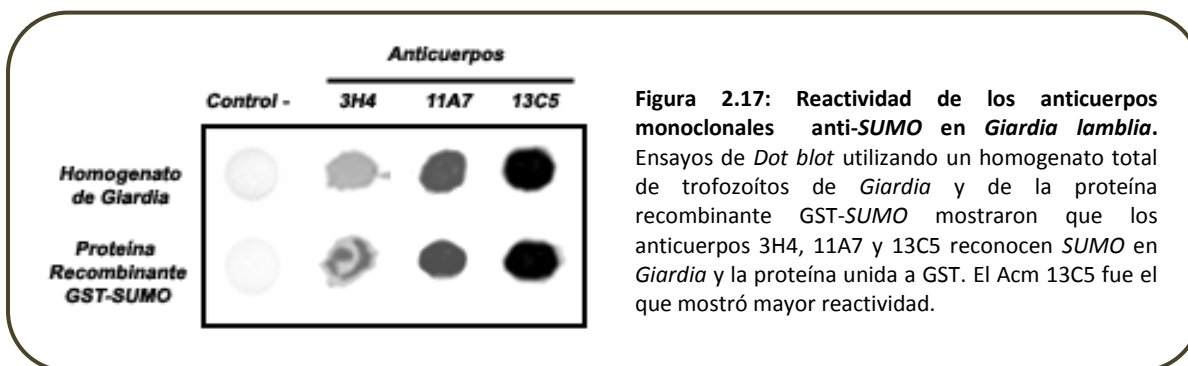


Con el antígeno emulsionado en el adyuvante se inmunizaron ratones de la cepa *Balb/c* y luego de dos inmunizaciones se extrajo sangre chequeando la reactividad del suero de estos animales y la producción de anticuerpos policlonales por IFI e inmunotransferencia en homogenatos totales de *Giardia*. La producción de anticuerpos policlonales se detectó en el suero de los ratones inmunizados (ratón 1 y 2) por inmunotransferencia como se muestra en la **Figura 2.16A** (carriles b y c), utilizando como control el suero pre-inmune (carril a), que no evidenció producción de anticuerpos anti-SUMO. La presencia de la proteína *SUMO* fue detectada además por IFI, localizándose ésta en el citoplasma y en la superficie celular de trofozoítos de la cepa *WB/1267*, como se observa en la **Figura 2.16B**.

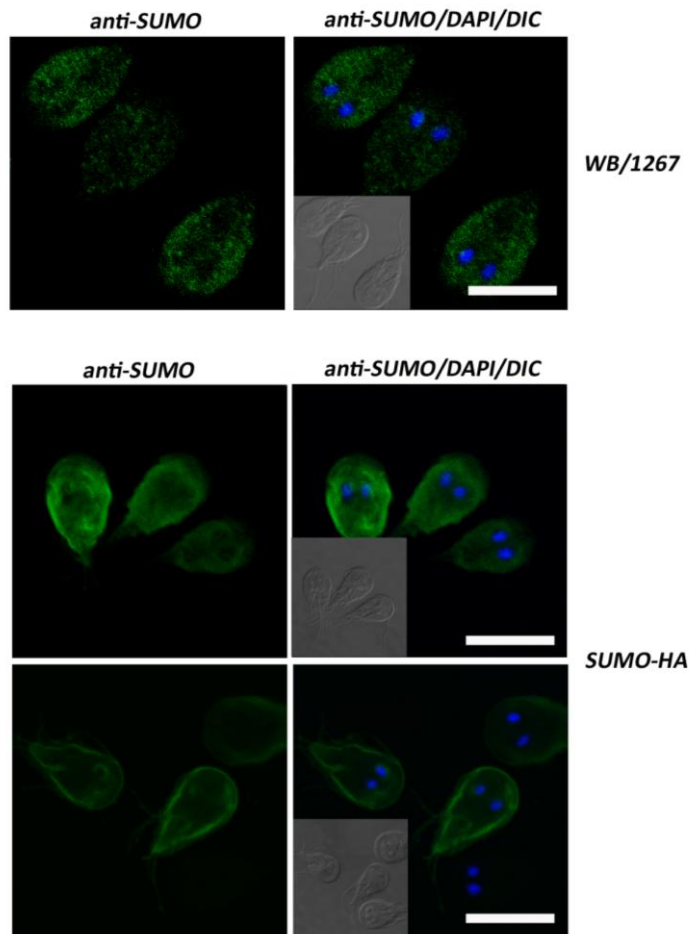




Los animales inmunizados fueron posteriormente sacrificados por dislocación cervical, aislándosele el bazo, y procediendo luego a la fusión de los linfocitos B con células del mieloma *NSO* para la formación de hibridomas. La producción de anticuerpos monoclonales por parte de los hibridomas, y la especificidad de estos anticuerpos se analizó mediante ensayos de *Dot blot* utilizando la proteína *SUMO* recombinante purificada y un homogenato de trofozoítos salvajes *WB/1267*. De entre tres anticuerpos generados (3H4, 11A7 y 13C5), el hibridoma productor del Acm 13C5 mostró la mayor reactividad contra la proteína *SUMO* endógena (**Figura 2.17**) y la proteína recombinante. Como control negativo se utilizó el Ac anti-HA (no relacionado).

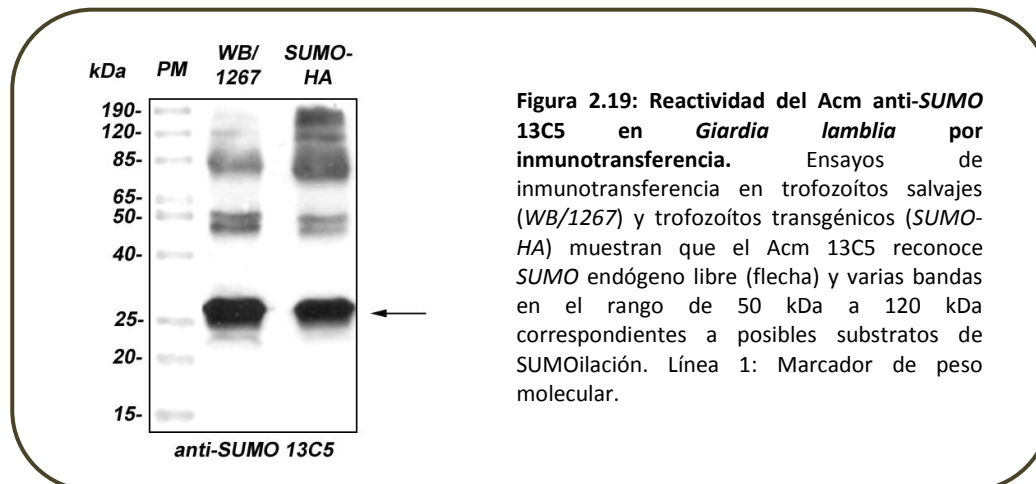


Como se muestra en la **Figura 2.18**, cuando el Ac anti-SUMO 13C5 se utilizó en ensayos de IFI detectó proteínas en un patrón de localización diferencial, según se considere la población de trofozoitos salvajes o transgénicos que sobre-expresan el constructo SUMO-HA. De esta manera, SUMO se mostró citoplasmática en la población de trofozoitos salvajes, y localizó en citoplasma, en cercanía a la membrana plasmática, en flagelos y núcleos de células transgénicas. Este patrón también fue observado en los trofozoitos transgénicos con el empleo del Acm anti-HA, y posiblemente las diferencias de localización entre una población celular y otra se deban al efecto de la sobre-expresión de la proteína SUMO-HA en las células transgénicas.



**Figura 2.18: Reactividad del Acm anti-SUMO 13C5 en *Giardia lamblia* por IFI.** Ensayos de IFI y microscopía confocal muestran un patrón principalmente citoplasmático (verde) en trofozoítos salvajes (WB/1267) mientras que en trofozoítos transgénicos *SUMO-HA* la localización resulta ser citoplasmática (panel superior) y en cercanía a la membrana plasmática (panel inferior). Se utilizó FITC como Ac secundario. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Los insertos muestran DIC. Escala: 10  $\mu$ m.

La realización de ensayos de inmunotransferencia (**Figura 2.19**), a partir de extractos provenientes de trofozoítos salvajes y transgénicos *SUMO-HA* reveló la presencia de bandas de proteína (entre 50 y 120 kDa) correspondientes a posibles conjugados a *SUMO*, tal como se observó en los ensayos provenientes de trofozoítos que sobre-expresaban el constructo *SUMO-HA*, utilizando el Acm anti-HA.



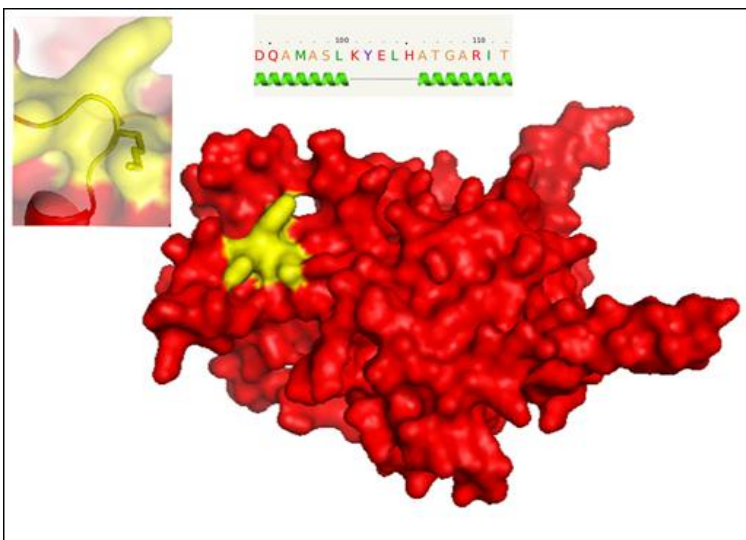
De los resultados expuestos con anterioridad se puede concluir, a modo de resumen, que *SUMO* y las proteínas requeridas en la cascada de *SUMO*ilación se encuentran presentes en *Giardia lamblia*, y que varios sustratos surgen como candidatos para su conjugación a *SUMO* en el parásito, representando el análisis de funcionalidad de los componentes de la vía de *SUMO*ilación, y la detección de proteínas *SUMO*iladas la base de futuros trabajos en nuestro laboratorio.

## 2.2. ADI como sustrato de *SUMO*ilación en *Giardia lamblia*

### 2.2.1. ADI contiene un motivo con alta probabilidad de unión a *SUMO* en la K101

Como se observó por ensayos de inmunotransferencia, ADI se expresa como una banda alta (con respecto al frente de corrida) de ~85 kDa, que difiere de su masa molecular predicha, y presenta además un motivo de unión a *SUMO*. Habiéndose demostrado que la *SUMO*ilación se encuentra presente en *Giardia lamblia*, y a los fines de determinar si ADI es un sustrato de *SUMO*ilación, se procedió a identificar el motivo de *SUMO*ilación en la secuencia de la enzima. Se utilizaron, para ello, los *software SUMOsp* 2.0 y *PCI-SUMO* empleando un seteo por defecto, que fueron capaces de predecir con alta sensibilidad (89.12%) un motivo de unión a *SUMO* (LKYE) en la Lisina (K) de posición 101

(K101) de la secuencia de ADI. Análisis de la estructura tridimensional de la enzima, mostraron además que el residuo K, dentro del motivo consenso, se encuentra expuesto, al igual que sucede en la mayoría de las proteínas que conjugan *SUMO* para su reconocimiento por la enzima *SUMO* E2, localizándose en un bucle rodeado por dos alfa hélices (**Figura 2.20**). Acorde con la literatura, el reconocimiento de la secuencia consenso sólo es posible si ésta se encuentra en un bucle o en una región desestructurada (Ulrich, 2009), siendo incapaz la enzima *SUMO* E2 de reconocer sitios consenso presentes en estructuras de hélices estables. Dado que la estructura tridimensional de ADI de *Giardia* no ha sido obtenida experimentalmente, se predijo dicha estructura utilizando el *software* *Phyre2* (Kelley and Sternberg, 2009). La localización del motivo de *SUMO*ilación, y la determinación de la orientación y exposición del residuo K de dicho motivo, se llevó a cabo utilizando *PyMol* (DeLano Scientific, USA) (en amarillo en la **Figura 2.20**).

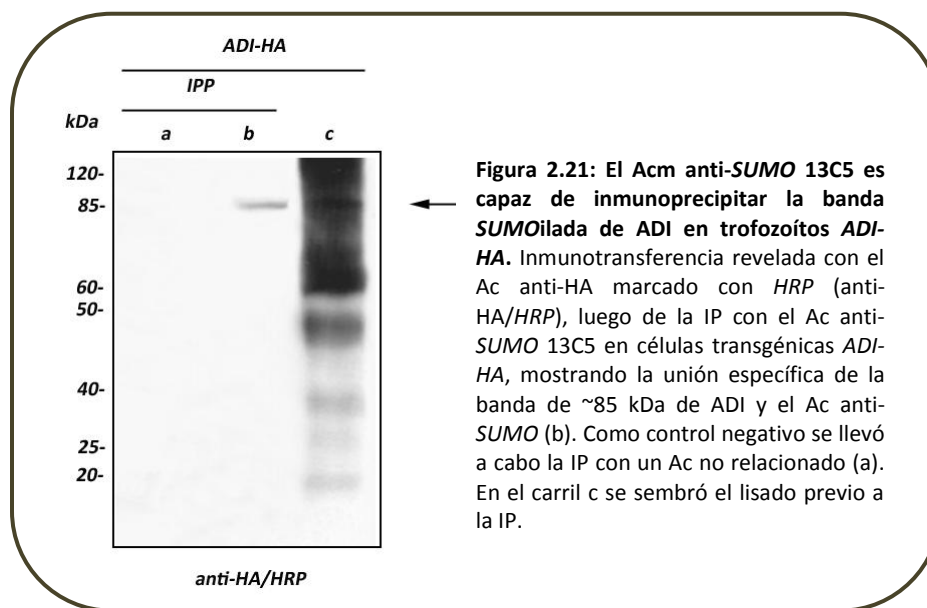


**Figura 2.20: Estructura tridimensional de ADI y localización del sitio de conjugación a *SUMO*.** Reconstrucción tridimensional de ADI utilizando los programas *Phyre 2* y *PyMol* mostrando la orientación del residuo K de posición 101 (amarillo). Se muestra además el motivo consenso KYEL en la estructura secundaria de la proteína.

### 2.2.2. ADI es una enzima *SUMO*ilada

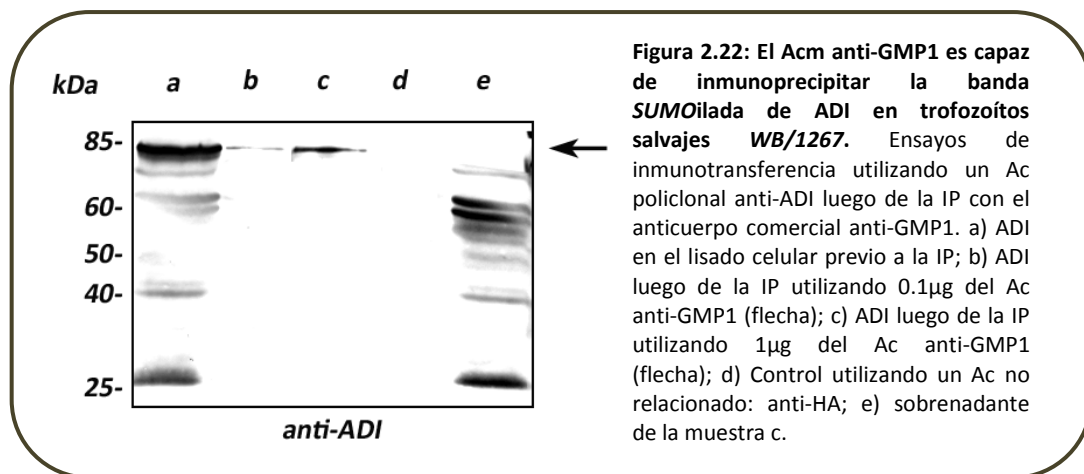
Habiéndose identificado el motivo de conjugación a *SUMO*, y para comprobar experimentalmente la *SUMO*ilación de ADI, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) en trofozoítos transgénicos *ADI-HA* utilizando el Acn anti-*SUMO* 13C5, según se describe en la sección de MyM. Acorde a la literatura, el proceso de *SUMO*ilación es dinámico, las proteasas de *SUMO* presentan un alto nivel de actividad (Ponder et al.,

2011), y menos del 10% de un sustrato se encuentra modificado por *SUMO* en un momento determinado (Johnson, 2004), razón por la cual se utilizaron en este ensayo trofozoítos transgénicos que sobre-expresan el constructo ADI-HA. Como se muestra en la **Figura 2.21**, el Acm 13C5 fue capaz de inmunoprecipitar la banda de ~85 kDa de ADI, corroborando que ésta corresponde a la forma *SUMO*ilada de la enzima.



**Figura 2.21:** El Acm anti-*SUMO* 13C5 es capaz de inmunoprecipitar la banda *SUMO*ilada de ADI en trofozoítos ADI-HA. Inmunotransferencia revelada con el Ac anti-HA marcado con HRP (anti-HA/HRP), luego de la IP con el Ac anti-*SUMO* 13C5 en células transgénicas ADI-HA, mostrando la unión específica de la banda de ~85 kDa de ADI y el Ac anti-*SUMO* (b). Como control negativo se llevó a cabo la IP con un Ac no relacionado (a). En el carril c se sembró el lisado previo a la IP.

Se realizaron, además, ensayos de IP con un Ac comercial anti-*SUMO1* (anti-GMP1) (**Figura 2.22**), empleando la muestra proveniente del lisado celular de trofozoítos salvajes. La membrana se reveló posteriormente por inmunotransferencia haciendo uso de un Ac policlonal anti-ADI biotinilado, que confirmó la *SUMO*ilación de la enzima (carriles b y c). Dos concentraciones diferentes de anti-GMP1 (0.1  $\mu$ g: carril b y 1  $\mu$ g: carril c) fueron empleadas. Como control del experimento se utilizó un Ac no relacionado (Acm anti-HA: carril d).

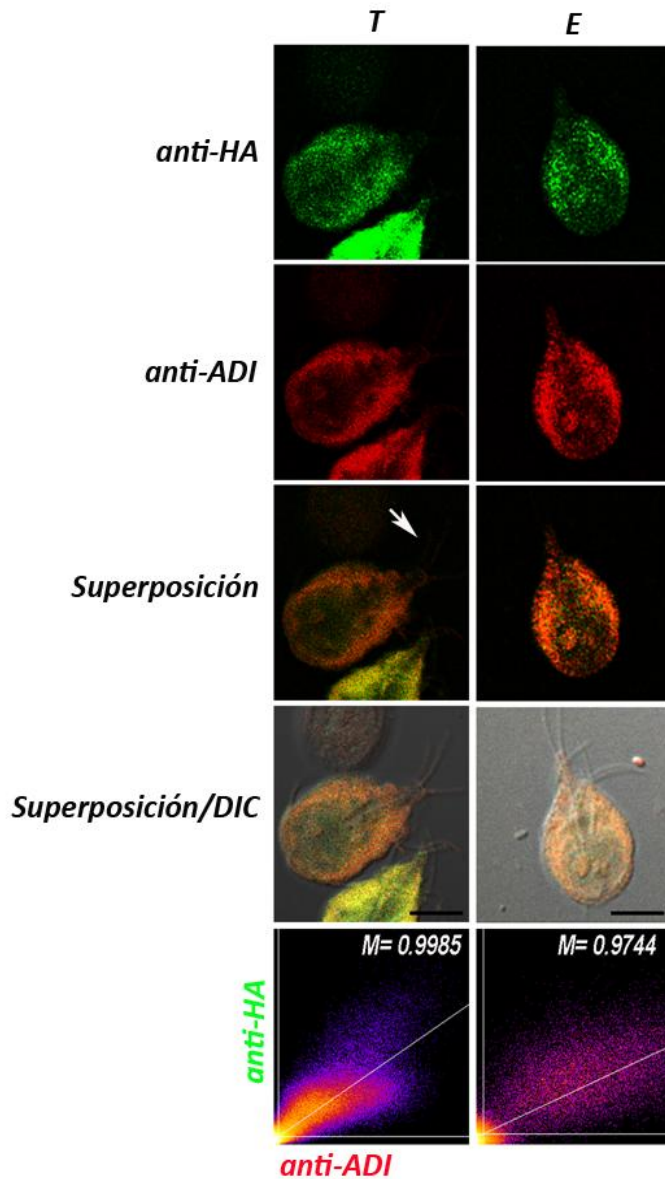


### 2.2.3. El residuo K101 como sitio de SUMOilación en ADI

Los experimentos más ampliamente utilizados para estudiar la función de la SUMOilación de una proteína particular involucran la eliminación del sitio de conjugación a SUMO a través de mutaciones sitio-dirigidas de los residuos K en los motivos consenso (Verger et al., 2003). Para corroborar experimentalmente si el residuo K101 corresponde al sitio de SUMOilación en ADI, y determinar el rol de esta modificación post-traduccional en la actividad de la enzima, se generó la mutante ADI<sub>K101A</sub>-HA, reemplazando el residuo K por A, en el contexto de un vector de expresión que codifica ADI con una etiqueta HA.

Se realizaron ensayos de IFI, empleando el Acm anti-HA marcado con FITC para analizar la expresión del constructo y el Ac policlonal anti-ADI marcado con Texas Red, para la detección de la especie nativa (Figura 2.23). No se observaron cambios significativos en el patrón de localización flagelar y citoplasmático de la enzima ADI nativa en trofozoitos ADI<sub>K101A</sub>-HA en crecimiento (T) y enquistamiento (E), aquello que indica un plegamiento correcto de la proteína expresada que es capaz de exponer los mismos epitopes que la proteína nativa. 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), y los gráficos de dispersión como se explica en la sección de MyM. Estos gráficos estimaron la cantidad de fluorescencia en base a la localización de ADI nativa (rojo, en el eje de las y) y de ADI-HA

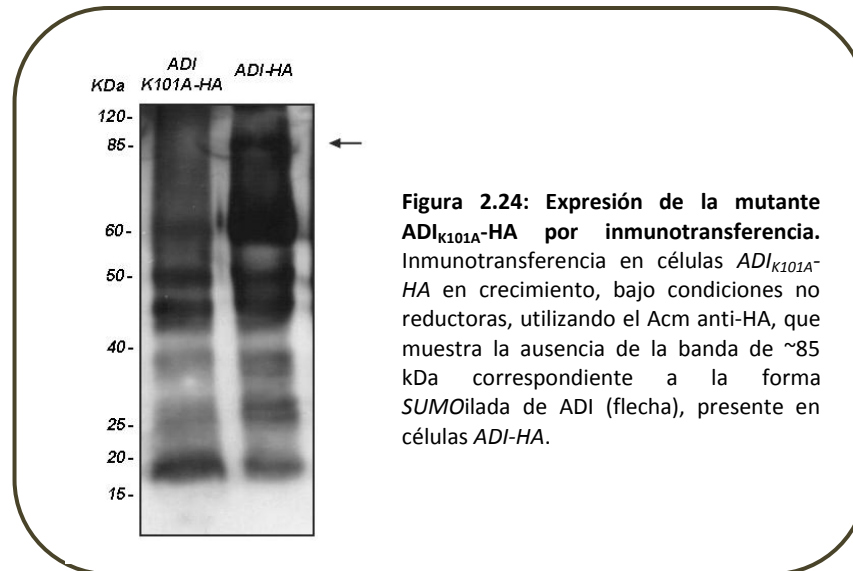
(verde, en el eje de las x), ubicándose sobre la diagonal del diagrama de dispersión los pixeles que colocalizan (amarillo). El alto grado de superposición entre ADI y ADI<sub>K101A</sub>-HA fue confirmado por el análisis cuantitativo de colocalización, mostrando el coeficiente M un valor de 0.9985 para la población de trofozoítos en crecimiento y de 0.9744 para los enquistantes, y los gráficos de dispersión un patrón de dispersión diagonal monopartita amarillo.



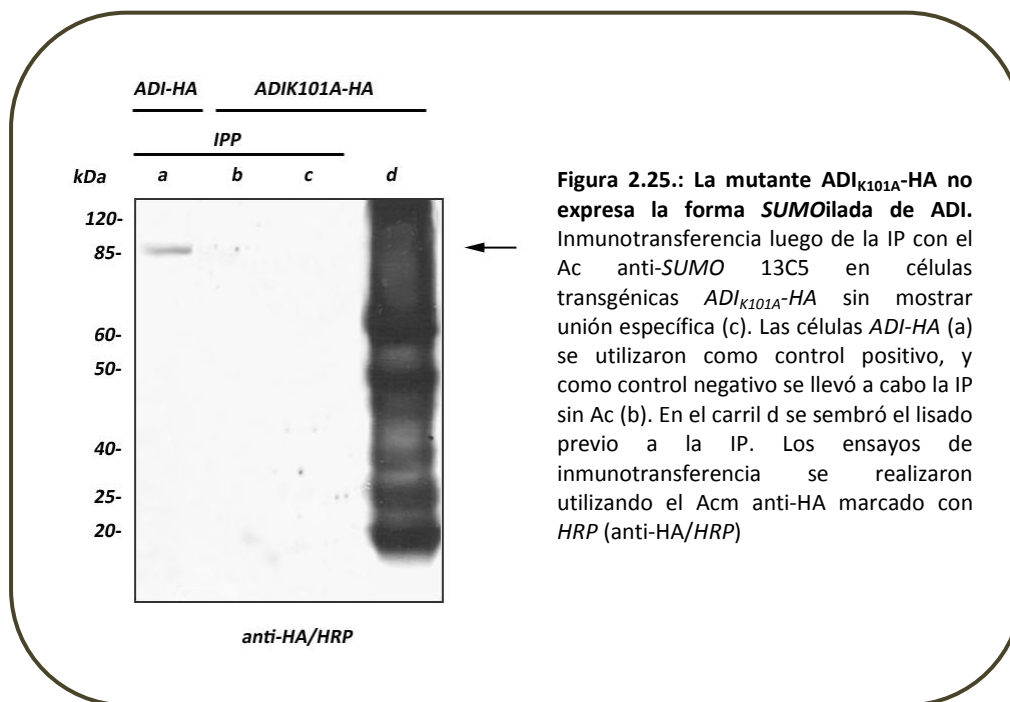
**Figura 2.23: Expresión de la mutante ADI<sub>K101A</sub>-HA por IFI.** IFI y microscopia confocal donde se observa la expresión de ADI<sub>K101A</sub>-HA (en verde) y de la proteína ADI nativa (en rojo) en trofozoítos transgénicos ADI<sub>K101A</sub>-HA, mostrando que la mutación en el sitio de unión a SUMO no altera el plegamiento correcto de la proteína ni en crecimiento (T) ni enquistamiento (E). En amarillo se observa la colocalización entre ambas proteínas en citoplasma y flagelos. Los paneles inferiores muestran en análisis cuantitativo a través del diagrama de dispersión y el coeficiente M. Escala, 5  $\mu$ m.



Acorde con lo esperado, cuando se realizaron ensayos de inmunotransferencia en trofozoítos que sobre-expresan ADI<sub>K101A</sub>-HA (**Figura 2.24**) se observó una reducción en la expresión de la banda de ~85 kDa de ADI respecto a los trofozoítos *ADI*-HA, que se correspondió además con un enriquecimiento de bandas de menor peso molecular al predicho para la enzima, pudiendo representar éstos productos de degradación de la proteína.



Considerando el incremento en la expresión de bandas de bajo peso molecular en los ensayos de inmunotransferencia de la mutante de ADI (ADI<sub>K101A</sub>-HA), y habiéndose descrito que la modificación por *SUMO* se encuentra asociada a la protección de proteínas contra la degradación (Johnson, 2004), es posible que la ausencia de *SUMO*ilación de ADI favorezca su degradación. Dado que no se observa ausencia de *SUMO*ilación en las células ADI<sub>K101A</sub>-HA es probable que las bandas de bajo peso molecular se encuentren *SUMO*iladas. Para descartar esta posibilidad se realizaron ensayos de IP (**Figura 2.25**) utilizando el Acm anti-SUMO 13C5, sin detectar bandas de proteína en trofozoítos ADI<sub>K101A</sub>-HA, incluyendo la forma *SUMO*ilada de la enzima.

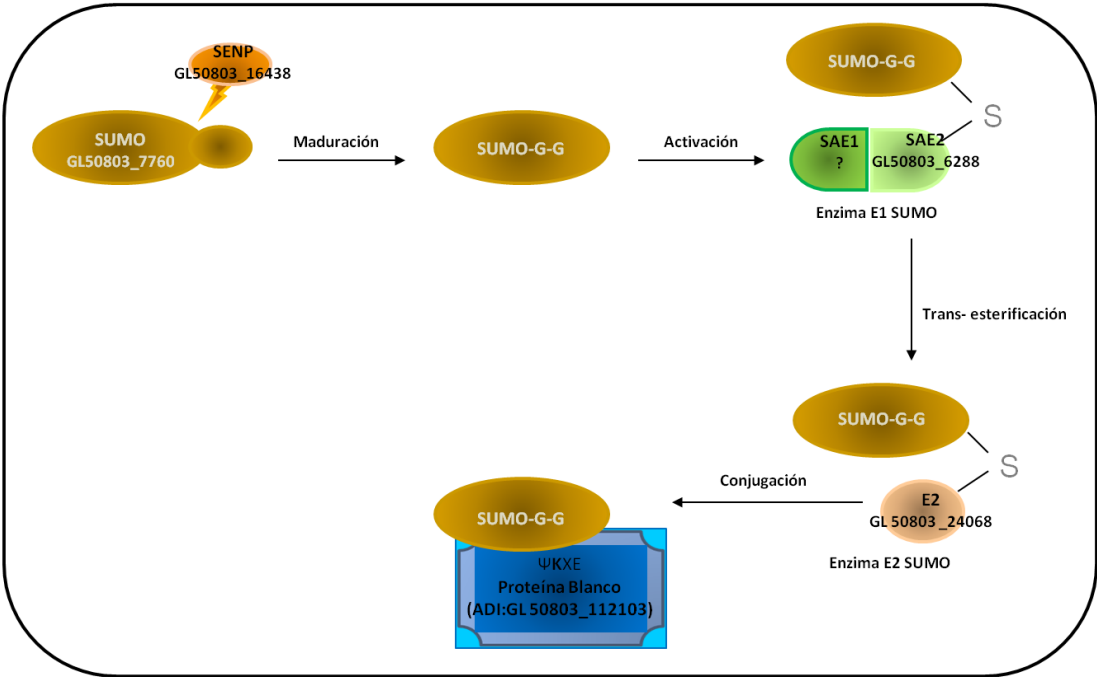


## Conclusiones Parciales:

Los resultados de este Capítulo representan, en conjunto, los primeros avances en la caracterización del proceso de SUMOilación en *Giardia*. Se encontró la presencia de la proteína SUMO, y de un sistema de conjugación a SUMO, además de posibles proteínas conjugadas a esta proteína, de localización tanto nuclear como citoplasmática. Aunque se ha sugerido la presencia de diversas proteínas blanco de conjugación a SUMO, hasta el momento sólo la enzima ADI pudo identificarse como sustrato de SUMOilación en el parásito. ADI se SUMOila en la K101, explicando esta modificación post-traduccional el incremento en su masa molecular respecto a la predicha.

En el esquema se representan, a modo de ilustración y resumen, los posibles componentes de la vía de SUMOilación identificados hasta el momento en *Giardia*. Ensayos funcionales y bioinformáticos más profundos, no obstante, serán necesarios para caracterizar la funcionalidad de las probables enzimas involucradas, e identificar otros sustratos conjugados a SUMO.

Sistema de SUMOilación en *Giardia lamblia*



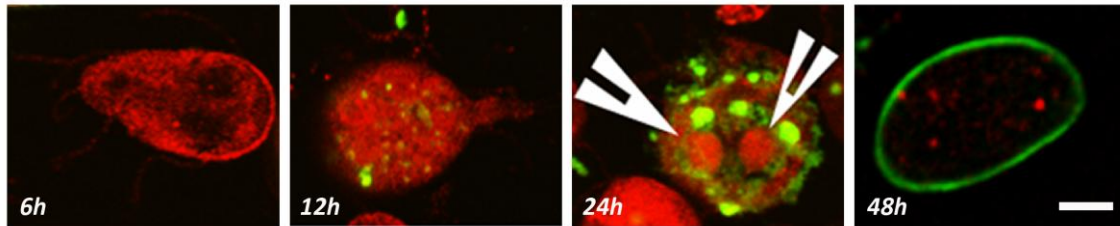
***Capítulo 3:***  
***ADI durante el Enquistamiento***  
***de Giardia lamblia***

## **Capítulo 3: ADI durante el Enquistamiento de *Giardia lamblia***

### **RESULTADOS:**

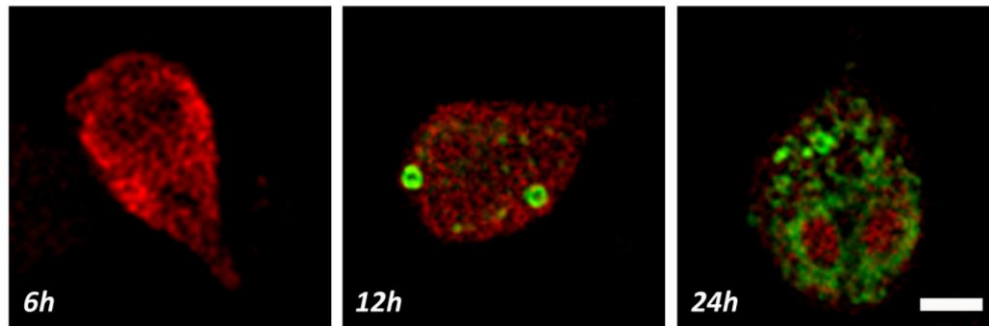
#### **3.1. ADI es translocada desde el citoplasma a los núcleos durante el enquistamiento**

Los procesos de variación antigénica y enquistamiento son dos mecanismos claves de adaptación en *Giardia lamblia*. Habiendo descrito el rol de ADI durante el crecimiento del parásito, el próximo objetivo de este *Trabajo de Tesis*, fue analizar si esta enzima desempeña algún rol durante el proceso de diferenciación a quiste. Para ello, se estudió en primera instancia la localización de la proteína durante el enquistamiento en trofozoítos salvajes de la cepa *WB/1267*, por ensayos de IFI (**Figura 3.1**). Se utilizó un Ac policlonal que reconoce la proteína ADI nativa y el Acm anti-*CWP1* para analizar el proceso de enquistamiento de las células. *CWP1* es una proteína que no se expresa durante el crecimiento, y que comienza a observarse dentro de las *ESVs* en las etapas tempranas del enquistamiento, incrementando su expresión concomitantemente con el aumento en el tamaño de estas vesículas hasta localizarse en la superficie del quiste maduro. Para estos ensayos, se indujeron trofozoítos a enquistar y se tomaron muestras a distintas horas de enquistamiento (6, 12, 24 y 48h). Las imágenes de la **Figura 3.1** muestran la localización subcelular de ADI (en rojo) y la expresión de *CWP1* (en verde), permitiendo observar un cambio de localización de la enzima desde el citoplasma, membrana plasmática y flagelos (entre las 6h-12h de enquistamiento) hacia los núcleos en los últimos estadios del enquistamiento (24h), cuando el parásito muestra gran cantidad de *ESVs* en su citoplasma. Finalmente, en el estadio de quiste (48h) la enzima ADI vuelve a mostrar localización citoplasmática sugiriendo estos experimentos, en conjunto, que durante el enquistamiento ADI ingresa a los núcleos para luego egresar de los mismos antes de la formación del quiste maduro.



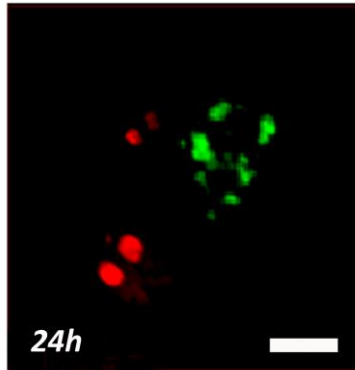
**Figura 3.1:** ADI transloca a los núcleos durante el enquistamiento en *Giardia lamblia*. Ensayos de IFI y microscopía confocal muestran que ADI (en rojo) transloca desde el citoplasma (6h-12h) a los núcleos (flechas) en las últimas etapas del enquistamiento (24h) cuando los trofozoítos se encuentran llenos de *ESVs* (en verde), y egresa de éstos antes de la formación del quiste maduro (48h). Escala: 5  $\mu$ m.

Los mismos ensayos se realizaron en células transfectadas con el constructo ADI-HA (Touz et al., 2008), aquellas que a pesar de constituir una población clonal que expresa ADI-HA, mostraron un gradiente en la expresión de la proteína, desde trofozoítos que la expresan poco, a aquellos con una gran expresión. Se observó por IFI, utilizando el Acm anti-HA que la mayoría de los parásitos, particularmente los que presentan baja o media expresión de ADI-HA, demostraron un cambio de localización de ADI desde el citoplasma hacia el núcleo, como se describió para las células salvajes (**Figura 3.2**).



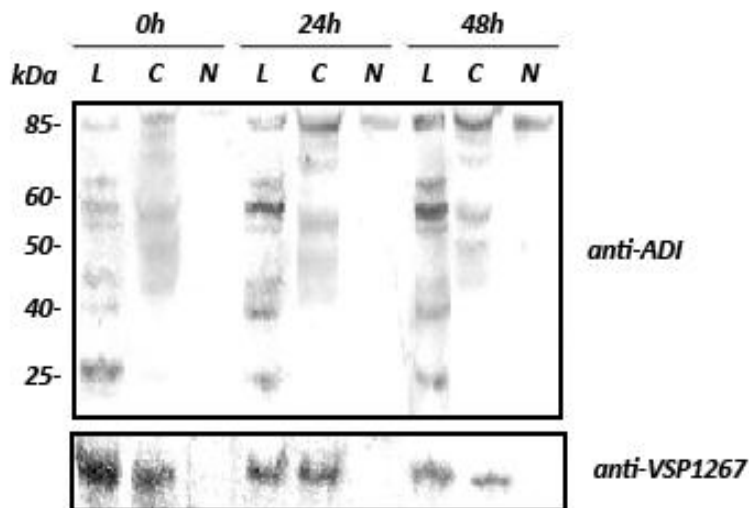
**Figura 3.2:** ADI-HA transloca a los núcleos en las últimas etapas del enquistamiento. Ensayos de IFI en células transgénicas *ADI-HA* con baja o media expresión del constructo, muestran que ADI-HA sufre un cambio de localización desde el citoplasma (6h) a los núcleos (12h-24h) durante el enquistamiento. En rojo: ADI-HA. En verde: *CWP1*. Escala: 5  $\mu$ m.

No obstante, resultó llamativo que trofozoítos con alta expresión de ADI-HA donde ésta muestra una localización nuclear muy evidente, no mostraron *ESVs*, incluso en estadios tardíos del enquistamiento (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3: Altos niveles de expresión de ADI-HA en núcleo reducen la expresión de CWP1.** Ensayos de IFI mostrando que trofozoítos con alta expresión de ADI-HA (rojo) en los núcleos no expresan CWP1 (verde) durante el enquistamiento. Escala: 5  $\mu$ m.

Para complementar estos estudios se realizó un fraccionamiento sub-celular a partir de trofozoítos salvajes en crecimiento y a distintos tiempos de enquistamiento (0, 24 y 48h), y se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia de las fracciones citoplasmáticas y nucleares, empleando el Ac policlonal anti-ADI (**Figura 3.4**). En estos ensayos el Ac reconoció la especie de ADI SUMOilada (de ~85 kDa), tanto en fracciones nucleares como citoplasmáticas, aunque su expresión nuclear resultó ser mayor con el incremento en el tiempo de enquistamiento. Para descartar la presencia de contaminación citoplasmática de las fracciones nucleares, se utilizó el Ac anti-VSP1267 que reconoce la proteína variable de superficie 1267 localizada en membrana plasmática. Estos ensayos muestran que durante las últimas etapas del enquistamiento la forma SUMOilada de ADI localiza en los núcleos.



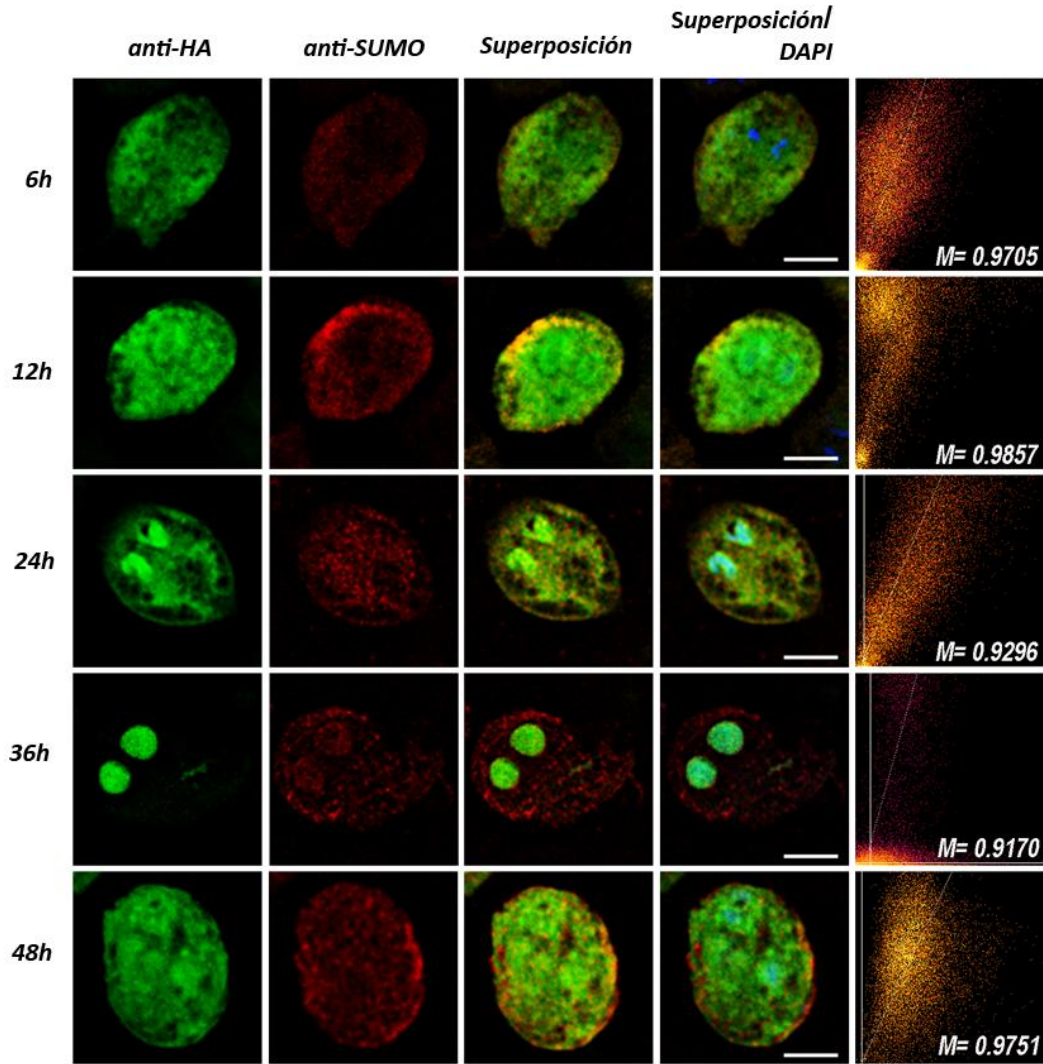
**Figura 3.4:** La forma *SUMO*ilada de ADI aumenta su expresión en núcleo a medida que transcurre el enquistamiento. Resultados del ensayo de inmunotransferencia luego de un fraccionamiento subcelular, mostrando las fracciones citoplasmáticas y nucleares utilizando el Ac policlonal anti-ADI, 24 y 48h luego de la inducción del enquistamiento. L: Lisado celular previo al fraccionamiento; C: Fracción citoplasmática; N: Fracción nuclear. Como control se empleó Ac anti-VSP1267, no mostrando positividad en las fracciones nucleares.

### 3.2. La translocación de ADI al núcleo durante el enquistamiento depende parcialmente de la *SUMO*ilación

Como se demostró previamente, ADI es una proteína conjugada a *SUMO* y transloca a los núcleos durante el enquistamiento. La *SUMO*ilación es una modificación post-traducciona que regula la localización subcelular de proteínas participando en la translocación de éstas al núcleo. Con el objeto de estudiar si la *SUMO*ilación se encuentra asociada al cambio de localización de ADI durante el enquistamiento, se realizaron ensayos de IFI durante el proceso de diferenciación a quiste en trofozoítos ADI-HA utilizando el Acm anti-*SUMO* 13C5 y el Acm anti-HA. Se emplearon, además, los gráficos de dispersión y el coeficiente M para cuantificar el grado de colocalización de ambas proteínas en cada estadio de enquistamiento considerado. Los gráficos de dispersión estimaron la cantidad de fluorescencia, basada en la localización de *SUMO* (rojo, en el eje de las y) y ADI-HA (verde, en el eje de las x), ubicándose sobre la diagonal del diagrama de dispersión los pixeles que colocalizan (en amarillo). Las muestras se tomaron a las 6h, 12h, 24h, 36h y 48h de enquistamiento.



Como se observa en la **Figura 3.5**, ADI-HA y *SUMO* localizaron en el citoplasma en las primeras horas de enquistamiento (6h), mostrando ambas proteínas un alto grado de colocalización como se refleja en la presencia de colores cálidos del diagrama de dispersión, y el valor del coeficiente M de 0.9705 (aún cuando la expresión de *SUMO* fue menor a la observada para ADI-HA). Alrededor de las 12h de enquistamiento, se visualizó un claro direccionamiento de ADI-HA hacia los núcleos, resultando evidente la localización de esta proteína alrededor de la membrana nuclear, aunque conservando la localización citoplasmática y en cercanía a la membrana plasmática, donde colocalizó con *SUMO*. El alto grado de superposición entre ambas proteínas se refleja en el valor del coeficiente M de 0.9857. La marcada localización nuclear de ADI-HA, y la concentración de *SUMO* en la zona nuclear se observaron a las 24h de enquistamiento, mostrando el coeficiente M un valor de 0.9296. A las 36h de enquistamiento ADI-HA se encontró exclusivamente en el núcleo, mientras que *SUMO* localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma, resultando el coeficiente M de 0.9170. A las 48h ambas proteínas colocalizaron en citoplasma.



**Figura 3.5: Colocalización ADI-HA y SUMO en trofozoítos transgénicos ADI-HA.** Ensayos de IFI y microscopía confocal muestran la expresión de ADI-HA (en verde) y SUMO (en rojo) a las 6h, 12h, 24h, 36h y 48h de enquistamiento. Se presentan además los resultados del análisis de colocalización cuantitativa representados por los gráficos de dispersión y los coeficientes M. Barra, 5  $\mu$ m.

De la misma manera, se utilizaron células transgénicas que sobre-expresan SUMO-HA en enquistamiento, y se realizaron ensayos de IFI y microscopía confocal empleando el Acm anti-HA conjugado a FITC para evaluar la expresión del constructo SUMO-HA (en verde), y el Ac policlonal anti-ADI para analizar la localización de la proteína ADI endógena (en rojo). Como se muestra en la **Figura 3.6** la localización de ADI y SUMO-HA fue citoplasmática en las primeras etapas del enquistamiento, aunque SUMO-HA mostró una notable localización en cercanía a la membrana nuclear. Transcurridas 12h, ambas

proteínas se mostraron en proximidad a la membrana nuclear y en la zona del cuerpo medio, incrementando notablemente la expresión de ADI en este estadio. El grado de superposición entre ambas proteínas fue alto tal como lo evidencian el gráfico de dispersión y el coeficiente M de 0.9730. Una marcada colocalización nuclear entre ADI y *SUMO*-HA se observó entre las 24h y 36h de enquistamiento, aunque ambas proteínas mostraron también localización citoplasmática. El alto grado de superposición de pixeles se tradujo en el alto valor del coeficiente M que resultó de 0.9985 y 0.9706, respectivamente. Como se observó en células que sobre-expresan ADI-HA, la enzima ADI nativa mostró un cambio de localización desde el citoplasma hacia los núcleos durante el proceso de diferenciación a quiste, siendo notable la localización nuclear entre las 24h y 36h de inducido el proceso. Una alta colocalización entre ADI y *SUMO* fue puesta en evidencia en los gráficos de dispersión y los coeficientes M en todos los estadios considerados en el ensayo.

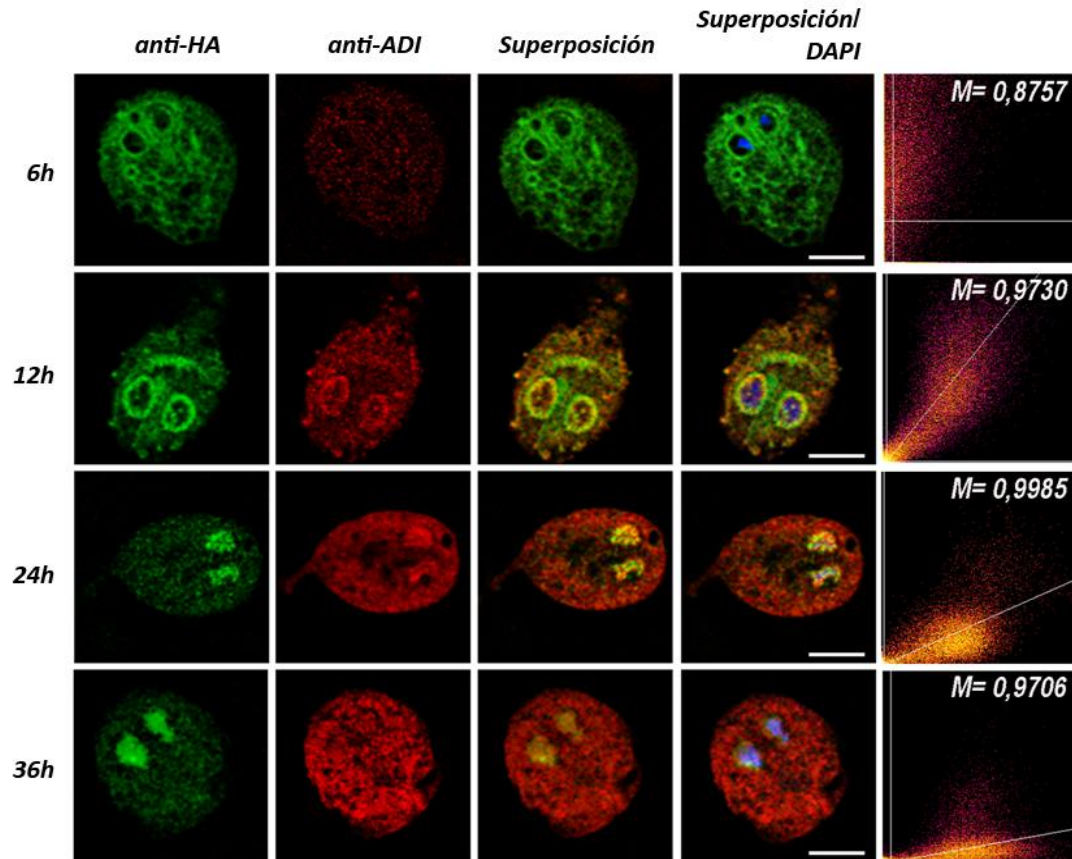
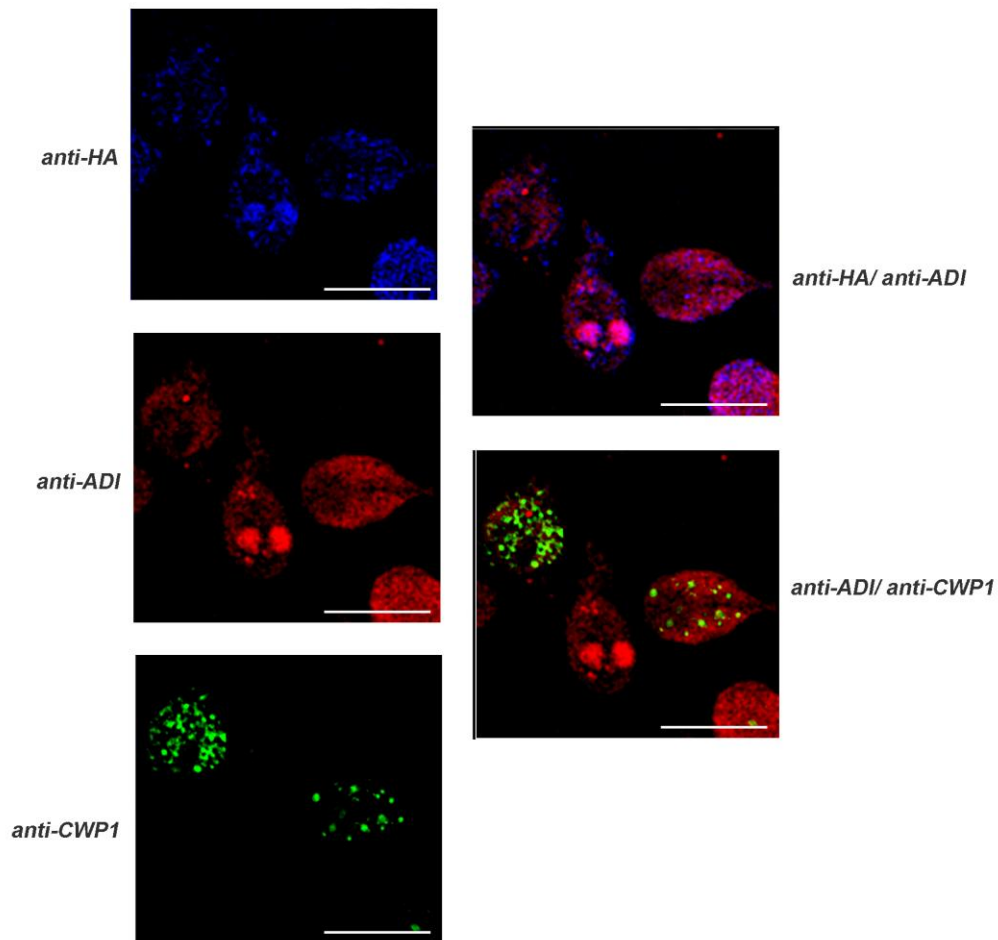


Figura 3.6: Colocalización *SUMO*-HA y ADI en trofozoítos transgénicos *SUMO*-HA. Ensayos de IFI muestran la expresión de *SUMO*-HA (en verde) y ADI (en rojo) a las 6h, 12h, 24h y 36h de enquistamiento. Se presentan además los resultados del análisis de colocalización cuantitativa representados por los gráficos de dispersión y los coeficientes M. Escala, 5  $\mu$ m.

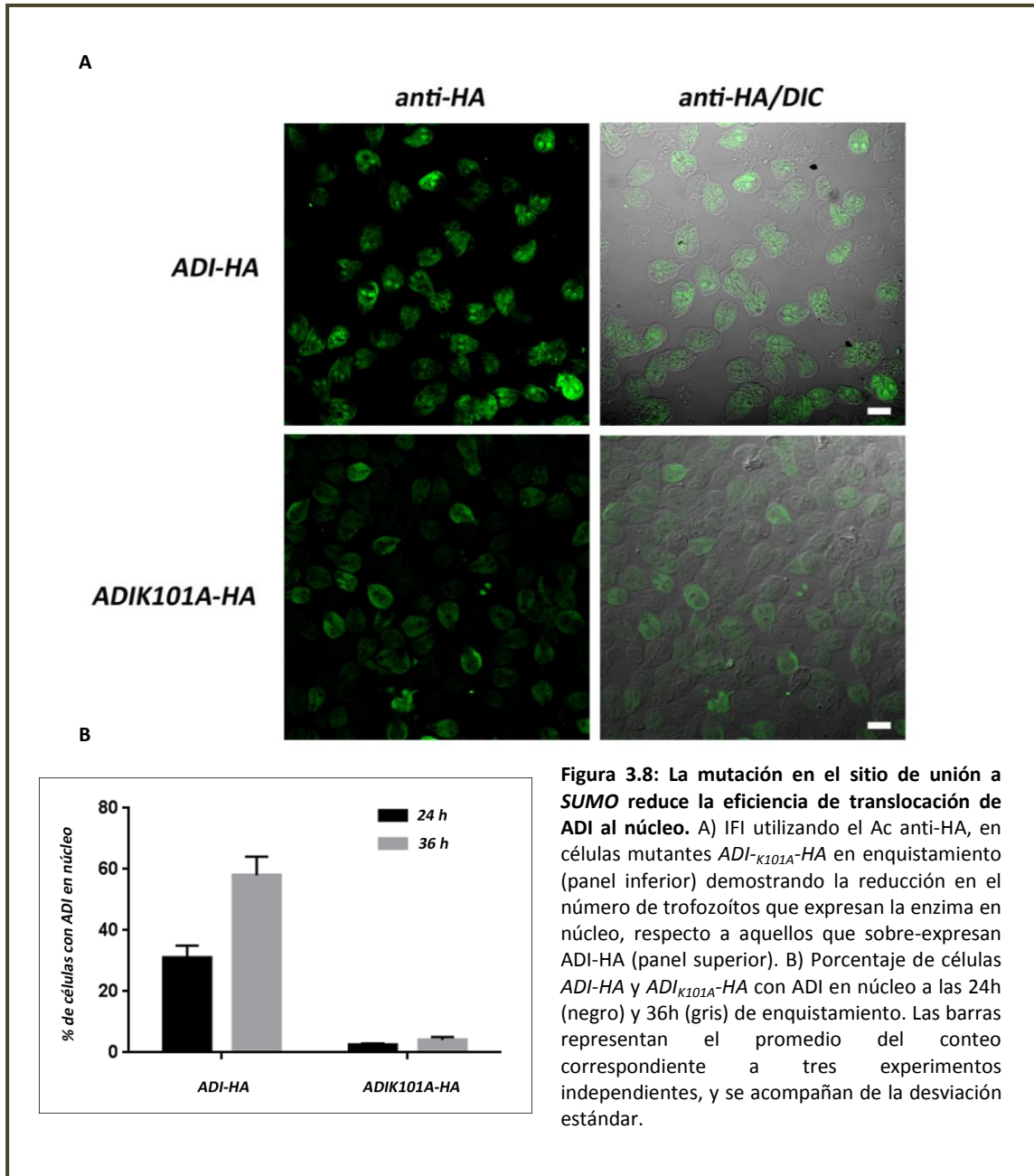
El análisis de las células en enquistamiento, empleando el anticuerpo anti-*CWP1*, demostró, además, que los trofozoítos que sobre-expresan altos niveles de *SUMO*-HA en el núcleo (colocalizando *SUMO* con ADI en núcleo) no expresaron *CWP1*, y no mostraron formación de quistes. Este resultado es similar al observado en trofozoítos ADI-HA con una alta expresión de la proteína (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** La translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento, reduce la expresión de *CWP1* en trofozoítos *SUMO-HA*. Ensayos de IFI muestran ausencia de *ESVs* (verde) en trofozoítos *SUMO-HA* (azul) que presentan ADI (rojo) en el núcleo. Escala, 10 μm.

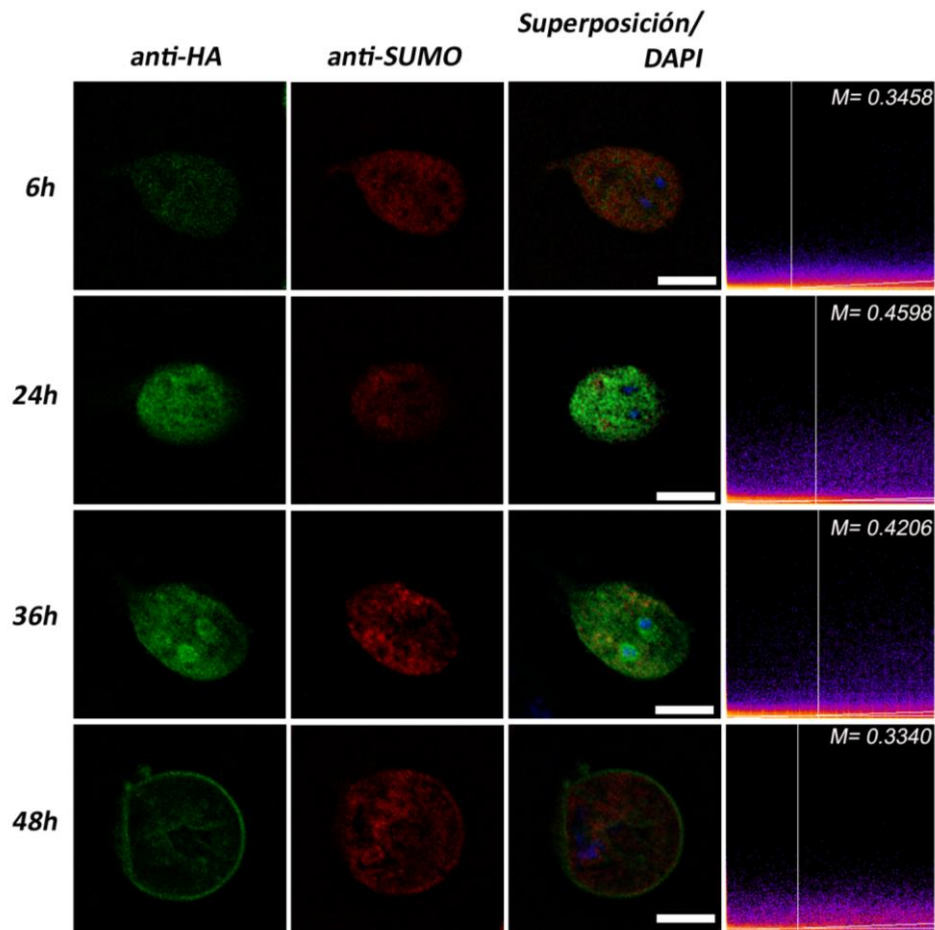
De lo expuesto con anterioridad, se puede especular que mientras *SUMO* se encuentre disponible en la célula, ADI se *SUMO*ila y transloca a los núcleos durante el enquistamiento. De esta manera, la *SUMO*ilación regula el cambio de localización de la enzima durante la diferenciación del parásito. A fin de confirmar esta hipótesis, se emplearon las células *ADIK101A-HA* que fueron inducidas a enquistarse, y se realizaron ensayos de IFI (**Figura 3.8A**). Como control del ensayo se emplearon trofozoítos transgénicos *ADI-HA*. Los resultados demostraron que pocos trofozoítos *ADIK101A-HA* mostraron presencia de ADI en núcleo en comparación con lo observado en las células *ADI-HA*. Cuantitativamente, menos del 10% del total de trofozoítos contabilizados mostró

ADI<sub>K101A</sub>-HA en núcleo a las 24-36h de enquistamiento, en comparación con un 30% y un 60% del total de trofozoítos que expresaron ADI-HA en núcleo, respectivamente (**Figura 3.8B**). Estos resultados sugieren, en conjunto, que la *SUMO*ilación de ADI promueve su translocación nuclear. No obstante, la presencia de ADI en núcleo en algunos trofozoítos *ADI<sub>K101A</sub>-HA* mutantes permite especular que, aún en ausencia de *SUMO*ilación la enzima continúa translocando a éstos, aunque con menor eficiencia que cuando la proteína se encuentra *SUMO*ilada, pudiendo encontrarse involucrado otro/otros mecanismos en su cambio de localización durante el enquistamiento.



A los fines de estudiar la relación entre la mutante de ADI (*ADI<sub>K101A</sub>-HA*) y *SUMO*, se realizaron ensayos de IFI y microscopia confocal a distintos tiempos de enquistamiento (6h, 24h, 36h y 48h), utilizando el Acm anti-*SUMO* 13C5 y el Acm anti-HA, observándose ausencia de colocalización entre *SUMO* y *ADIK101A-HA* en los trofozoítos transgénicos *ADIK101A-HA*, lo cual indica la pérdida de *SUMO*ilación de ADI en comparación a aquellos

que sobre-expresan ADI-HA. Estos resultados pudieron corroborarse en los gráficos de dispersión que mostraron ausencia de colores cálidos y fueron reflejados en los valores de los coeficientes  $M < 0.05$  en todos los estadios considerados. Aún cuando la localización de las proteínas fue citoplasmática entre las 6h y 24h de enquistamiento, ADI<sub>K101A</sub>-HA translocó a los núcleos alrededor de las 36h una vez inducido el proceso de diferenciación a quiste. A las 48h ADI<sub>K101A</sub>-HA, no obstante, volvió a localizar en citoplasma, acorde a lo observado en trofozoítos salvajes y en los que sobre-expresan ADI-HA (**Figura 3.9**).

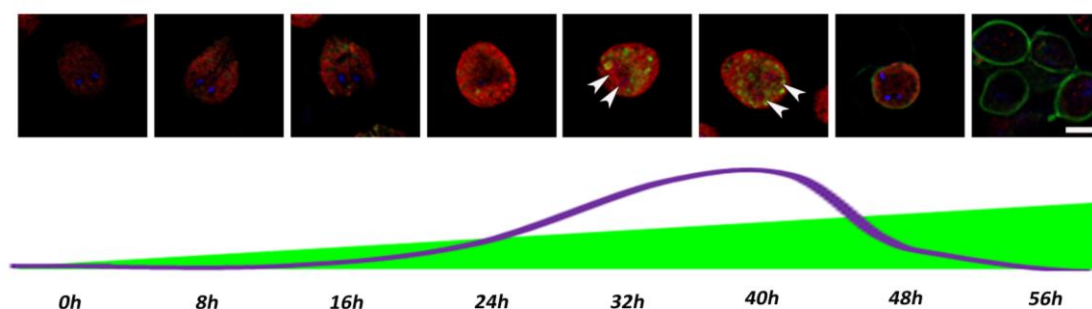


**Figura 3.9:** La mutación en la K101 de ADI muestra ausencia de *SUMO*ilación en ADI<sub>K101A</sub>-HA. Ensayos de IFI en trofozoítos ADI<sub>K101A</sub>-HA a las 6h, 24h, 36h y 48h de enquistamiento mostrando la localización subcelular de ADI<sub>K101A</sub>-HA (verde) utilizando el Acm anti-HA, y de *SUMO* (rojo) empleando un Acm anti-*SUMO* 13C5. Se presentan además los resultados del análisis de colocalización cuantitativa representados por los gráficos de dispersión y los coeficientes M. Escala, 5  $\mu$ m.

Para analizar si la translocación al núcleo de ADI<sub>K101A</sub>-HA, aún en ausencia de *SUMO*ilación, ocurre sincronizadamente con el enquistamiento, como se observó



previamente para ADI-HA y ADI nativa, se realizó un análisis tiempo-dependiente en células *ADIK<sub>101A</sub>-HA*. Para ello, se analizó la localización de la proteína *ADIK<sub>101A</sub>-HA* (en rojo) y la aparición concomitante de *CWP1* (en verde) por ensayos de IFI como se muestra en la **Figura 3.10**. A diferencia de lo observado para las células *ADI-HA* donde el proceso de translocación nuclear ocurre entre las 24h-36h de enquistamiento, los resultados mostraron una progresiva translocación de *ADIK<sub>101A</sub>-HA* hacia los núcleos durante el enquistamiento, presentando ésta localización nuclear (flechas) recién a las 32h-40h una vez inducido el proceso. En el quiste en formación (48h) y quiste maduro (56h) la localización de la enzima fue citoplasmática. Estos resultados sugieren que como *ADI-HA*, la forma mutante de ADI (*ADIK<sub>101A</sub>-HA*) también egresa del núcleo antes de la formación del quiste maduro.



**Figura 3.10: Translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento en ausencia de *SUMO*ilación.** IFI en células *ADIK<sub>101A</sub>-HA* a distintos tiempos de enquistamiento (0; 8; 16; 24; 32; 40; 48; 56h) mostrando el transporte citoplasma-núcleo de ADI (rojo). En verde: *CWP1*. Las flechas a las 32 y 40h de enquistamiento denotan la localización nuclear de ADI. El esquema muestra gráficamente la dinámica de la translocación de ADI a los núcleos a distintas horas de enquistamiento. Escala: 5  $\mu$ m.

Los resultados en su conjunto, indican que el cambio de localización de citoplasma a núcleo de ADI durante el enquistamiento es favorecido si la enzima se encuentra *SUMO*ilada. No obstante, no fue posible descifrar si la reducción de localización nuclear de la mutante *ADIK<sub>101A</sub>-HA* se debe a una baja eficiencia en la importación nuclear, a un menor tiempo de retención de la enzima en el núcleo o a una mayor degradación de la proteína, considerando que la *SUMO*ilación (o la falta de ella) es clave tanto para la translocación de proteínas al núcleo como para su protección proteolítica (Gill, 2004). A pesar de ello, es claro que la carencia de *SUMO*ilación retrasa pero no bloquea el

movimiento de ADI hacia los núcleos, pudiendo existir además otras señales involucradas en este proceso.

### 3.3. Las *NLSs* participan en la translocación de ADI a los núcleos durante el enquistamiento

Una de las vías mejor estudiadas para el transporte nuclear de proteínas con una masa molecular superior a los 50 kDa, es la que ocurre a través del Complejo del Poro Nuclear (del inglés *Nuclear Pore Complex* o *NPC*), e involucra receptores solubles (las importinas) que reconocen a sus cargos específicamente a través de una secuencia de aminoácidos conocida como señal de localización nuclear (*NLS*, del inglés: *Nuclear Localization Signal*), facilitando el paso de los complejo receptor-sustrato al núcleo (Rothenbusch et al., 2012). Las *NLSs* mejor conocidas y más abundantes son las denominadas *NLSs* clásicas, formadas por un grupo de residuos básicos entre los que predominan las lisinas y las argininas. Existen dos tipos de *NLSs* clásicas: las monopartitas y las bipartitas. Las *NLSs* monopartitas están constituidas por un único grupo de residuos básicos mientras que las *NLSs* bipartitas se componen de dos aminoácidos básicos, seguidos de una región espaciadora de 10-12 aminoácidos y un grupo básico donde tres de cinco aminoácidos resultan básicos. Este tipo de señales son reconocidas específicamente por la Importina  $\alpha$ , y las proteínas que las contienen son transportadas al núcleo por el heterodímero Importina  $\alpha$ /Importina  $\beta$ 1 (Kosugi et al., 2009).

A fin de dilucidar posibles *NLSs* en la secuencia de ADI, se realizaron análisis bioinformáticos pudiendo detectar en ADI la presencia de dos *NLSs* (**Figura 3.11**): una señal conservada bipartita RRGIVMGQFQAPQRRREQ con dos residuos básicos (RR) y tres residuos básicos (RRR) separados por once residuos espaciadores, y una secuencia consenso monopartita PQRRREQ que se inicia con una prolina (P) seguida de un segmento básico con tres residuos R.

```

MTDFSKDKEKLAQATQGGENERAEIVVHLPQGTSLNPEGNLLEEPICPDELRRDH
EGFQAVLKEKGCrvYMPYDVLSEASPAEREVLMDQAMASLKYELHATGARITPKMKYCVS
DEYKRKVLSSALSTENLVDVILSEPVHLAPGVRNTALVTNSVEIHDSNNMVFMRDQQITT
RRGIVMGQFQAPQRRREIIVLALIFWKRLGARVVGDCREGGPHCMLEGGDFVVPSPGLAMM
GVGLRSTYVGAQYLMKDLLGTRRFVAVKDCFDQHQRMLDCTFSVLHDKLVVLDYIC
SGMGLRYVDEWIDVGADAVKKAKS SAVTCGNYVLAKANVEFQQWLSSENGYTI VRI PHEYQ
LAYGCNNLNLGNVCVLSVHQPTVDFIKADPAYISYCKSNLPLNGLDLVYVPRGITRMYG
SLHCASQVVYRTPLAPAAVKACEQEGDGI AAIYEKNGEPVDAAGKKFDCVIYIPSSVDDL
IDGLKINLRDDAAPSREI IADAYGLYQKLVSEGRVPYITWRMP SMPVVS LKGA AKAGSLK
AVLDKIPQLTFPTPKAVEGAPAAAYTRYLGLAQADICVDIK
    
```

**Figura 3.11: Secuencia de aminoácidos de ADI y sus dos NLSs.** ADI muestra en su secuencia primaria dos NLSs: una bipartita (en rojo) RRGIVMGQFQAPQRRRE entre las posiciones 181-197 y una monopartita (en azul) PQRREI entre las posiciones 192-198.

En vistas a dilucidar si las NLSs conservadas en ADI resultan funcionales y son responsables del ingreso de la enzima al núcleo, se realizaron construcciones con mutaciones en el motivo bipartita y el monopartita. En base a análisis bioinformáticos, las mutaciones se diseñaron considerando la influencia en la localización teórica de la proteína luego de la sustitución por el residuo A (**Tabla 3.1**) considerando distintas posibilidades de participación de estos motivos en la translocación de la proteína a los núcleos.

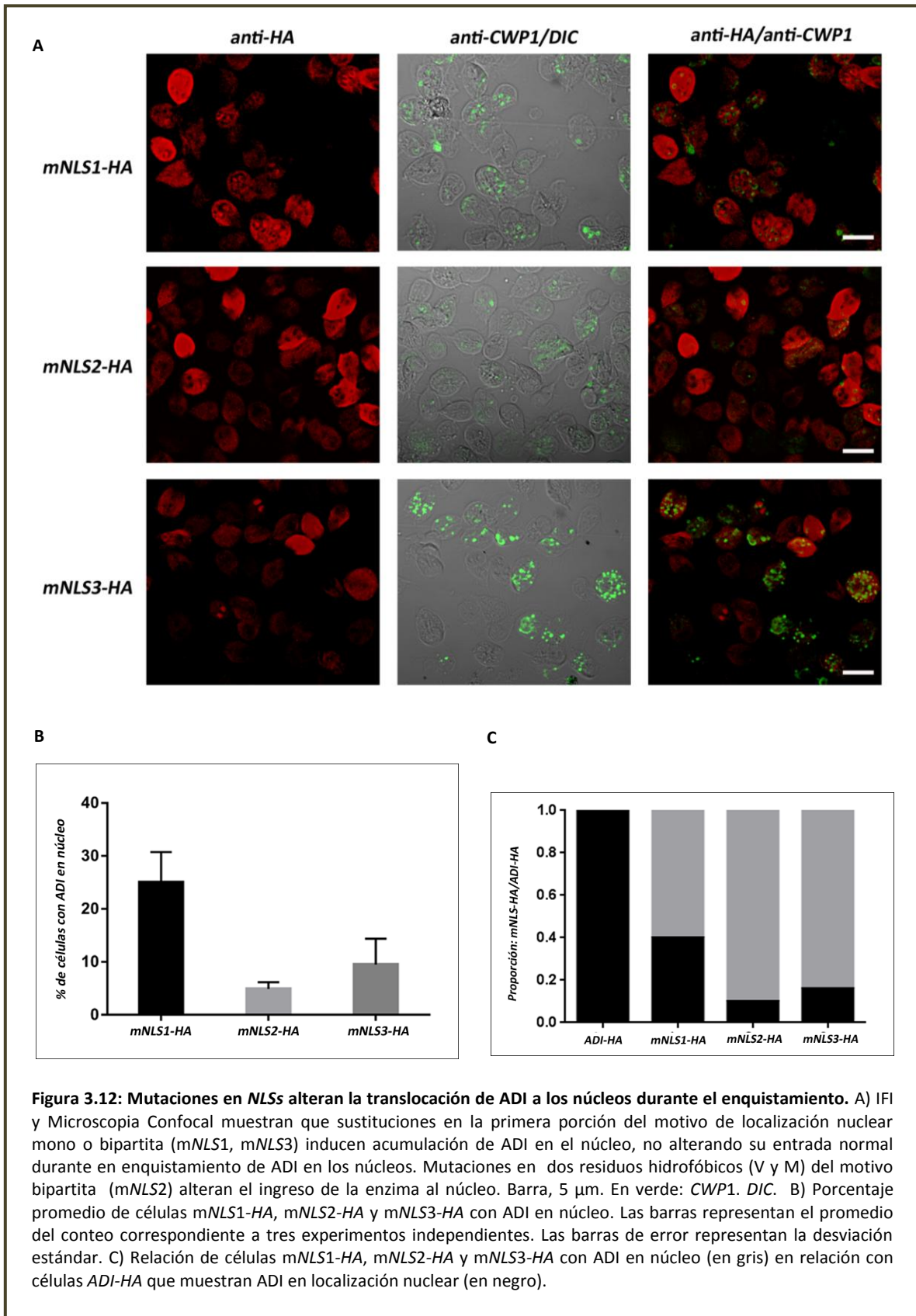
**Tabla 3.1: Mutaciones en las NLSs de ADI y la predicción *in silico* de su participación en la translocación de la proteína al núcleo**

Mutación	RRGIVMGQFQAPQRRREI	RRGIVMGQFQAPQRRRE	PQRREI
mNLS1	AAGIVMGQFQAPQRRREI	Falta de unión	Unión
mNLS2	RRGIAAGQFQAPQRRREI	Unión	Unión
mNLS3	RRGIVMGQFQAQRRREI	Unión	Falta de unión
mNLS4	RRGIVMGQFQAPQRRRAA	Falta de unión	Falta de unión

Utilizando el programa provisto por STRATAGENE (*Quick-Change Primer Design Program*) se diseñaron los cebadores para cada una de las mutaciones, y empleando como templado el plásmido ADI-HA, se siguió el protocolo provisto en el ensayo de mutagénesis *QuikChange* (*Stratagene*), como se describe en la sección MyM. De todas las mutaciones posibles, la mNLS4 no pudo expresarse en bacterias, descartándose del análisis.

Para estudiar si las NLSs se encuentran involucradas en el cambio de localización de ADI durante el proceso de diferenciación a quiste, se indujo el enquistamiento en trofozoítos sobre-expresando ADI-HA (como control positivo) y trofozoítos con las

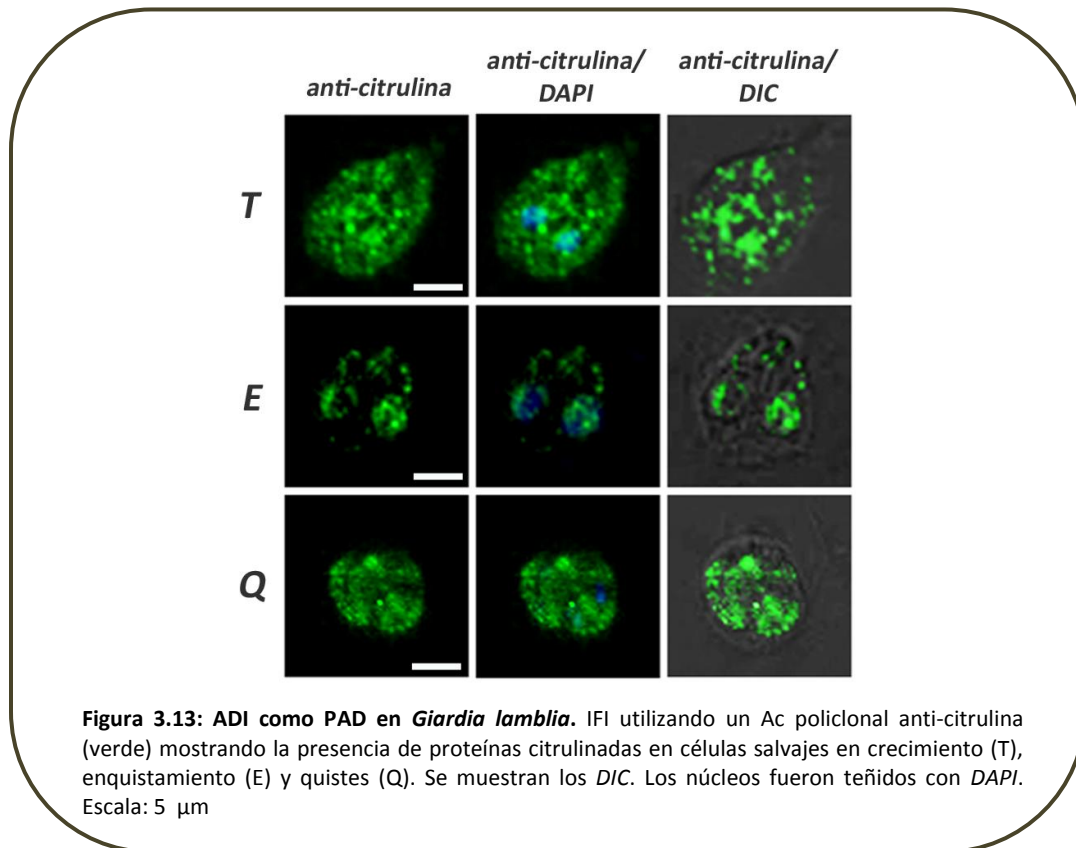
distintas mutaciones en los sitios de localización nuclear (*mNLS1-HA*, *mNLS2-HA*, *mNLS3-HA*), recogiendo las células a las 36h de enquistamiento para la realización de ensayos de IFI (**Figura 3.12A**). El proceso de enquistamiento se evaluó con el Acm anti-CWP1 para correlacionar la localización subcelular de cada constructo con la expresión de estas proteínas específicas del enquistamiento. Los resultados demostraron que todas las sustituciones realizadas, redujeron la acumulación de ADI en los núcleos en las células enquistantes en comparación con los trofozoítos transgénicos *ADI-HA*. Sin embargo, sustituciones por A en los dos primeros residuos básicos (RR: *mNLS1*) de la primera porción del motivo bipartita (posición 181-182) mostraron una menor disminución (60%) de la translocación al núcleo, respecto a las otras mutaciones (**Figura 3.12B y C**). Las sustituciones de Valina (V) y Metionina (M) (VM: *mNLS2*) por A, y la sustitución de P por A en la primera parte del motivo monopartita (P: *mNLS3*) mostraron una reducción del 90 y 85%, respectivamente, comparados con los trofozoítos transgénicos *ADI-HA*. Los resultados en trofozoítos transgénicos *mNLS1-HA* y *mNLS3-HA* fueron acordes a la predicción *in silico*, en tanto *mNLS2-HA* (donde la translocación al núcleo no debería haber sido afectada, según la predicción teórica) resultó ser la población que mostró menor número de células con ADI en núcleo. Los resultados sugieren entonces, que ambas *NLS*s: la monopartita y bipartita son sitios activos involucrados en el ingreso de ADI al núcleo, y que mutaciones en otros aminoácidos, además de los residuos básicos, alteran la entrada de la proteína al núcleo.



### 3.4. ADI actúa como PAD sobre histonas durante el enquistamiento

Las histonas, además de su rol en el empaquetamiento del ADN, pueden regular la transcripción a través de modificaciones de sus extremos N-terminales, representando éste uno de los principales mecanismos de regulación epigenética de la expresión génica (Yee et al., 2007). En nuestro grupo de trabajo se ha descrito que la enzima ADI puede comportarse como una PAD, siendo importante en el proceso de variación antigénica. De manera específica, se demostró que ADI actúa sobre el extremo citosólico CRGKA de las VSPs transformando la arginina presente en el mismo en citrulina; resultando esta modificación clave para el cambio de una VSP por otra (Touz et al., 2008). En células eucariotas, se ha descrito que PAD4 recluta promotores de numerosos genes a través de la deiminación de las histonas H3 y H4, asociándose esta modificación a la disminución del nivel transcripcional de los genes a través de un mecanismo no completamente dilucidado (Wang et al., 2004). Siguiendo esta línea de pensamiento, y según nuestras hipótesis, ADI translocaría a los núcleos durante el enquistamiento para citrulinar histonas regulando negativamente el proceso de diferenciación a quiste. El enquistamiento en *Giardia* es regulado a nivel transcripcional y resulta en altos niveles de transcripción de genes específicos de enquistamiento. Para investigar si los mecanismos epigenéticos dependientes de la citrulinación de histonas se encuentran involucrados en el proceso de diferenciación a quiste, se compararon los niveles de citrulinación en células en crecimiento y enquistamiento. La detección de citrulinación en proteínas no resulta un procedimiento sencillo, requiriendo en general un proceso de enriquecimiento de proteínas citrulinadas y anticuerpos capaces de detectar la citrulina modificada (Senshu et al., 1992; Tutturen et al., 2010). Para ello, y con el fin de dilucidar en principio la localización subcelular de proteínas citrulinadas en *Giardia*, se realizaron ensayos de IFI (**Figura 3.13**), utilizando un Ac policlonal anti-citrulina, en trofozoítos salvajes en crecimiento y luego de 36h de enquistamiento; como así también sobre quistes. Estos ensayos mostraron un patrón difuso de localización de proteínas citrulinadas en el estadio de crecimiento y quiste, y la agregación de proteínas citrulinadas alrededor de los núcleos y dentro de ellos, en las últimas etapas del enquistamiento. El patrón de localización de

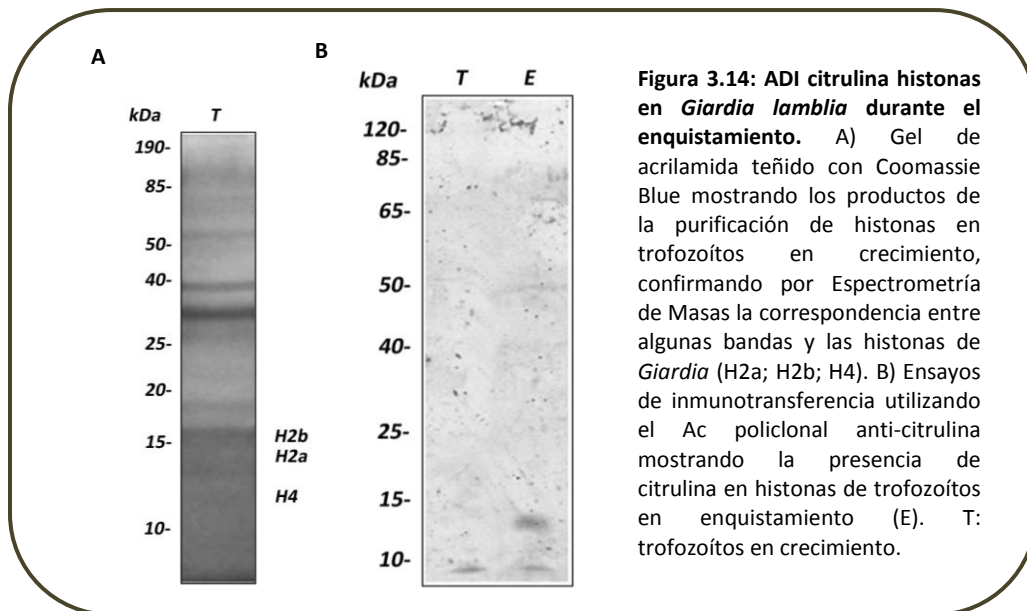
proteínas citrulinadas es acorde al observado para ADI, la enzima responsable del proceso de deiminación en *Giardia lamblia*.



Dos copias de genes de cada una de las histonas H2a, H2b y H3, y tres copias del gen de H4 han sido identificadas en *GDB*, sin encontrarse el gen codificante para la histona H1 (Yee et al., 2007). A fin de demostrar si ADI actúa como PAD de histonas, se purificaron histonas de trofozoítos salvajes y de aquellos que sobre-expresan ADI-HA en crecimiento y enquistamiento (36h), a partir de un protocolo de extracción con ácido sulfúrico y acetona para histonas, mostrando los geles de *SDS-PAGE* histonas purificadas con pesos moleculares de entre 10-20 kDa, en concordancia con las masas moleculares predichas para las histonas de *Giardia*. Otras proteínas, presentes en forma de bandas de menor movilidad electroforética (entre ~20 kDa y ~85 kDa) pudieron observarse como contaminantes de la preparación de histonas, y pueden corresponderse a otras proteínas

cromosomales, como se ha informado en otros procedimientos de purificación de histonas (Triana et al., 2001).

Para identificar histonas, las bandas de *SDS-PAGE* (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) fueron escindidas, digeridas con tripsina y analizadas por espectrometría de masas (MALDI-ToF-MS del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), correspondiendo la banda de ~11 kDa con la histona H4, la banda de ~14 kDa con la histona H2A y la banda de ~15 kDa que se identificó como histona H2B. Una banda de ~18 kDa no pudo identificarse por este método, y es posible que corresponda a la histona H3 considerando la movilidad electroforética sugerida (Triana et al., 2001). Se realizaron posteriormente ensayos de inmunotransferencia sobre las fracciones purificadas, para detectar la presencia de residuos citrulinados utilizando el Ac policlonal anti-citrulina. Estos ensayos, mostraron la presencia de proteínas citrulinadas en la región del gel comprendida entre los 11-16 kDa correspondiente con las masas moleculares predichas para histonas en células en enquistamiento, no identificándose citrulinación en trofozoítos en crecimiento. Los análisis del patrón de histonas citrulinadas en células transgénicas *ADI-HA* no mostraron diferencias significativas con lo observado para células salvajes (**Figura 3.14**).



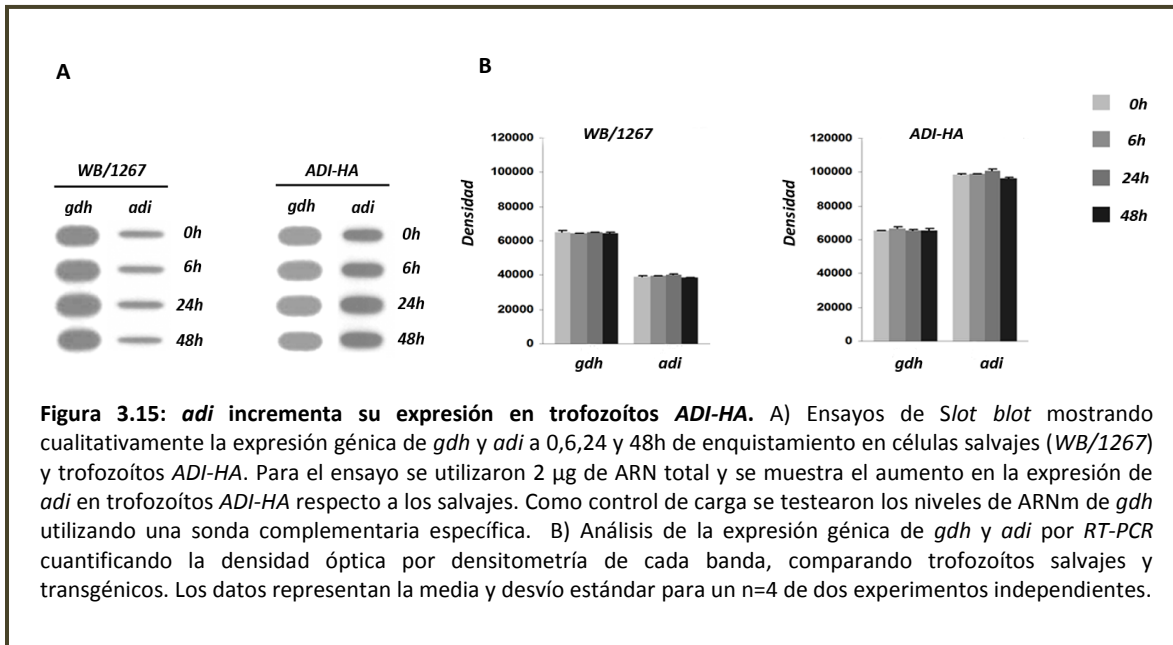
**Figura 3.14: ADI citrulina histonas en *Giardia lamblia* durante el enquistamiento.** A) Gel de acrilamida teñido con Coomassie Blue mostrando los productos de la purificación de histonas en trofozoítos en crecimiento, confirmando por Espectrometría de Masas la correspondencia entre algunas bandas y las histonas de *Giardia* (H2a; H2b; H4). B) Ensayos de inmunotransferencia utilizando el Ac policlonal anti-citrulina mostrando la presencia de citrulina en histonas de trofozoítos en enquistamiento (E). T: trofozoítos en crecimiento.



Los resultados en su conjunto sugieren que la localización de ADI en el núcleo durante las últimas etapas de enquistamiento se encuentra relacionada a su función como PAD, actuando particularmente sobre histonas.

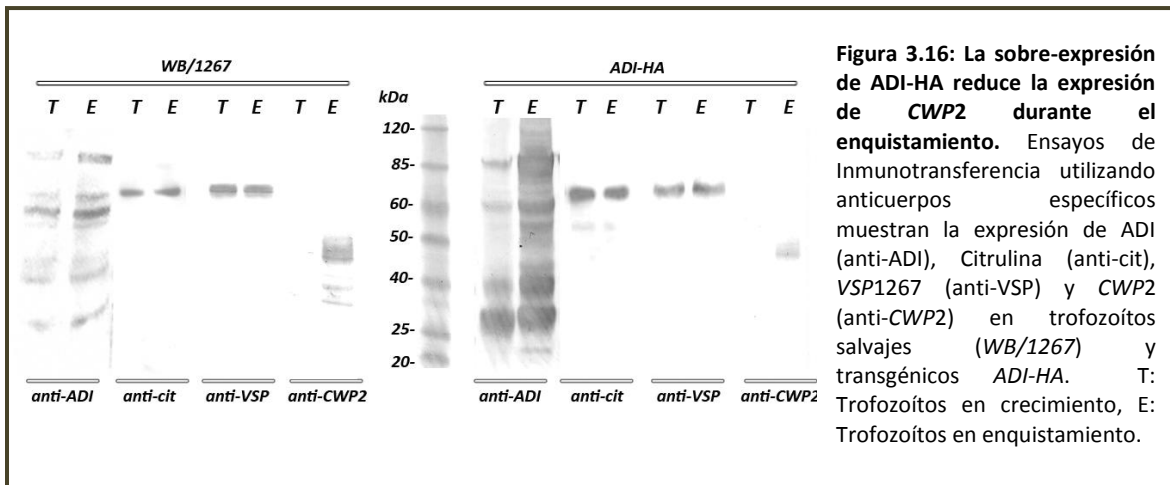
### **3.5. La translocación de ADI al núcleo regula negativamente el proceso de enquistamiento**

Como se describió previamente, el enquistamiento en *Giardia lamblia* es un proceso que implica complejos cambios moleculares y morfológicos de los trofozoítos en respuesta a la deprivación de colesterol en las últimas regiones del intestino delgado (Adam, 2001); evento que gatilla la síntesis de *CWPs*, que transportadas hacia la membrana plasmática en *ESVs*, se liberan formando la pared del quiste (Gillin et al., 1996). Durante el enquistamiento, ADI transloca a los núcleos, mostrando las células que sobre-expresan altos niveles de ADI-HA con ADI en núcleo pocas *ESVs*, como pudo visualizarse por IFI (**Figura 3.3**). A fin de complementar estos resultados, se evaluó si durante el enquistamiento existen cambios en la expresión del gen de *adi* por medio de la realización de ensayos *Slot blot* y *RT-PCR* a 0h, 6h, 24h y 48h de enquistamiento, en células salvajes y que sobre-expresan ADI-HA. Análisis de la expresión de *adi* utilizando el gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) como referencia, no mostraron diferencias en el nivel de ARNm a lo largo del proceso de enquistamiento ni en trofozoítos salvajes ni en los que sobre-expresan ADI-HA (**Figura 3.15A**), aún cuando la expresión de *adi* fue casi 3 veces mayor en trofozoítos transgénicos respecto a los salvajes (**Figura 3.15B**).

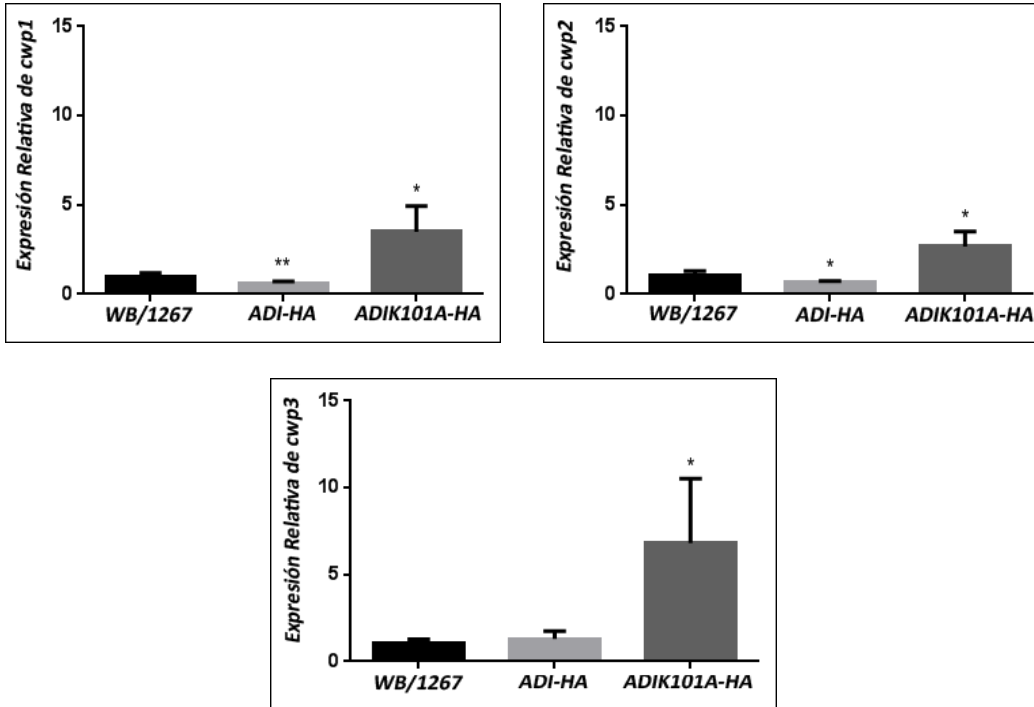


Al trasladar los estudios a nivel de proteínas, se observó por inmunotransferencia (Figura 3.16) que la expresión de ADI y citrulina en células transgénicas ADI-HA fue mayor a la observada en las células salvajes. Además la expresión de ADI en trofozoítos ADI-HA, aumentó durante el enquistamiento, aunque no se observaron cambios en la citrulinación de las VSPs durante este proceso, lo que sugiere que posiblemente ADI se encuentre desempeñando otra función durante la diferenciación del parásito. El incremento de expresión de ADI a nivel de proteína, y la ausencia de cambios a nivel del ARNm, permite especular que el incremento de expresión de la enzima durante el enquistamiento se asocia a una disminución en la degradación de la proteína, y no a una mayor síntesis.

Se observó además una reducción en la expresión de CWP2 en los trofozoítos que sobre-expresaban ADI-HA respecto a los salvajes, corroborando estos resultados lo observado por IFI, y demostrando que ADI participa del proceso de enquistamiento, regulando la expresión génica de proteínas específicas de dicho proceso.

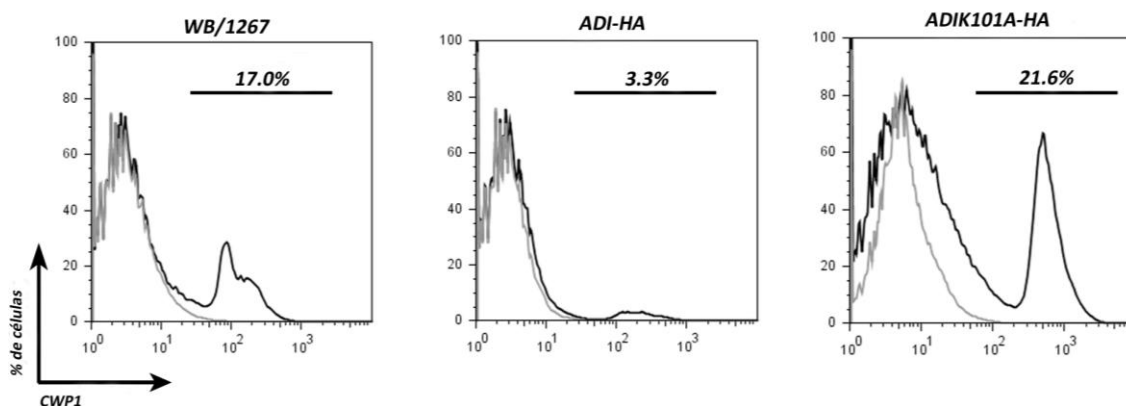


A fin de determinar si ADI regula negativamente el proceso de enquistamiento, se realizaron ensayos de *PCR* en tiempo real (**Figura 3.17**) para los genes de *cwps* a partir del ARN extraído de trofozoitos salvajes que sobre-expresan ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA a 36h de enquistamiento. Los resultados mostraron una disminución ( $p < 0.05$ ) en los niveles de ARNm de los genes de *cwp1* y *cwp2* endógenos, en trofozoitos ADI-HA respecto a los expresados por trofozoitos salvajes, sin registrar cambios significativos en los genes *cwp3*. Las células ADI<sub>K101A</sub>-HA, por el contrario, mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión de *cwp1*, *cwp2*, *cwp3* en comparación con los de los trofozoitos salvajes, durante el enquistamiento. Estos resultados sugieren un rol de ADI en la regulación de los genes de *cwps* durante el proceso de diferenciación a quiste.



**Figura 3.17:** Efecto de ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA en la expresión de genes de enquistamiento *cwp1*, *cwp2* y *cwp3*. Comparación en la expresión de *cwp1*, *cwp2* y *cwp3* por PCR en tiempo real en trofozoítos salvajes (WB/1267), ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA, a las 36h de enquistamiento. El grado de expresión que se muestra en las barras representa el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto al valor de referencia (células salvajes) con un  $p < 0.05$ .

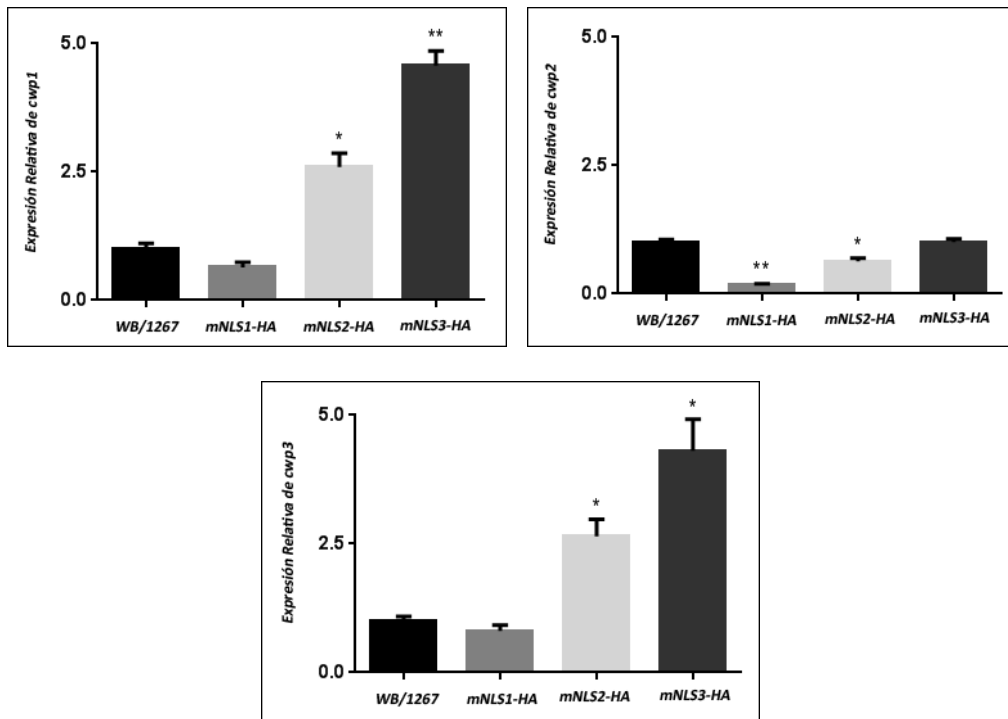
Para complementar estos estudios, se realizaron además ensayos de citometría de flujo (**Figura 3.18**), utilizando un Acm anti-CWP1, cuantificando la cantidad de quistes producidos dentro de la población total de trofozoítos salvajes, que sobre-expresan ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA. A fines de considerar sólo la población correspondiente a la de quistes, que expresan CWP en su superficie, las células no fueron permeabilizadas. Los resultados mostraron una marcada reducción en el porcentaje de quistes producidos en células que sobre-expresan ADI-HA (3.3%) respecto a las células salvajes (17%). En células ADI<sub>K101A</sub>-HA, el porcentaje de quistes formados aumentó (21.6%) en comparación con los trofozoítos salvajes (17%).



**Figura 3.18:** Efecto de ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA en la producción de quistes en *Giardia lamblia*. Citometría de Flujo en células en enquistamiento no permeabilizadas mostrando el porcentaje de quistes en trofozoítos salvajes (WB/1267), que sobre-expresan ADI-HA y que sobre-expresan ADI<sub>K101A</sub>-HA utilizando un anticuerpo anti-CWP1 marcado con FITC.

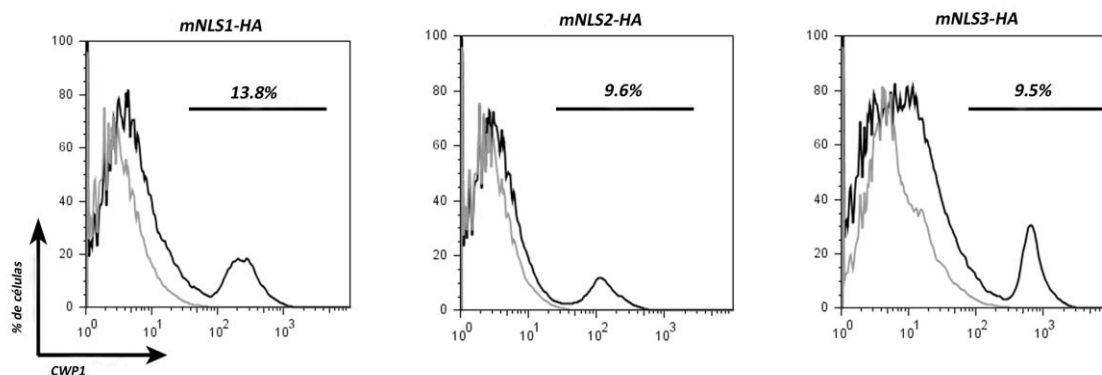
Los resultados obtenidos indican que la SUMOilación y la translocación de ADI a los núcleos mediada por esta modificación post-traduccional, se encuentran directamente relacionada a la regulación negativa de las proteínas involucradas en el proceso de enquistamiento en *Giardia lamblia*.

Para analizar si la reducción en la localización nuclear que involucra a las señales de localización nuclear se relaciona a la expresión de los genes *cwps*, se realizó además PCR en tiempo real utilizando el ARNm de células transgénicas mutantes en las NLSs durante el enquistamiento. De esta manera, se observó que mutaciones en la primera porción de la NLS bipartita (mNLS1) mostraron disminución significativa en la expresión de los genes *cwp2* respecto a los trofozoítos salvajes, sin registrar diferencias significativas en la expresión de *cwp1* y *cwp3*. A diferencia de ello, las mutaciones mNLS2 y mNLS3 incrementaron significativamente la expresión de los genes *cwp1* y *cwp3*, y mostraron una reducción en la expresión de *cwp2* (Figura 3.19).



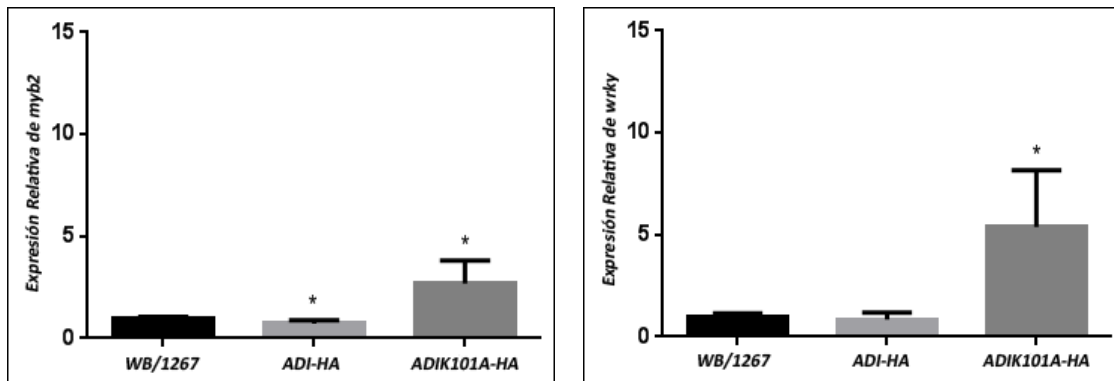
**Figura 3.19: Efecto de mNLS1, mNLS2 y mNLS3 en la expresión de genes de enquistamiento *cwp1*, *cwp2*, *cwp3*.** Comparación en la expresión de *cwp1*, *cwp2* y *cwp3* por PCR en tiempo real en trofozoítos salvajes (*WB/1267*), *mNLS1-HA*, *mNLS2-HA* y *mNLS3-HA*, a las 36h de enquistamiento. El grado de expresión que se muestra en las barras representa el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto al valor de referencia (células salvajes) con un  $p < 0.05$ .

Quando se analizó el porcentaje de quistes producidos por citometría de flujo (**Figura 3.20**), se observó que todas las mutantes mostraron porcentajes intermedios entre las células *ADI-HA* y *ADI<sub>K101A</sub>-HA*, pudiendo explicarse la parcial regulación negativa de los genes *cwps* en estas células mutantes a que en todos los trofozoítos mutantes para las *NLSs*, la *SUMO*ilación de la enzima tiene lugar y que la enzima en los núcleos es funcional. Sin embargo, serán necesarios análisis funcionales más profundos para dilucidar el rol de estas mutantes en la regulación del proceso de enquistamiento, y serán tópicos de futuros trabajos en el laboratorio.



**Figura 3.20: Efecto de mNLS1, mNLS2 y mNLS3 en la producción de quistes en *Giardia lamblia*.** Citometría de Flujo en células en enquistamiento no permeabilizadas mostrando el porcentaje de quistes en trofozoítos mNLS1-HA, mNLS2-HA y mNLS3-HA utilizando un anticuerpo anti-CWP1 marcado con FITC.

Considerando que los factores de transcripción *Myb2* y *WRKY* pueden regular la expresión de genes relacionados al enquistamiento, se analizó si la sobre-expresión de ADI (ADI-HA) y la ausencia de SUMOilación (ADI<sub>K101A</sub>-HA) influye en la expresión génica de estos factores realizando ensayos de PCR en tiempo real en trofozoítos salvajes (WB/1267), ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA (Figura 3.21). Los resultados mostraron una reducción significativa en la expresión de *myb2* en células ADI-HA con respecto a las salvajes y un aumento de la expresión en trofozoítos ADI<sub>K101A</sub>-HA (panel izquierdo), poniendo de manifiesto, además, un claro incremento en la expresión del factor de transcripción *wrky* en trofozoítos ADI<sub>K101A</sub>-HA (panel derecho), en tanto la expresión en ADI-HA no mostró cambios con respecto a los trofozoítos salvajes. Los resultados permiten especular el rol de ADI en la regulación del proceso de enquistamiento, sea directamente sobre la expresión de los genes *cwp1-3* o indirectamente a través de la regulación de *myb2*. No obstante, estudios más profundos y extendidos a otros factores de transcripción serán realizados a futuro, con el objetivo de dilucidar la cascada de señales que regulan el proceso de enquistamiento en *Giardia lamblia*.



**Figura 3.21:** Efecto de ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA en la expresión de los factores de transcripción *myb2* y *wrky*. Comparación en la expresión de *myb-2* y *wrky* por PCR en tiempo real en trofozoitos salvajes (WB/1267), ADI-HA y ADI<sub>K101A</sub>-HA, a las 36h de enquistamiento. El grado de expresión que se muestra en las barras representa el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto al valor de referencia (células salvajes) con un  $p < 0.05$ .

## Conclusiones Parciales:

En este Capítulo se profundiza el rol de modificaciones epigenéticas como SUMOilación y citrulinación en el proceso de enquistamiento de *Giardia*. Por mutaciones sitio-dirigidas en el sitio de SUMOilación de ADI se observó una disminución en la translocación de la proteína a los núcleos, aunque durante el proceso ADI transloca a éstos por sus señales de localización nuclear (NLSs). Dentro del núcleo, la enzima modifica histonas por citrulinación, encontrándose esta modificación posiblemente involucrada en la regulación negativa de la expresión de *cwp1*, *cwp2* y *myb2* y la formación del quiste maduro. Nuestros resultados sugieren que ADI participa del enquistamiento en *Giardia lamblia*, siendo la SUMOilación y citrulinación modificaciones post-traduccionales claves en el proceso de diferenciación a quiste.



***Capítulo 4:***  
***Discusión General***

## Capítulo 4: Discusión General

**A**l igual que muchos otros organismos parásitos, *Giardia lamblia* ha desarrollado mecanismos de adaptación para sobrevivir a los cambios ambientales que enfrenta durante su ciclo de vida resultando clave en estos procesos, el rol desempeñado por ADI. ADI es la enzima responsable de deaminar argininas a citrulina en *Giardia*, con la capacidad única de actuar sobre L-Arg (compartiendo esta característica con las células procariotas) y sobre la arginina que compone péptidos o proteínas (de manera similar a las PADs de eucariotas). *Giardia*, considerada una célula eucariota tempranamente divergente en la historia evolutiva, posee una maquinaria celular mínima y un ciclo de vida que obliga al parásito a adaptarse continuamente. Debido a estas características es posible que alterne la función de sus proteínas según los requerimientos externos, resultando sus funciones importantes durante la adaptación, diferenciación y supervivencia del parásito (Vossenaar et al., 2003b; Galkin et al., 2004).

Las proteínas son a menudo modificadas covalentemente, representando las modificaciones post-traduccionales mecanismos para regular su actividad, localización o estabilidad (Itahana et al., 2006; Hickey et al., 2012). Como se demostró en este *Trabajo de Tesis*, ADI es una enzima SUMOilada. La modificación de proteínas por Ubiquitina y modificadores relacionados a ésta, constituye uno de los mecanismos más complejos e intensamente estudiados de regulación post-transcripcional. Conservados en el linaje eucariota, y relacionados a las proteínas transportadoras de azufre en procariotas (que emplean similares mecanismos de conjugación), estos procesos parecen tener un origen común siendo los parásitos, y *Giardia* en particular, un interesante modelo para su comprensión (Ponder and Bogyo, 2007; Ponder et al., 2011).

Los modificadores relacionados a Ubiquitina constituyen una superfamilia de proteínas con similitud estructural a Ubiquitina, capaces de formar como ésta enlaces isopeptídicos entre sus grupos carboxilo terminal y residuos K de sus proteínas substrato (Hay, 2001). Dentro de este gran grupo de modificadores, la proteína SUMO ha

despertado gran interés durante la última década, surgiendo la *SUMO*ilación como una novedosa modificación post-traducciona involucrada en una gran diversidad de procesos celulares. Éstos incluyen: regulación transcripcional, respuesta al daño de ADN, control epigenético, localización y estabilidad de proteínas, respuesta al estrés, progresión del ciclo celular y transporte de proteínas al núcleo (Mahajan et al., 1997; Matunis and Pickart, 2005). Aunque descripta ampliamente en casi todos los eucariotas superiores e incluso en parásitos como *Trypanosoma*, *Toxoplasma* y *Plasmodium*, este trabajo presenta por primera vez evidencia experimental de la presencia de *SUMO*ilación en *Giardia lamblia*.

Como se demostró en el Capítulo 2, los componentes bioquímicos que participan en la *SUMO*ilación y de*SUMO*ilación se identificaron en *Giardia*, infiriendo que esta modificación post-traducciona es un proceso regulatorio en este parásito, como en otros eucariotas. En contraste a lo que se observa en *Arabidopsis thaliana* (Kurepa et al., 2003) y en mamíferos (Bossis and Melchior, 2006; Garaude et al., 2008), donde varios miembros de la familia *SUMO* han sido descritos, y de manera similar a lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* (Rosonina et al., 2010), invertebrados (Muller et al., 2001) y otros parásitos como *Plasmodium falciparum* (Issar et al., 2008), *Toxoplasma gondii* (Braun et al., 2009), *Trypanosoma brucei* (Liao et al., 2010; Klein et al., 2013) y *Trypanosoma cruzi* (Bayona et al., 2011), *Giardia lamblia* contiene un único gen que codifica para *SUMO*. Esta proteína es conservada en el parásito, según se demostró por el alineamiento de secuencias y el alineamiento estructural. Considerada *Giardia* una célula eucariota de origen temprano, la presencia de *SUMO* en este organismo sugiere que el proceso surgió tempranamente en la evolución, y que su función es de carácter esencial en la célula.

La *SUMO*ilación de proteínas es regulada por una compleja cascada enzimática, siendo el gen que codifica para la proteasa de *SUMO* (SP: GL50803\_16438) el único representante de la vía de *SUMO*ilación/de*SUMO*ilación presente en el genoma del parásito. Sin embargo, se han identificado por análisis *in silico* proteínas candidatas involucradas en la activación y conjugación de *SUMO* a sus sustratos.

Las proteasas de *SUMO* desempeñan dos roles importantes en la vía de *SUMO*ilación: participan, por un lado, del procesamiento de los precursores de *SUMO* exponiendo el motivo GG antes de la conjugación y, por otro, desconjugan *SUMO* de la proteína blanco (Alegre and Reverter, 2011; Ponder et al., 2011). Aunque existen proteasas especializadas en una u otra función como la proteasa *Ulp2* (del inglés, *UBL-specific protease 2*) de levaduras que no interviene en el clivaje del precursor (Johnson, 2004), la mayoría de las proteasas de *SUMO* descritas son responsables de ambos procesos. Análisis *in silico*, han revelado que SP en *Giardia* es una cisteína proteasa caracterizada por la presencia de una triada catalítica conservada (H-A-C) para desempeñar su rol como hidrolasa e isopeptidasa, durante los procesos de maduración y desconjugación, respectivamente (Kim et al., 2000). La sobre-expresión de SP-HA y los ensayos de IFI, han revelado que la proteína presenta una localización subcelular variable en el parásito localizando en el citoplasma, cerca de la membrana plasmática, los flagelos y núcleos. Estudios en levaduras y mamíferos sugieren que la localización subcelular de las proteasas de *SUMO* contribuye a la selección del sustrato *in vivo* (Itahana et al., 2006). En levaduras, la especificidad de sustratos de las proteasas *Ulp1* y *Ulp2* es altamente influenciada por la localización celular. *Ulp2* localiza en el nucleoplasma y *Ulp1* se encuentra principalmente en la superficie interna del NPC. Sin embargo, una fracción de *Ulp1* es exportada al citoplasma en una manera ciclo-específica para participar en la de*SUMO*ilación de proteínas (Itahana et al., 2006). En mamíferos, la mayoría de las proteasas de *SUMO* se concentran en el núcleo (Johnson, 2004; Itahana et al., 2006). No obstante, algunas, como la *SEN6*, presentan localización tanto nuclear como citoplasmática (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Un interesante aporte al respecto fue provisto por el grupo de *Itahana*, quienes demostraron un cambio de localización de la proteasa *SEN2* humana entre el núcleo y el citoplasma donde señales de importación y exportación nuclear se encuentran involucradas (Itahana et al., 2006). Dado la localización de conjugados a *SUMO* tanto en compartimentos nucleares como citoplasmáticos, es posible que exista una localización *SUMO*-dependiente para la proteasa, pudiendo la maduración de las formas de *SUMO* libre y la de*SUMO*ilación de los sustratos estar

regulada por procesos celulares, como la progresión del ciclo celular. Considerando que un requisito para la *SUMO*ilación en un compartimento celular específico es la disponibilidad de las enzimas requeridas para la conjugación y desconjugación (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007), y que la vía de *SUMO*ilación regula la función de una variedad de sustratos, la existencia de una única isoforma de la proteasa de *SUMO* en *Giardia*, podría asociarse a su participación en ambos procesos: el de maduración y desconjugación. Ésta sería la causa de su localización tanto en el núcleo como en el citoplasma, como se refleja en los ensayos de IFI. Para regular el cambio de localización de la SP, *Giardia* debe ser capaz de de*SUMO*ilar selectivamente los sustratos en el núcleo y/o citoplasma, teniendo gran flexibilidad en la regulación de su actividad. Futuros estudios se requerirán, para determinar la especificidad de la SP en *Giardia*, la relación con la localización subcelular de la proteína, y su funcionalidad. Aunque la maquinaria de conjugación es importante en la cascada de *SUMO*ilación, el rol esencial de las enzimas desconjugantes en múltiples vías biológicas y la identificación de inhibidores de estas enzimas, indican que pueden presentar potencial importancia como blanco de drogas contra parásitos.

Proteínas hipotéticas correspondientes a la subunidad SAE2 (GL50803\_6288) de la enzima *SUMO* E1 de activación, y un gen que codificaría para la *SUMO* E2 de conjugación (GL50803\_24068), fueron identificadas en base a la comparación de secuencias de proteínas ortólogas de otros organismos. Ha sido descrito que aunque las enzimas E1 y E2 involucradas en la ubiquitinación se encuentran estrechamente relacionadas a las que participan de la cascada de *SUMO*ilación (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007), *SUMO* es conjugado a las proteínas blanco por una vía análoga, pero diferente a la del sistema de conjugación a Ubiquitina (Dorval and Fraser, 2007). El sistema de ubiquitinación ha sido descrito en *Giardia* (Gallego et al., 2007; Nino et al., 2013), mostrando las proteínas predichas para la vía de *SUMO*ilación alta similitud con aquellas, a pesar de la conservación de dominios característicos de las que participan del proceso de conjugación a *SUMO*. Surge, en consecuencia, la necesidad de estudios bioinformáticos y funcionales más profundos, para caracterizar estas proteínas como parte de la cascada de

*SUMO*ilación. La ausencia de enzimas *SUMO* E3 ligasas y la falta de identificación de la subunidad *SAE1*, podrían sugerir la presencia de un mecanismo de *SUMO*ilación simplificado en comparación al presente en eucariotas superiores. Acorde con la literatura, aunque la interacción con *SUMO* durante el proceso de activación es mediada exclusivamente por *SAE2*, todas las enzimas *SUMO* E1 caracterizadas hasta el momento son heterodímeros (Johnson, 2004), sin encontrarse funcionalidad de la subunidad *SAE2* en ausencia de la *SAE1*. No obstante, dado que el genoma de *Giardia* codifica para formas simples de muchos procesos celulares y posee un limitado repertorio metabólico que hace que algunas proteínas sean redundantes con otras, es posible que el parásito haya adquirido un sistema de *SUMO*ilación basal con características inusuales en comparación a otros organismos (quizás con los componentes mínimos indispensables para tal fin). Otra posibilidad es que cuente con un mecanismo simplificado de *SUMO*ilación, acorde a su condición de organismo basal (Ankarklev et al., 2010). Aunque se han identificado parcialmente a algunos de los componentes de la vía de *SUMO*ilación en *Giardia lamblia*, la comprensión de este proceso se encuentra en las etapas iniciales y los estudios que se llevarán a cabo estarán relacionados a estudiar el mecanismo de conjugación a *SUMO*, los posibles sustratos y los procesos en los cuales esta modificación post-traducciona se encuentra involucrada.

Desde el descubrimiento de la *SUMO*ilación como modificación post-traducciona de proteínas, mucho se ha avanzado en el sistema enzimático que media la conjugación y desconjugación de esta proteína en células eucariotas. No obstante, la identificación de sustratos *SUMO*ilados no resulta un procedimiento técnicamente sencillo y requiere de ensayos e instrumentación sensible, debido a que: (i) muchas proteínas conjugadas a *SUMO* se encuentran presentes por debajo de los límites de detección (Wang et al., 2008), (ii) para la mayoría de las proteínas conjugadas, sólo una pequeña fracción del sustrato (menos del 10%) es *SUMO*ilado en un momento determinado, (iii) y existe una fuerte actividad de las proteasas de *SUMO* en lisados celulares requiriendo la presencia de inhibidores específicos (Johnson, 2004; Issar et al., 2008). Ensayos de IFI y de inmunotransferencia revelaron en *Giardia*, la posible presencia de proteínas *SUMO*iladas,

de localización subcelular tanto nuclear como citoplasmática. Aunque la *SUMO*ilación es conocida por dirigir proteínas hacia el núcleo y la mayoría de enzimas necesarias para el procesamiento de *SUMO* se encuentran enriquecidas en éste (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007), la *SUMO*ilación no sólo se restringe a compartimentos nucleares, y varios estudios en otros organismos han puesto en evidencia la *SUMO*ilación de proteínas en el citoplasma, membrana plasmática, mitocondria y RE, dependiendo del proceso que se regule (Colby et al., 2006; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Scheschonka et al., 2007). Se conoce, además, que el patrón de conjugados a *SUMO* es dinámico en todos los organismos, y se ha observado que puede cambiar durante el ciclo celular y en respuesta a varios estímulos (Johnson, 2004). No obstante, resta dilucidar cómo esta modificación post-traducciona afecta la función de las proteínas en la mayoría de células eucariotas (Dohmen, 2004) y cuál es su rol en parásitos, donde el panorama resulta incipiente todavía. La presencia de posibles conjugados a *SUMO* en *Giardia* y de las probables enzimas involucradas en la vía de *SUMO*ilación tanto en núcleo como citoplasma, permiten especular el amplio rol funcional de esta modificación post-traducciona en el ciclo de vida del parásito.

Desde su descubrimiento, *SUMO* ha sido asociada a diversas proteínas que incluyen el receptor de andrógenos, I $\kappa$ B $\alpha$ , c-jun, HDACs, p53 y otras proteínas que participan en la transcripción, reparación de ADN, transporte nuclear, transducción de señales y ciclo celular (Seeler and Dejean, 2003; Johnson, 2004). En parásitos, la *SUMO*ilación ha sido descrita en *Toxoplasma gondii* (Braun et al., 2009), *Plasmodium falciparum* (Issar et al., 2008), *Trypanosoma cruzi*, (Bayona et al., 2011), *Trypanosoma brucei* (Klein et al., 2013) y *Schistosoma mansoni* (Pereira et al., 2012). En *Toxoplasma gondii*, proteínas modificadas por *SUMO* incluyen factores relacionados a la cromatina, factores de transcripción, proteínas que participan de la estabilidad del genoma y reparación de ADN, como así también: proteínas relacionadas al estrés, involucradas en el procesamiento de ARN y traducción, y una variedad de enzimas metabólicas (Braun et al., 2009). Aún cuando la mayoría de los estudios resultan descriptivos, se ha demostrado recientemente que la proteína paraflagelar (*PFR1* del inglés, *Paraflagellar Rod Protein*) de

*Trypanosoma cruzi* es SUMOilada, pudiendo desempeñar esta modificación un rol importante en la diferenciación del parásito (Annoura et al., 2012). Aunque la lista de nuevos sustratos se expande en otros sistemas, y a pesar de los intentos de caracterización de otros sustratos de SUMOilación en *Giardia*, por el momento sólo pudimos identificar a la enzima ADI como tal, aunque se especula que la SUMOilación puede desempeñar importantes roles en el crecimiento y diferenciación del parásito. En este *Trabajo de Tesis* se ha demostrado que ADI se SUMOila en la K de posición 101, situada dentro de un motivo consenso de SUMOilación, y expuesta, acorde a la estructura secundaria predicha para la proteína, como sucede en la mayoría de sustratos de SUMOilación, para ser reconocida por la SUMO E2. El reconocimiento del motivo consenso por esta enzima sólo es posible si éste es parte de un bucle extendido, como sucede en RanGAP1 o si éste se encuentra presente en un área desestructurada, como ocurre en el factor de transcripción ETS1. SUMO E2 no reconoce motivos en estructuras helicoidales estables (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

Muchas proteínas SUMOiladas son direccionadas hacia el núcleo y la SUMOilación es conocida por regular el transporte nuclear, aún cuando los mecanismos por los cuales la modificación modula este importante proceso biológico no han sido claramente definidos. Acorde con la literatura, la mayoría de sustratos de SUMO que localizan en núcleo, incluyendo Sp100, HDAC4, Mdm2 y Smad4, requieren de NLSs para la SUMOilación, y aunque el motivo  $\psi$ KXE es suficiente para la SUMOilación *in vitro*, una NLS es a menudo requerida para la SUMOilación *in vivo* (Seeler and Dejean, 2003). Según se supone, la conjugación a SUMO facilita la localización nuclear a través de la importación nuclear, marcando o exponiendo las NLSs de la proteína para su reconocimiento por importinas. Varios informes sugieren, además, que la SUMOilación también regula la exportación del núcleo, enmascarando las NESs (del inglés, Nuclear Exportation Signals) adyacentes al sitio de SUMOilación, aunque la evidencia directa que soporta esta hipótesis se presenta sólo para proteínas virales (Du et al., 2008).

Durante el crecimiento de *Giardia*, ADI se encuentra exclusivamente en el citoplasma. Como se demostró en el Capítulo 3, durante el enquistamiento, la enzima es



translocada a los núcleos dependiendo esta nueva localización de la *SUMO*ilación y de la presencia de *NLS*s en la secuencia de la proteína. Las enzimas descritas para la vía de *SUMO*ilación en *Giardia lamblia* se encuentran presentes tanto en el citoplasma como rodeando a los núcleos donde la *SUMO*ilación de ADI tiene lugar, como se corroboró por los ensayos de IFI que muestran colocalización entre ADI y *SUMO*. La *SUMO*ilación de ADI, parece hallarse involucrada además en la estabilización de la proteína, siendo ésta otra de las funciones en las que la conjugación a *SUMO* se halla involucrada. Ensayos de inmunotransferencia en células mutantes (ADI<sub>K101A</sub>-HA) muestran un enriquecimiento de bandas de bajo peso molecular correspondientes a probables productos de degradación de la enzima ante la ausencia de *SUMO*ilación.

Respecto al rol de la *SUMO*ilación de ADI durante la diferenciación a quiste, uno puede especular que esta modificación post-traducciona es utilizada por el parásito para regular el enquistamiento, en respuesta a cambios en el ambiente, representando éste un mecanismo clave en la regulación génica. Como se demostró por IFI la eficiencia de importación al núcleo incrementa cuando la enzima se encuentra *SUMO*ilada, aunque la misma sufre un cambio de localización incluso en ausencia de *SUMO*ilación. Según lo informado, aún cuando la conjugación a *SUMO* no es requerida para el ingreso de la mayoría de proteínas blanco al núcleo, contribuye a la eficiencia en el transporte nuclear, y regula la localización nuclear bajo estímulos específicos (Colby et al., 2006; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Scheschonka et al., 2007).

Las *NLS*s representan, en eucariotas, la vía clásica y mejor comprendida para el transporte de proteínas al núcleo, en el caso de aquellas que superan los 50 kDa. Estas señales son secuencias de aminoácidos básicos, reconocidas por una familia de proteínas denominadas importinas o carioperinas, que transportan proteínas a través de la envoltura nuclear. ADI muestra en su secuencia dos *NLS*s conservadas: una monopartita (PQRRREQ) y otra bipartita (RRGIVMGQFQAPQRRRE), ambas involucradas en la translocación de la enzima al núcleo. Hasta el momento no se han descrito evidencias de la participación de las *NLS*s en la translocación de proteínas hacia el núcleo en parásitos, resultando su comprensión de gran utilidad para entender la conservación de estos

motivos a lo largo de la evolución. En *GDB* solo ha sido identificada la subunidad 3 de la importina  $\beta$  (GL50803\_15106), la cual presenta un dominio conservado *HEAT* involucrado en el transporte intracelular y un motivo con alta probabilidad de unión a *SUMO*. Aunque resulte difícil de predecir, es posible que la *SUMO*ilación conduzca a un cambio conformacional en ADI que lleve a exponer sus *NLSs* o el sitio donde se une la importina  $\beta$ , aumentando así la eficiencia de translocación al núcleo. Acorde con la literatura, la *SUMO*ilación altera la superficie de la proteína afectando su interacción con otras macromoléculas, pudiendo de esta manera interferir o promover interacciones proteína-proteína, enmascarando sitios de unión, adicionando otros que estén presentes en *SUMO* o promoviendo cambios conformacionales que revelen nuevas superficies de la proteína diana (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Los estudios relacionados al análisis de la importación nuclear de ADI por importinas son materia de futuros experimentos en el laboratorio.

En el transcurso del enquistamiento deben existir señales que regulen negativamente la expresión de los genes de *cwps*, haciendo que el ciclo de vida del parásito se complete. Se ha descrito que modificaciones post-traduccionales de histonas, como la fosforilación, acetilación, metilación y deiminación, regulan un amplio rango de eventos nucleares a nivel de ADN y cromatina, incluyendo la transcripción. Se ha sugerido recientemente que *SUMO* tiene un rol de represor transcripcional, principalmente por la promoción de interacciones no covalentes con co-represores (Johnson, 2004; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007), y gran cantidad de enzimas que modifican histonas, incluyendo deacetilasas, metiltransferasas y demetilasas, son propuestas como reguladores transcripcionales que interactúan no covalentemente con *SUMO*. Numerosas modificaciones de histonas alteran el transcriptoma requerido para dirigir la diferenciación en *Toxoplasma gondii* (Saksouk et al., 2005; Sautel et al., 2007; Bougdour et al., 2010). No obstante, aunque los mecanismos epigenéticos parecen controlar la etapa de diferenciación a quiste en *Giardia*, poco se conoce sobre cómo las modificaciones epigenéticas de histonas operan en el parásito.

El aumento en el número de quistes producidos por las mutantes de ADI<sub>K101</sub>-HA, en las que la translocación al núcleo disminuye, respecto a aquellas transfectadas con ADI-HA, sugieren que ADI se encuentra involucrada en la regulación negativa del enquistamiento. En células eucariotas, la enzima PAD4 ha sido identificada como PAD específica para la histona H3, regulando la metilación de arginina por conversión de metilarginina en citrulina (Cuthbert et al., 2004), un proceso generalmente asociado al silenciamiento de genes. En *Giardia*, se ha demostrado que la inhibición de la histona-deacetilasa incrementa la acetilación de histonas e induce cambios transcripcionales (Sonda et al., 2010) y, aunque la metilación de lisinas en la histona H3 ha sido sugerida, la metilación de argininas no ha sido estudiada aún, resultando complejo especular si la citrulinación antagoniza el efecto de metilación de argininas, como se ha observado en otras células eucariotas. Dado que la modificación de histonas por acetilación fue demostrada en otros tipos celulares, nosotros proponemos que ADI modifica histonas por citrulinación, encontrándose esta modificación estrechamente relacionada con la regulación negativa del proceso de enquistamiento. La hipótesis se basa en el hecho que la translocación de ADI-HA a los núcleos reduce la formación de quistes producidos y silencia genes de la familia de las *cwps*, requeridos para que el enquistamiento se complete, regulando además la expresión de factores de transcripción como *myb2*. Este efecto tiene lugar en las últimas etapas del enquistamiento en células salvajes y tempranamente en células transgénicas que sobre-expresan ADI-HA, donde la translocación nuclear es potenciada, y la reducción en la expresión de *CWPs* y formación de quistes es claramente evidenciada.

Durante el enquistamiento, se ha demostrado por ensayos de inmunotransferencia empleando un Ac que reconoce citrulinas modificadas, que ADI es capaz de deiminar argininas en histonas, aunque la identificación de los residuos citrulinados no haya podido establecerse. Aunque la citrulinación como modificación post-traducciona desempeña un rol importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos, la identificación de residuos arginina citrulinados no resulta un procedimiento sencillo. Un método ampliamente utilizado para visualizar proteínas citrulinadas se basa en la modificación química del

grupo ureido por diacetil monoxima y antipirina, siendo reconocida la citrulina modificada químicamente por un Ac policlonal anti-citrulina modificada. Aunque ha sido frecuentemente utilizada para visualizar proteínas citrulinadas por inmunohistoquímica o inmunotransferencia, esta técnica no permite identificar la localización de la/s argininas convertida/s, (Tuttunen et al., 2010) siendo clave al respecto el uso de la técnica de espectrometría de masas. La diferencia de masa entre los residuos arginina y citrulina, no obstante, es de tan solo 1 Da, existiendo otras modificaciones post-traduccionales capaces además de generar la misma diferencia, como la deiminación de Asparagina (N) a Ácido aspártico (D) y de Glutamina (Q) a Ácido glutámico (E), o incluso la captación de un átomo de hidrógeno por el péptido. Además, la diferencia de 1 Da puede resultar dificultosa en péptidos altamente cargados (De Ceuleneer et al., 2011), razones todas por las cuales tampoco resultó posible identificar tales residuos por este método en *Giardia*.

Aunque se ha observado que la carencia de colesterol en el medio dispara el proceso de enquistamiento *in vitro*, se desconoce cómo esta deprivación dispara la regulación génica específica. En la regulación positiva del enquistamiento varios factores de transcripción, como *Myb2* (Huang et al., 2008; Sun et al., 2002), *GARP* (Sun et al., 2006), *WRKY* (Pan et al., 2009), *E2F1* (Su et al., 2011), dominios de interacción ricos en AT (*ARID*) (Wang et al., 2007) y, recientemente las proteínas *Pax* (1 and 2) (Chuang et al., 2012) y *Topo II* (Lin et al., 2013), han sido identificados, participando en la regulación transcripcional de los genes involucrados en el enquistamiento. Muchos factores de transcripción en eucariotas presentan mecanismos de autorregulación, mostrando *myb2*, *pax1*, *e2f1* o *wrky* autorregulación positiva o negativa para mantener sus niveles de proteína en *Giardia lamblia*, hecho que se asocia con la presencia de sitios de unión en sus propias regiones promotoras. El incremento coordinado en la expresión de los genes que codifican fundamentalmente los componentes de la pared del quiste, sugieren la importancia de una regulación génica y/o a nivel post-transcripcional. No obstante, se desconocen con precisión los mecanismos moleculares que regulan la biogénesis de la pared del quiste (Su et al., 2011), y el orden secuencial de activación de genes o la forma en que los factores de transcripción operan *in vivo*.

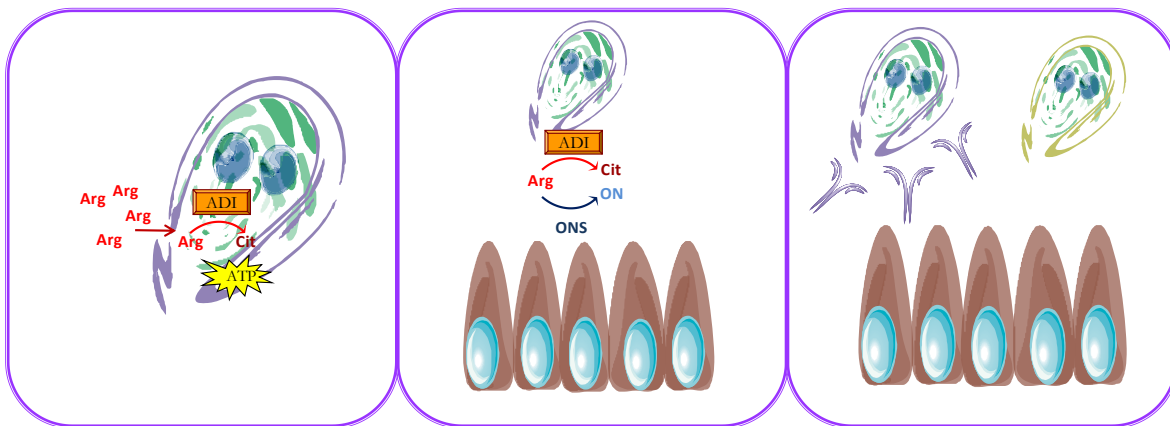
Nuestros resultados indican que la citrulinación de histonas juega un rol clave en la regulación del proceso de diferenciación de *Giardia* controlando los niveles de transcripción génica, posiblemente alterando la accesibilidad de la región promotora de los genes de enquistamiento y de factores cis-activadores implicados en la regulación de genes específicos de enquistamiento, como se ha postulado para la acetilación. Considerando que la relocalización de ADI desde el citoplasma a los núcleos depende de la diferenciación del parásito, es posible que una cascada de moléculas se encuentre involucrada en el mecanismo. Independientemente de ello, los mecanismos de regulación génica tienen orígenes tempranos y operan similarmente en todos los organismos (Sullivan et al., 2006)

Finalmente, es interesante el estudio de los mecanismos de adaptación, como variación antigénica y enquistamiento en *Giardia*, desde el punto de vista de la biología del parásito, y resulta importante si se considera su utilidad en el desarrollo de ensayos de diagnóstico basados en el diseño de agentes quimioterapéuticos y de nuevos reactivos. Debido a que ADI no se encuentra presente en otros organismos eucariotas, y que es esencial para la supervivencia y diferenciación de *Giardia lamblia*, la enzima surge como posible agente terapéutico o de utilidad en el desarrollo de competidores sintéticos para combatir la giardiasis.

***Capítulo 5:***  
***Conclusiones Generales***

## Capítulo 5: Conclusiones Generales

La presencia de un genoma completamente secuenciado, la susceptibilidad a manipulación genética, y la capacidad de reproducir fácilmente su ciclo *in vitro* hacen de *Giardia* un interesante organismo para la comprensión de varias funciones celulares y vías bioquímicas. El tema abordado en el presente *Trabajo de Tesis* resulta innovador, radicando uno de los motivos en la función de la enzima estudiada (**Figura 5.1**). Hasta hace pocos años, ADI sólo fue descrita como una enzima metabólica tanto en *Giardia lamblia* como en procariotas, participando en la producción de ATP, a partir de L-Arg (panel izquierdo). Recientemente se demostró su rol en la inhibición indirecta de la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador (panel central), y se describió su función como PAD durante el proceso de variación antigénica (panel derecho). No habiéndose identificado hasta el momento en ninguna célula eucariota una enzima con tales características, la comprensión de ADI y su participación en los procesos de adaptación del parásito, representa un aspecto relevante.

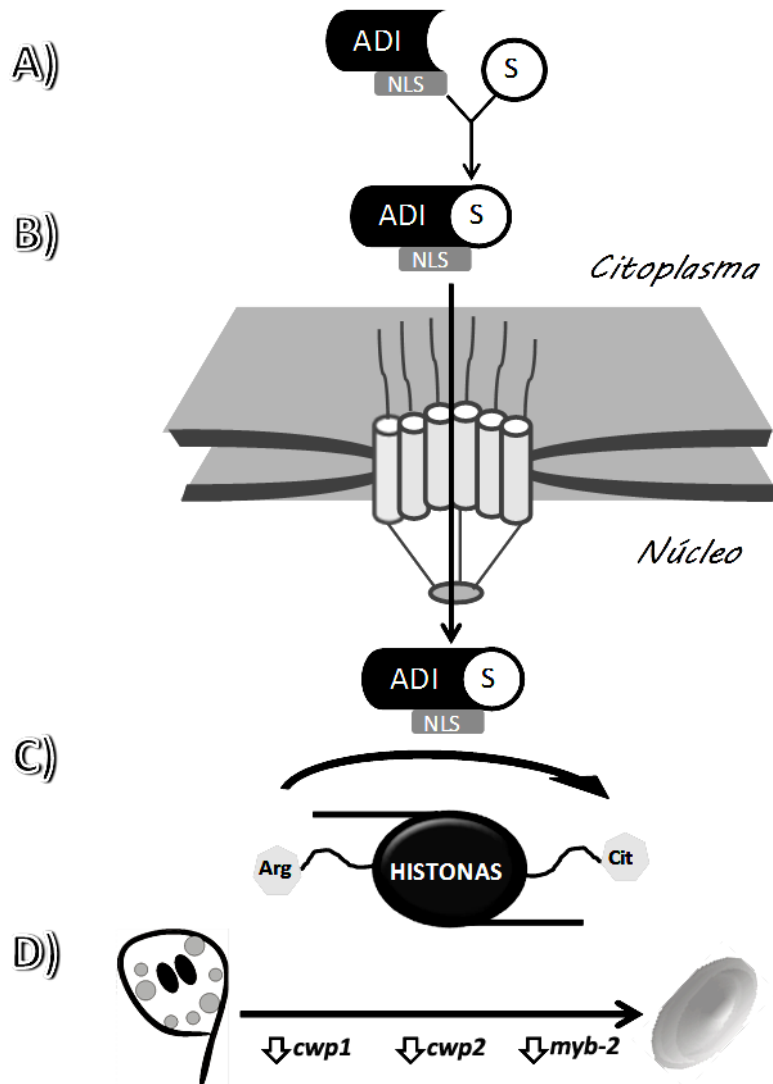


**Figura 5.1: Representación esquemática de las funciones de ADI durante el crecimiento de *Giardia lamblia*.** A) Durante el crecimiento los trofozoítos de *Giardia* incorporan L-Arg desde el medio extracelular. Dentro de la célula ADI convierte L-Arg a citrulina con producción de ATP, a través de la vía ADH. B) ADI es liberada al espacio extracelular cuando los trofozoítos entran en contacto con las células epiteliales y compite con la NOS del hospedador por la L-Arg, reduciendo la producción de ON. C) Ante bajas concentraciones de anticuerpos, ADI actúa como PAD sobre el extremo CRGKA de las VSPs, induciendo VA.

En este *Trabajo de Tesis*, se demostró que durante el enquistamiento del parásito, ADI transloca a los núcleos, resultando este cambio de localización y el incremento en la masa molecular predicha para la enzima producto de la *SUMO*ilación. Recientemente, además de describir los componentes del sistema de *SUMO*ilación en *Giardia*, hemos demostrado que ADI se *SUMO*ilada en la K de posición 101. No obstante, aún cuando el conocimiento de los conjugados a *SUMO* resulte esencial para descifrar el impacto de esta modificación post-traducciona en la biología del organismo, la identificación de proteínas *SUMO*iladas y la comprensión de cómo *SUMO* afecta procesos biológicos en *Giardia* se encuentra en etapas tempranas, habiéndose identificado sólo a ADI como sustrato de *SUMO*ilación. Cabe destacar que los principales aportes al estudio de esta modificación post-traducciona en *Giardia* se han realizado en los últimos cinco años, y una parte fundamental de los mismos surgieron de este *Trabajo de Tesis*.

A continuación se esquematiza el modelo, que a modo de resumen, permite mostrar la cascada de eventos coordinados que proponemos explica la regulación negativa del enquistamiento mediada por ADI (**Figura 5.2**).





**Figura 5.2: Representación esquemática de la función de ADI durante el enquistamiento de *Giardia lamblia*.** En las últimas etapas del enquistamiento ADI es translocada desde el citoplasma a los núcleos por SUMOilación y NLSs (A y B), para citrulinar histonas (C) regulando la expresión de los genes *cwp1*, *cwp2* y *myb2*.

En este modelo, la SUMOilación de ADI representaría la primera señal que dirige la enzima al núcleo probablemente exponiendo las NLSs que promueven su ingreso a los núcleos (A-B). Hasta el momento no existen publicaciones que informen sobre la participación de NLSs en la translocación de proteínas al núcleo en *Giardia*, siendo estos hallazgos importantes como primera evidencia del uso de estos motivos por el parásito, demostrando su conservación a lo largo de la evolución. Dentro de los núcleos, ADI actúa

como PAD deiminando arginina/s en histonas (C), induciendo a través de un mecanismo aún desconocido, la regulación negativa de los genes *cwps* y del factor de transcripción *myb2*, para permitir que el enquistamiento se complete (D). Nuestros resultados permiten establecer así, un punto de integración importante de vías de señalización en *Giardia*, que son importantes en la regulación de la producción de quistes en el parásito. No obstante, a pesar de los avances mencionados respecto a la función de ADI durante el enquistamiento en *Giardia*, son diversas las incógnitas y cuestionamientos, aún no resueltos, que serán tópicos de desarrollo de futuros trabajos. La concreción de los mismos dará origen a conocimientos particularmente relacionados al estudio de moléculas esenciales y mecanismos biológicos involucrados en la sobrevivencia de *Giardia* que serán de utilidad para su posible control médico a futuro, y la comprensión de su papel biológico y su rol en la historia de la evolución.

***Capítulo 6:***  
***Materiales y Métodos***

## Capítulo 6: Materiales y Métodos

### 6.1. 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 (Gillin et al., 1990). 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) (Diamond et al., 1978). Todos los cultivos se realizaron en tubos de borosilicato con tapa a rosca (Eurotubo®, Deltalab), que se completaron con un volumen total de 14 ml con medio completo de crecimiento y con 100 µl de trofozoítos de *Giardia*. Se colocaron los tubos dentro de gradillas que se orientaron inclinadas en ángulos de aproximadamente 45° dentro de una estufa de cultivo a 37 °C. Luego de 1h comienza a observarse adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo a través de su disco ventral. De este modo, y de manera similar a lo que ocurre *in vivo*, se produce la división de las células obteniéndose a las 48h una monocapa de trofozoítos en etapas de crecimiento. La inclinación de las gradillas permite lograr una mayor adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo. El proceso de enquistamiento *in vitro*, se llevó a cabo en dos etapas. En la primera, se descartó el medio de crecimiento de los trofozoítos cultivados hasta confluencia durante 24h y los tubos, conteniendo trofozoítos adheridos a su pared, se completaron con medio de pre-enquistamiento (PE) (medio completo de crecimiento sin bilis bovina). Finalmente, el medio de PE fue reemplazado por medio de enquistamiento, que posee una concentración de bilis porcina de 0.45%, y de ácido láctico al 0.01%, cambiándose el pH del medio a 7.8 (Boucher and Gillin, 1990). Este cambio de medio induce la diferenciación de trofozoítos a quistes, los cuales pierden la capacidad de adherencia y permanecen libres en el medio de enquistamiento. El periodo de enquistamiento para cada experimento en particular se detalla en la sección de Resultados.

Los trofozoítos fueron despegados de las paredes de los tubos mediante enfriamiento a 4°C en medio o *PBS* (del inglés, *Buffer fosfato salino*) durante 15 min y luego recuperados por centrifugación a 1455 x g por 10 min. Para recolectar los quistes se

centrifugaron los tubos a 1455 x g durante 10 min, sin el previo enfriamiento de los mismos.

## 6.2. Análisis Bioinformáticos (*in silico*)

La proteína *SUMO* en *Giardia* fue identificada mediante la búsqueda en *GDB* (<http://GiardiaDB.org>). Para probar la conservación en la composición de aminoácidos en la secuencia de *SUMO*, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando *T-Coffee* (Notredame et al., 2000) con un seteo por defecto, y empleando secuencias de *SUMO* provenientes de *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. musculus*, *D. rerio*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *T. brucei*, *P. falciparum* and *A. thaliana*. Seguido al alineamiento se utilizaron los software *Block Mapping and Gathering with Entropy* (Criscuolo and Gribaldo, 2010) para seleccionar las regiones de alineamientos con alto porcentaje de identidad. El alineamiento corto resultante (un promedio de 79 residuos entre las posiciones 34 y 111) fue luego curado manualmente con *GeneDoc* (Piast et al., 2005). La estructura tridimensional de *SUMO* fue predicha usando *Phyre 2* (Kelley and Sternberg, 2009). Regiones de alfa-hélice y lámina-beta (entre las posiciones 23 y 96) que corresponden a *SUMO* de *Giardia* y la cadena A del banco de datos de proteínas 2K8H de *Trypanosoma brucei* (Shang et al., 2009) fueron alineadas con *Friend 2.0* (Abyzov et al., 2005).

Los genes que codifican para las probables enzimas involucradas en la cascada de *SUMO*ilación en *Giardia lamblia* se obtuvieron utilizando *BLASTp* (del inglés, *B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool *p*rotein) de la *GDB*, a partir de secuencias ortólogas, y dominios conservados, en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* obtenidos desde NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Alineamientos de secuencias múltiples para la subunidad *SAE2* y la enzima *E2 SUMO* de conjugación se construyeron utilizando *Muscle* y el algoritmo de *Jalview*. Para la predicción de la localización subcelular de *SP*, *SAE2* y *E2 SUMO* se utilizó *PSORT* (<http://psort.hgc.jp/>) (Nakai and Horton, 1999).

Para la predicción de la estructura cristalográfica de la enzima ADI en *Giardia* se empleó el software *Phyre 2* (Kelley and Sternberg, 2009). La identificación y localización

del motivo de SUMOilación (LKYE) se llevó a cabo utilizando *PyMol* (DeLano Scientific, USA).

Para predecir el sitio de unión a SUMO en ADI, se utilizaron los *software SUMOsp* 2.0 (Ren et al., 2009) y *PCI-SUMO* (del Departamento de Sistemas e Ingeniería Computacional de la Universidad de Carleton). Para la predicción de las NLSs se empleó el programa *PSORT II* (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) (Nakai and Horton, 1999)

### 6.3. Purificación y Análisis de Ácidos Nucleicos

El ARN total fue extraído a partir de trofozoítos y quistes, de acuerdo a lo informado (Lujan et al., 1995a). Para ello, el ARN se aisló usando el reactivo TRizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, US) y una segunda purificación se realizó 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 (Sambrook and Gething, 1989).

### 6.4. Retrotranscripción por Reacción en Cadena de la Polimerasa (*RT-PCR*)

El ARN total de las células salvajes (*WB/1267*) y células que sobre-expresan ADI-HA, en crecimiento y a 36h de enquistamiento, se aisló usando el reactivo TRizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), y una segunda purificación se realizó usando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, US). La reacción de *RT-PCR* se completó usando el ensayo de *RT-PCR* de un solo paso (Qiagen, Valencia, CA, US) como se describió anteriormente (Rivero et al., 2010). El ARN se diluyó en serie, a partir de 20 ng hasta 0,2 ng por reacción, en un volumen final de 50 µl. La reacción de transcripción reversa fue realizada a 50°C por 30 min seguido por la inactivación de la enzima a 95°C por 15 min. Para la *PCR*, se realizaron 30 ciclos de [30s a 94°C, 30s a 50°C y 1 min a 72°C], seguidos de 10 min a 72°C para la extensión final. El control de contaminación con ADN se llevó a cabo agregando los cebadores de ADI a la etapa de *PCR* de la reacción de *RT-PCR*. 5µL del producto de la reacción de *RT-PCR* se sembraron en geles de agarosa. Éstos fueron preparados en solución tampón TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 1mM, pH 8) al 1.2% de

agarosa y con el agregado de *SYBR® Safe DNA Stain* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) para el teñido de las bandas. Las muestras fueron sembradas con solución tampón de siembra (Azul de bromofenol 0,09%, Xileno Cianol FF 0,09%, Glicerol 60%). Las electroforesis fueron realizadas en la misma solución tampón durante 40 min a 100 V y finalmente se visualizaron mediante la exposición a *Safe Image™ Blue-Light Transiluminator* (Invitrogen). La amplificación de los productos se cuantificó por escaneo de la densitometría utilizando el *software EagleSight* para la adquisición de la imagen, la documentación y el análisis (Stratagene La Jolla, CA). Los cebadores utilizados en el ensayo se detallan en la **Tabla 6.1**. La Normalización de los datos se llevó a cabo utilizando como referencia la transcripción del gen endógeno *gdh*. 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 6.1.: Cebadores utilizados en el ensayo de RT-PCR**

Cebadores	5→3
<i>gdh</i> F	ATGCCTGCCAGACGATCGA
<i>gdh</i> R	GAGCCAGAAAGAAGGACGTT
<i>adi</i> F	CACTTGTGGAAATTACGTCT
<i>adi</i> R	CTTGATATCGACGCAGATGT
<i>adi-ha</i> F	CACTTGTGGAAATTACGTCT
<i>adi-ha</i> R	CTATGCATAGTCTGGTACAT
<i>cwp2</i> F	ATGATCGAGCCCTTGTCT
<i>cwp2</i> R	ATCCATCTCTCGAGAGTT

F: sentido. R: antisentido

## 6.5. PCR en Tiempo Real

El ARN total de las células de tipo salvaje se aisló usando el reactivo TRizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), y una segunda purificación se realizó usando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, US). El ARN extraído fue tratado con ADNasa (Promega, Madison, WI, US) previo a la síntesis de ADNc con la enzima *Transcriptase 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  $\mu$ l. Los cebadores se diseñaron para la detección de los genes *gdh*, *cwp1*, *cwp2*, *cwp3*, *myb-2* y *wrky* como se muestra en la **Tabla 6.2**. 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 6.2.: Secuencia de cebadores utilizados en el ensayo de PCR en tiempo real**

Cebadores	Secuencia
<b>gdh real F</b>	AGGGCGGCTCCGACTTT
<b>gdh real R</b>	AGGCATGACCTCGTTGTC
<b>cwp1 real F</b>	AACGCTCTCACAGGCTCCAT
<b>cwp1 real R</b>	AGGTGGAGCTCCTTGAGAAATTG
<b>cwp2 real F</b>	TAGGCTGCTCCCACTTTTGAG
<b>cwp2 real R</b>	CGGGCCCGCAAGGT
<b>cwp3 real F</b>	GCAAATTGGATGCCAAACAA
<b>cwp3 real R</b>	GACTCCGATCCAGTCGCAGTA
<b>myb2 real F</b>	TCCCTAATGACGCCAAACG
<b>myb2 real R</b>	AGCACGCAGAGGCCAAGT
<b>wrky real F</b>	TTGCTCCGCCACTGTTTC
<b>wrky real R</b>	GCCGCGTTGTAGCTTTGC

F: sentido. R: antisenido.

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 15s y 60°C por 1 min]. La expresión génica fue normalizada utilizando el gen *gdh* como gen de referencia, y calculada utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ . El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.). La significancia estadística se delimitó en p-valor<0.05. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.



## 6.6. Amplificación y Clonado de Proteínas

### 6.6.1. Amplificación por PCR

Las secuencias de cada proteína fueron obtenidas como se describe en la sección Resultados. 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 de cada gen de interés considerando que este parásito carece de intrones. Se diseñaron manualmente cebadores para cada gen (**Tabla 6.3**), a los fines de permitir el clonado de los fragmentos de interés en un vector específico para *Giardia lamblia*. Se subraya en cada cebador la secuencia reconocida por cada enzima de restricción utilizada. 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 6.3: Secuencia de cebadores diseñados para el clonado y expresión de proteínas**

Cebadores	Secuencia (5'→3')
ADI F	CAAT <u>GGGCCC</u> ACTGACGCGTACGACCATCTTTA
ADI R	CAAT <u>CCCGGG</u> GCAACGCTCTTTTGCTTAGTCTTTGCT
SUMO F	CATT <u>GGATCC</u> GATGACGAAGGAGACGTCCCCAATT
SUMO R	CATT <u>GCGGCCGC</u> CTAGTGGCCGCAATCTGATTCGCATCA
SAE2 F	CATT <u>CCATGG</u> ATCTGTGCATCGTCGGGTGCGGC
SAE2 R	CATT <u>GATATC</u> GCAGAGCTCGTCCAGATCTTGCGG
E2 SUMO F	CATT <u>CCATGG</u> AATTGGCTTTTAAAACACGAAATTCAGTTAAAATGG
E2 SUMO R	CATT <u>GATATC</u> CTTTTGTGGCGTAGTCAAGCGT
SP F	CATT <u>CCATGG</u> CTGCTGAACTGTTGCAGCTCAA
SP R	CATT <u>GATATC</u> GCAGAGCTCGTCCAGATCTTGCGG

F: asentido. R: antisentido. GGGCCC: secuencia reconocida por *Apal*. CCCGGG: secuencia reconocida por *SmaI*. GGATCC: secuencia reconocida por *BamHI*. GCGGCCGC: secuencia reconocida por *NotI*. CCATGG: secuencia reconocida por *NcoI*. GATATC: secuencia reconocida por *EcoRV*.

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>).

### 6.6.2. Expresión de las Variantes de ADI

Para la introducción de mutaciones en el sitio de *SUMO*ilación (K101), y en las *NLS*s de la secuencia génica de ADI, se diseñaron cebadores (**Tabla 6.4**) con mutaciones puntuales empleando el programa de Stratagene “*QuikChange Primer Design Program*” (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner>).

**Tabla 6.4.: Cebadores diseñados para el clonado y expresión de las variantes de ADI**

Cebadores	Secuencia (5'→3')
ADI <sub>K101A</sub> F	GCAATGGCCTCGCTGGCGTACGAGCTCCATGC
ADI <sub>K101A</sub> R	GCATGGAGCTCGTACGCCAGCGAGGCCATTGC
mNLS1 F	GACCAGCAGATAACCACCGCGGGGAATAGTCATGGGCCAG
mNLS1 R	CTGGCCCATGACTATTCCCGCCGCGGTGGTTATCTGCTGGTC
mNLS2 F	ACCACCCGGCGGGAATAGCGGCGGGCCAGTTTCAGGC
mNLS2 R	GCCTGAAACTGCCCCGCGCTATTCCGCGCCGGGTGGT
mNLS3 F	CAGTTTCAGGCGGCGCAGAGGAGGC
mNLS3 R	GCCTCCTCTGCGCCGCTGAAACTG
mNLS4 F	CAGTTTCAGGCGCCGCGGCGAGGCGGAGCAGGT
mNLS4 R	ACCTGCTCGCGCCTCGCCGCGGCGCCTGAAACTG

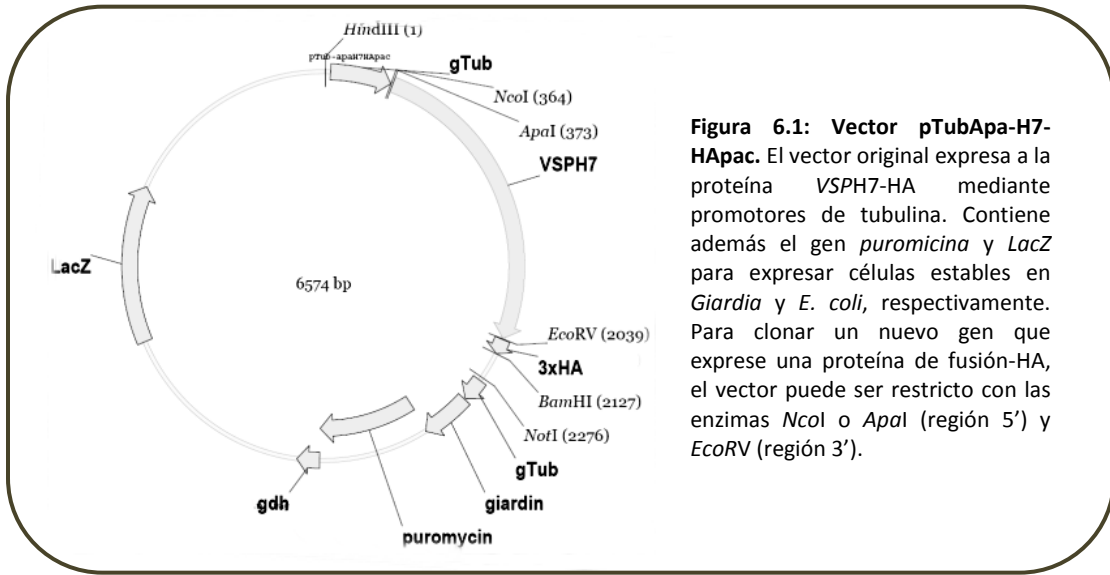
F: sentido. R: antisentido.

Para la introducción de mutaciones puntuales se utilizó un ensayo de mutagénesis *QuikChange* (*Stratagene*) (Touz et al., 2004; Touz et al., 2005). Para ello, se llevó a cabo la reacción de *PCR* utilizando como templado ADI y siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incorporó luego la enzima de restricción *DpnI*, para digerir el ADN de doble cadena super-enrollado (no mutado) incubando la reacción durante 1h a 37°C, utilizando posteriormente 3 µL del producto obtenido para transformar bacterias *XL-1 Blue*. De las

colonias que crecieron se purificó el plásmido, utilizando columnas (Qiagen, Valencia, CA, US) enviando las muestras a la compañía *Macrogen* para su secuenciación. El secuenciamiento se realizó utilizando un termociclador *BigDyeTM*, y los productos de reacción purificados por precipitación con etanol fueron secuenciados en el *Automatic Sequencer 3730xl*, seleccionándose los plásmidos que presentaron mutaciones correctas.

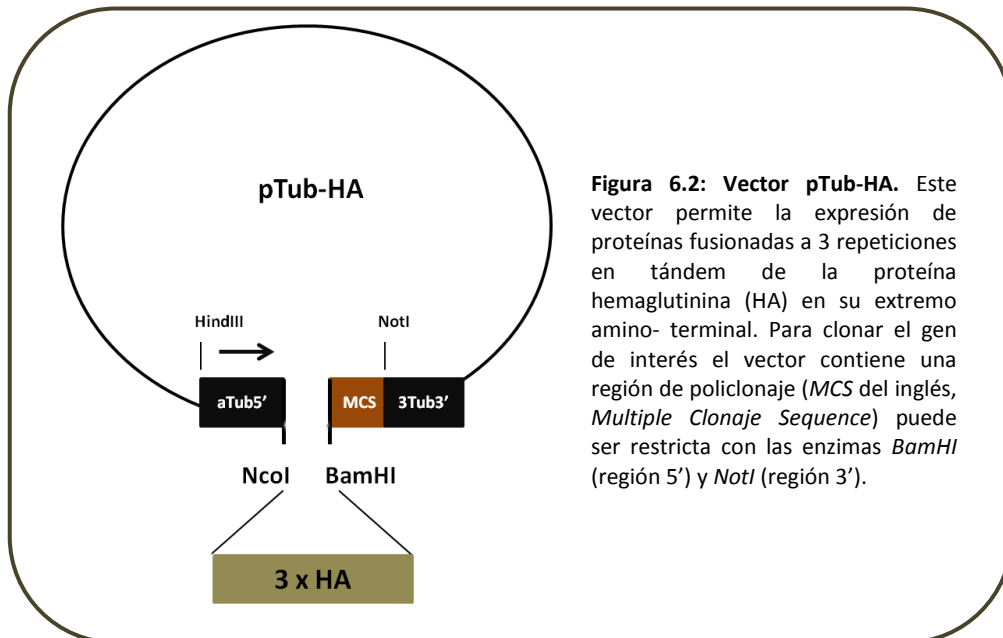
### 6.6.3. Construcción de los Vectores de Expresión en *Giardia lamblia*

Para expresar constitutivamente las enzimas involucradas en la cascada de SUMOilación (SP, SAE2 y E2 SUMO), ADI y sus variantes ADI<sub>K101A</sub>, mNLS1, mNLS2 y mNLS3, se utilizó el vector de expresión pTubApa-H7-HApac (**Figura 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 *cassette* de puromicina se encuentra bajo el control del promotor endógeno no regulado de *gdh*. Las proteínas se expresan fusionadas a 3 repeticiones en tándem de la proteína hemaglutinina (HA) del subtipo H3 del virus influenza (YPYDVPDYA) en su extremo carboxilo-terminal antes del codón de terminación TAA. El plásmido pTubH7HApac posee el gen de la VSPH7 de la cepa GS de *G. lamblia* que puede ser removido con las endonucleasas *NcoI/ApaI* y *EcoRV* (Invitrogen) posibilitando el clonado de otros genes en dicho vector. El clonado de marco de lectura abierto (*ORF* del inglés, *Open Reading Frame*) de cada una de las proteínas en el vector de pTubApa-H7-HApac permite expresarlas constitutivamente para su posterior localización subcelular en trofozoítos de *Giardia* (Touz et al., 2002; Touz et al., 2003; Touz et al., 2004)



**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 estables 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').

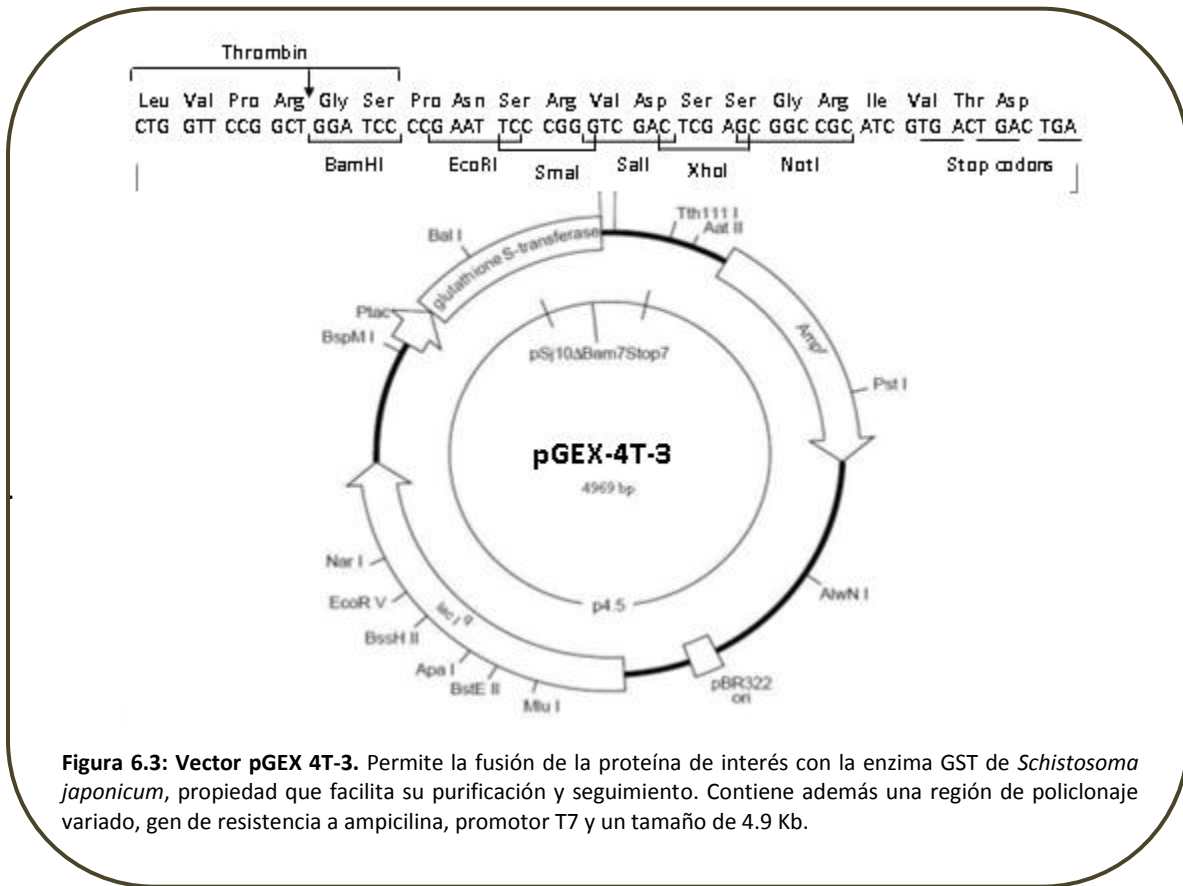
Para la expresión de la proteína *SUMO* se utilizó el vector pTub-HA (Figura 6.2). Este vector también es específico para *Giardia lamblia*, fue construido en colaboración con el Dr. Aron Neiman de la Universidad de Stony Brook (NY, US) y contiene el promotor de  $\alpha$ 2-tubulina y la región 5' del gen  $\beta$ -giardina del parásito. Se caracteriza, además por expresar las proteínas con una etiqueta HA en el extremo N-terminal.



**Figura 6.2: Vector pTub-HA.** Este vector permite la expresión de proteínas fusionadas a 3 repeticiones en tándem de la proteína hemaglutinina (HA) en su extremo amino-terminal. Para clonar el gen de interés el vector contiene una región de policlonaje (MCS del inglés, *Multiple Clonage Sequence*) puede ser restringida con las enzimas *BamHI* (región 5') y *NotI* (región 3').

### 6.6.4. Expresión y Purificación de la Proteína Recombinante de *SUMO* fusionada a GST

La producción de la proteína recombinante GST-SUMO se llevó a cabo en el Instituto Pasteur de Montevideo, y ha sido descrita en detalle (Sehr et al., 2001). Brevemente ADNc que codifica para *SUMO* en *Giardia* se amplificó y se clonó en el vector de expresión pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech, LC, UK) fusionado a la enzima glutatión tio-transferasa (**Figura 6.3**) vía los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Not*I como se describió previamente.



La proteína con la etiqueta GST se expresó en bacterias de la cepa *BL21-Codon-Plus* (Qiagen, Valencia, CA, US) de *Escherichia coli* y se purificó utilizando perlas de glutation-sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech LC, UK) produciendo cantidades suficientes para

inmunizar los ratones. Las fracciones de proteína *SUMO* recombinante eluída 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 1L de agua destilada (dH<sub>2</sub>O)).

#### **6.6.5. 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 *sumo* el inserto de 309 pb fue incubado con el par de enzimas *BamHI/NotI*, por 2 hs a 37°C (corte) y 10 min a 70°C (inactivación de la enzima). Para *sae2*, e2 *sumo*, sp los fragmentos de 1614 pb, 538 pb y 1620 pb, respectivamente con *NcoI/ EcoRV* por 2 hs a 37°C (corte) y luego 10 min a 70°C (inactivación). Se adicionó además BSA 10X y Buffer 3 para todos los casos. Para *adi* y sus variantes se utilizaron las enzimas *ApaI* y *SmaI*, adicionando BSA 10X y Buffer 4. 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, y el vector 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).

#### **6.6.6. Ligación del Producto de Corte**

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

#### **6.6.7. 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 (OD) aproximadamente 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 buffer TB frío (Pipes 10 mM/MnCl<sub>2</sub> 55 mM/CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 15mM/KCl 150mM, 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 buffer 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 N<sub>2</sub> líquido, y manteniéndose a -70°C.

#### **6.6.8. Transformación de *Escherichia coli***

Las bacterias *XL-Blue* competentes se transformaron con el vector conteniendo el gen de interés, 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 1h 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 plaquearon en LB-ampicilina (25mg/mL)-agar 1,2% y se incubaron toda la noche en estufa a 37°C.

#### **6.6.9. 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 (25mg/mL) y se cultivaron toda la noche en agitación a 37°C.

#### **6.6.10. 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).

### **6.7. 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 Moxalactaman (333 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Luego de cultivar los trofozoítos a 37°C toda la noche, se agregó Puromicina (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 IFI.

### **6.8. Generación del Acm anti-SUMO en *Giardia lamblia***

#### **6.8.1. Inmunización**

Tres ratones de la cepa *BALB/c* fueron inmunizados con 100 µg/mL de la proteína *SUMO* recombinante 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, se la incubó por 1h 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 e IFI. Se seleccionaron dos de esos animales y se les realizó el desafío con la proteína recombinante. Tres días más tarde, los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo que fue procesado como se describe más abajo.



### 6.8.2. Producción del Acm anti-SUMO

Células del mieloma *NSO* (ECACC85110503) se crecieron en placas multipocillos con 1 mL de medio RPMI (cada 100 mL: 77 mL de RPMI, 20 mL de suero fetal bovino, 2 mL de ATB, 10000 U de penicilina G, 10 mg de sulfato de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B y 1 mM de Glutamax-glutamina). Después de 7 días, estas células se transvasaron a una botella de cultivo conteniendo 5 mL de medio completo, y se incubaron en estufa con CO<sub>2</sub> hasta la formación de monocapa. Posteriormente, el medio se retiró y se agregó tripsina (0.01-0.5%) en *PBS* 1X, durante 5 a 15 min, a 37 °C lo que produce la disociación tisular mediante la ruptura de la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que mantiene a las células unidas. La acción de la tripsina se inhibió por el agregado de medio completo. Luego, las células se lavaron dos veces con RPMI sin suero, centrifugando a 250 x g por 8 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 mL de RPMI sin suero y se contaron en cámara de *Neubauer*. Paralelamente, el bazo se colocó sobre una malla metálica en una cápsula de Petri con medio sin suero. Los tejidos se homogeneizaron con un émbolo hasta obtener las células libres de fibroblastos. Luego estas células se lavaron con RPMI sin suero dos veces. Por último, se contaron en cámara de *Neubauer*. Para la fusión de las células de mieloma con los linfocitos, se utilizó una relación 2:1 (mieloma:linfocito) de células viables. La fusión se realizó utilizando polietilenglicol (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, US). Finalmente las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio RPMI completo, dejándolas crecer en estufa a 37 °C con CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se agregó al medio una solución de hipoxantina-aminopeptera-timina (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, US) y las células se colocaron en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días, comenzó a observarse la aparición de hibridomas. Se seleccionaron los pocillos en donde había crecimiento de hibridomas y se examinaron en forma paralela a través de ensayos de IFI y de *Dot blot*. Los hibridomas que resultaron positivos, se crecieron en placas de 48 pocillos y luego de corroborar la continuidad en la producción de anticuerpos, se pasaron a botellas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup>. Después de realizar un segundo chequeo, los hibridomas se congelaron a -70 °C en suero fetal bovino/DMSO al 10%.

### 6.8.3. 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).

### 6.9. Análisis de Hibridización en *Slot blot*

2µg del ARN total extraído de trofozoítos salvajes y *ADI-HA* en crecimiento y a diferentes horas de enquistamiento fue obtenido combinando el método de extracción de TRizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) y el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, US). El ARN fue inmovilizado en una membranas de *Nytran* (Schleider & Schuell Keene, NH) utilizando el sistema de *slot-blot MINIFOLD II*, acorde a las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron primero hibridizadas con sondas antisentido específicas para el gen de *adi* fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (Amersham Pharmacia Biotech) y lavadas como se describe (Brown and Mackey, 2001). Se utilizó una sonda antisentido específica para *gdh* o *cwp2* como controles. Los cebadores empleados fueron los mismos que los utilizados para los ensayos de *RT-PCR* (Tabla 6.3).

### 6.10. IF

Los trofozoítos se lavaron con *PBSm* (*PBS* 1X+medio de crecimiento al 1%, pH 7,4) y posteriormente se permitió la adherencia a portaobjetos (previamente tratados con poli-L-lisina) a 37°C en cámara húmeda. Después de la fijación con formaldehído al 4%, 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 (anti-HA, anti-ADI, anti-SUMO) 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 o anti-conejo) conjugado a *Alexa* 488, *Alexa* 546, *FITC* o *Texas red*. Para los casos en que fue

necesario se utilizó el Acm anti-CWP1. Para la triple tinción, se utilizó el *kit Zenon Tricolor IgG1 de ratón* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. 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. *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 fluorescentes 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 Phototronics, 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).

Tabla 6.5.: Anticuerpos utilizados en los ensayos de IF (e inmunotransferencia)

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Casa Comercial
<b>Anti-HA</b>	Monoclonal de ratón	1:300	Sigma (St Louis, MO, US)
<b>Anti-ADI</b>	Policlonal de ratón	1:800	Provisto por el Dr. <i>Staffan Svard</i>
<b>Anti-GMP1</b>	Monoclonal de ratón	1/100	Zymed Laboratories, Invitrogen
<b>Anti-SUMO 13C5</b>	Monoclonal de ratón	1/100	Generado por el laboratorio
<b>Anti-citrulina</b>	Policlonal de conejo	1/25	Upstate (Millipore)
<b>Anti-VSP1267</b>	Monoclonal de ratón	1/100	Generado en el laboratorio
<b>AlexaFluor-488</b>	Monoclonal de ratón	1/1000	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
<b>Alexa Fluor-586</b>	Monoclonal de ratón	1/1000	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
<b>Alexa Fluor- 555</b>	Monoclonal de conejo	1/1000	Molecular Probes Eugene, Oregon, US
<b>FITC</b>	Policlonal de ratón	1/200	Cappel Laboratories
<b>Texas Red-586</b>	Policlonal de ratón	1/500	Cappel Laboratories
<b>Anti-HA FITC</b>	Monoclonal de ratón	1/100	Sigma (St Louis, MO, US)
<b>Anti-CWP1 FITC</b>	Monoclonal de ratón	1:100	Waterborne, New Orleans, LA
<b>Anti-CWP2</b>	Monoclonal de ratón	1/100	Generado en el laboratorio
<b>Anti-HRP</b>	Policlonal de ratón	1:1000	DakoCytomation
<b>Anti-HA/HRP</b>	Monoclonal de ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, US)

Para los análisis cuantitativos, las imágenes fueron expuestas y procesadas idénticamente. Al menos 200-400 células que expresaron cada tipo de proteínas fueron examinadas. Los datos fueron estadísticamente evaluados utilizando test de *Student*.

### 6.11. Análisis de Colocalización Cuantitativa (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 (Sun and Crossland, 2000) (García Penarrubia et al., 2005) (Zinchuk et al., 2007). Se considera que hay colocalización en el rango de 0.6 a 1.0. El diagrama de dispersión (del inglés, *Display Frequency Scatter Plot*) es un mapa de dispersión de intensidades rojas y verdes, representando los colores la frecuencia con la que los píxeles verdes y rojos se combinan entre sí en la imagen original (por convención, los colores más cálidos representan altos valores).

### **6.12. Citometría de Flujo**

Para evaluar la culminación del proceso de enquistamiento en *Giardia*, se crecieron trofozoítos hasta monocapa en medio de PE y se indujeron a enquistar. Luego de 36h de enquistamiento las células fueron enfriadas en hielo y centrifugadas a 500 x g por 10 min a 4°C. Para analizar la expresión superficial de CWP1 (quistes), las células fueron lavadas con PBS y marcadas con el anticuerpo anti-CWP1 conjugado a FITC (1:150 en solución de anticuerpo) por 1h a 4°C. Después de lavar con PBS tres veces, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. Los controles incluyeron anticuerpos no relacionados. Los quistes se lavaron y analizaron utilizando un citómetro *Cyton Absolute* (Ortho Diagnostic System) del Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Los datos fueron analizados usando el programa de análisis *FlowJo*.

### **6.13. Determinación del Contenido Total de Proteínas**

Fue realizado utilizando el ensayo comercial *Qubit<sup>®</sup> Protein Assay Kit* (Molecular Probes, Eugene, OR, US).

### **6.14. 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 (Laemmli, 1970). 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.

### 6.15. Inmunotransferencia

La transferencia de proteínas desde los geles a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ ECL™, Little Chalfont, UK) se realizó a 15 V, por 1h 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, Nestle®) y *Tween* 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US), en tampón *TBS* (del inglés, *Tris Buffered Saline*) (tampón Tris-salino: 25 mM Tris, 150 mM NaCl) por 1h 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 marcado con la enzima peroxidasa de rabano o *HRP* (del inglés, *Horse radish peroxidase*) [anticuerpo de cabra anti-ratón Ig (H+L)-HRP] (Dako, Dinamarca). 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* 100mM 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 *cassette* 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.

### 6.16. Ensayos de *Dot blot*

Se tomaron 5  $\mu$ l 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 con los Acs primarios y secundario, como se detalla arriba.

### 6.17. Fraccionamiento Subcelular

Trofozoítos en crecimiento y distintos tiempos de enquistamiento fueron resuspendidos en solución amortiguadora A (20mM Tris-HCl, pH: 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5mM KCl, 1mM *phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF), 2 mM DTT, and 0,1% Nonidet P-40), y se sonicaron. El homogenato fue centrifugado a 760 x g a 4°C por 10 min y se separó la fracción citoplasmática (sobrenadante) y el precipitado (núcleos). En ambas fracciones se realizaron ensayos de inmunotransferencia, como se describió previamente, utilizando el Ac policlonal anti-ADI.

### 6.18. IP

Los trofozoítos de *Giardia* fueron enfriados y lisados en solución tampón de lisis (50mM 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  $\mu$ l del Ac anti-SUMO 13C5 o anti-GMP1 por 4h, y se incubó toda la noche a 4°C con proteína L-Agarosa. Las perlas fueron lavadas cuatro veces con solución amortiguadora de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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) o el Ac policlonal anti-ADI.

### 6.19. Aislamiento de Histonas e Identificación por Espectrometría de Masas

Los parásitos centrifugados fueron lavados dos veces con *PBS* frío e incubados con una solución amortiguadora de lisado (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, NaF 50 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 1%, Deoxicolato de Sodio 1%, PMSF 5mM y Iodoacetamida 1 mM) por 10 min a 4°C. Las células fueron centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4 °C, y el precipitado fue resuspendido en 1 mL de agua, agregándose luego 22 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Luego de su incubación por 1h a 4°C, las histonas fueron precipitadas con 10 volúmenes de acetona a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se precipitaron por centrifugación a 12000 x g por 15 min a 4°C. El precipitado se dejó secar, y luego se analizó en geles de poliacrilamida al 15% (*SDS-PAGE*). Subsecuentemente el gel fue procesado para inmunotransferencia o teñido con azul de Coomassie R-250 como se describió en la sección 6.6.4. Para esta tinción, se incubaron los geles con la solución azul de Coomassie durante 1h a temperatura ambiente y seguidamente se dejaron incubando con dH<sub>2</sub>O toda la noche a temperatura ambiente para eliminar el exceso de colorante. Se utilizaron diversas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la cuantificación.

Para el análisis por la técnica de MALDI-ToF-MS (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), las bandas obtenidas fueron escindidas individualmente y se enviaron al Dr. *Ulf Hellman* (Departamento de Biología Celular, Universidad de Uppsala, Suecia) para su identificación.

### 6.20. Ensayo de Citrulinación

El aislamiento de las histonas fue realizado en trofozoítos en crecimiento y trofozoítos enquistando a 36h como se describe en la sección anterior. Las muestras fueron resuspendidas en 20 µl de SAM y se sembraron en un gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa, y luego se continuó con el ensayo de detección anti-citrulina que incluye una etapa en la cual se modifica a la citrulina para que sea reconocida por el Ac provisto en el *kit*, según las recomendaciones del fabricante (Millipore, Darmstadt, Germany) (Senshu et al., 1995). Las proteínas



citruinadas se detectaron utilizando el Ac anti-citrulina seguido de la incubación con el Ac secundario anti-*HRP*. Los controles incluyeron la omisión del Ac primario (anti-citrulina) o la ausencia de la etapa de modificación química de la citrulina. El mismo ensayo de detección fue utilizado para IFI. Se utilizó como Ac secundario el Ac policlonal anti-conejo Alexa 488 (1:200). Finalmente, las preparaciones fueron montadas en medio de montaje Vectashield. Las imágenes fueron colectadas en el microscopio confocal *Olympus FV1000* usando un objetivo de inmersión de 63x (NA 1.32, zoomX). Las imágenes de *DIC* fueron recolectadas simultáneamente con las imágenes de fluorescencia utilizando un detector de luz transmitida, y se procesaron en conjunto utilizando el programa *Adobe Photoshop 8.0* (Adobe Systems).

***Capítulo 7:***  
***Bibliografía***

## Capítulo 7: Bibliografía

**Abyzov, A., Errami, M., Leslin, C. M. and Ilyin, V. A.** (2005). Friend, an integrated analytical front-end application for bioinformatics. *Bioinformatics* **21**, 3677-8.

**Adam, R. D.** (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* **14**, 447-75.

**Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G.** (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615.

**Alegre, K. O. and Reverter, D.** (2011). Swapping small ubiquitin-like modifier (SUMO) isoform specificity of SUMO proteases SENP6 and SENP7. *J Biol Chem* **286**, 36142-51.

**Aley, S. B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M. E. and Gillin, F. D.** (1994). Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* **62**, 5397-403.

**Alican, I. and Kubes, P.** (1996). A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* **270**, G225-37.

**Amar, C. F., Dear, P. H., Pedraza-Diaz, S., Looker, N., Linnane, E. and McLauchlin, J.** (2002). Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol* **40**, 446-52.

**Andersson, J. O., Sjogren, A. M., Davis, L. A., Embley, T. M. and Roger, A. J.** (2003). Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes. *Curr Biol* **13**, 94-104.

**Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. and Svard, S. G.** (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* **8**, 413-22.

**Annoura, T., Makiuchi, T., Sariego, I., Aoki, T. and Nara, T.** (2012). SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* **7**, e37183.

**Anzilotti, C., Pratesi, F., Tommasi, C. and Migliorini, P.** (2010). Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev* **9**, 158-60.

**Arguello-Garcia, R., Arguello-Lopez, C., Gonzalez-Robles, A., Castillo-Figueroa, A. M. and Ortega-Pierres, M. G.** (2002). Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology* **125**, 209-19.

**Azuma, Y., Tan, S. H., Cavenagh, M. M., Ainsztein, A. M., Saitoh, H. and Dasso, M.** (2001). Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *FASEB J* **15**, 1825-7.

**Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. and Doolittle, W. F.** (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972-7.

**Banik, S., Renner Viveros, P., Seeber, F., Klotz, C., Ignatius, R. and Aebischer, T.** (2013). *Giardia duodenalis* arginine deiminase modulates the phenotype and cytokine secretion of human dendritic cells by depletion of arginine and formation of ammonia. *Infect Immun* **81**, 2309-17.

- Bayona, J. C., Nakayasu, E. S., Laverriere, M., Aguilar, C., Sobreira, T. J., Choi, H., Nesvizhskii, A. I., Almeida, I. C., Cazzulo, J. J. and Alvarez, V. E.** (2011). SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Proteomics* **10**, M110 007369.
- Benchimol, M.** (2004). Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. *Biol Cell* **96**, 291-301.
- Benchimol, M., Piva, B., Campanati, L. and de Souza, W.** (2004). Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *J Struct Biol* **147**, 102-15.
- Berger, S. L.** (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-12.
- Bernal, R. M., Tovar, R., Santos, J. I. and Munoz, M. L.** (1998). Possible role of calmodulin in excystation of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res* **84**, 687-93.
- Bernander, R., Palm, J. E. and Svard, S. G.** (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol* **3**, 55-62.
- Bhattacharya, S. K., Crabb, J. S., Bonilha, V. L., Gu, X., Takahara, H. and Crabb, J. W.** (2006). Proteomics implicates peptidyl arginine deiminase 2 and optic nerve citrullination in glaucoma pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 2508-14.
- Bingham, A. K., Jarroll, E. L., Jr., Meyer, E. A. and Radulescu, S.** (1979). *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol* **47**, 284-91.
- Bogdan, C.** (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**, 907-16.
- Bossis, G. and Melchior, F.** (2006). SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* **1**, 13.
- Boucher, S. E. and Gillin, F. D.** (1990). Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun* **58**, 3516-22.
- Bougdour, A., Braun, L., Cannella, D. and Hakimi, M. A.** (2010). Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* **12**, 413-23.
- Braun, L., Cannella, D., Pinheiro, A. M., Kieffer, S., Belrhali, H., Garin, J. and Hakimi, M. A.** (2009). The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **39**, 81-90.
- Bronte, V. and Zanovello, P.** (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* **5**, 641-54.
- Brown, T. and Mackey, K.** (2001). Analysis of RNA by northern and slot-blot hybridization. *Curr Protoc Neurosci Chapter 5*, Unit 5 17.
- Buchel, L. A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J. and Gobert, J. G.** (1987). In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J Parasitol* **73**, 487-93.
- Caccio, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A. and Pozio, E.** (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol* **38**, 1523-31.
- Caccio, S. M., De Giacomo, M. and Pozio, E.** (2002). Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length

polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* **32**, 1023-30.

**Campanati, L., Troester, H., Monteiro-Leal, L. H., Spring, H., Trendelenburg, M. F. and De Souza, W.** (2003). Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Histochem Cell Biol* **119**, 323-31.

**Carpenter, M. L., Assaf, Z. J., Gourguechon, S. and Cande, W. Z.** (2012). Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci* **125**, 2523-32.

**Carranza, P. G. and Lujan, H. D.** (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect* **12**, 71-80.

**Cavalier-Smith, T.** (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* **14**, 461-81.

**Cavalier-Smith, T.** (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* **73**, 203-66.

**Cavalier-Smith, T.** (2003). Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 109-33; discussion 133-4.

**Cavalier-Smith, T. and Chao, E. E.** (1996). Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J Mol Evol* **43**, 551-62.

**Cendan, J. C., Souba, W. W., Copeland, E. M., 3rd and Lind, D. S.** (1995). Cytokines regulate endotoxin stimulation of endothelial cell arginine transport. *Surgery* **117**, 213-9.

**Clark, I. A. and Rockett, K. A.** (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol* **37**, 1-56.

**Colby, T., Matthai, A., Boeckelmann, A. and Stuible, H. P.** (2006). SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**, 318-32.

**Crisuolo, A. and Gribaldo, S.** (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* **10**, 210.

**Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. et al.** (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-53.

**Chang, X. and Fang, K.** (2010). PADI4 and tumorigenesis. *Cancer Cell Int* **10**, 7.

**Chiu, P. W., Huang, Y. C., Pan, Y. J., Wang, C. H. and Sun, C. H.** (2010). A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in *Giardia lamblia*. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e677.

**Chuang, S. F., Su, L. H., Cho, C. C., Pan, Y. J. and Sun, C. H.** (2012). Functional redundancy of two Pax-like proteins in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *PLoS One* **7**, e30614.

**Dacks, J. B., Walker, G. and Field, M. C.** (2008). Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int* **57**, 97-104.

**Daubener, W., Schmidt, S. K., Heseler, K., Spekker, K. H. and MacKenzie, C. R.** (2009). Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial

cells. Indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase. *Thromb Haemost* **102**, 1110-6.

**Dauids, B. J., Reiner, D. S., Birkeland, S. R., Preheim, S. P., Cipriano, M. J., McArthur, A. G. and Gillin, F. D.** (2006). A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PLoS One* **1**, e44.

**De Ceuleneer, M., De Wit, V., Van Steendam, K., Van Nieuwerburgh, F., Tilleman, K. and Deforce, D.** (2011). Modification of citrulline residues with 2,3-butanedione facilitates their detection by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 1536-42.

**Denis, H., Deplus, R., Putmans, P., Yamada, M., Metivier, R. and Fuks, F.** (2009). Functional connection between deimination and deacetylation of histones. *Mol Cell Biol* **29**, 4982-93.

**Diamond, L. S., Harlow, D. R. and Cunnick, C. C.** (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**, 431-2.

**Dohmen, R. J.** (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 113-31.

**Dorval, V. and Fraser, P. E.** (2007). SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 694-706.

**Du, J. X., Bialkowska, A. B., McConnell, B. B. and Yang, V. W.** (2008). SUMOylation regulates nuclear localization of Kruppel-like factor 5. *J Biol Chem* **283**, 31991-2002.

**Duan, X., Trent, J. O. and Ye, H.** (2009). Targeting the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9 interaction for anti-cancer drug design. *Anticancer Agents Med Chem* **9**, 51-4.

**Eckmann, L.** (2003). Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* **25**, 259-70.

**Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F. and Gillin, F. D.** (2000). Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol* **164**, 1478-87.

**Edwards, M. R., Schofield, P. J., O'Sullivan, W. J. and Costello, M.** (1992). Arginine metabolism during culture of *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* **53**, 97-103.

**Elmendorf, H. G., Dawson, S. C. and McCaffery, J. M.** (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol* **33**, 3-28.

**Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J. and Pawley, J.** (1989). High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J Parasitol* **75**, 787-97.

**Esposito, G., Vitale, A. M., Leijten, F. P., Strik, A. M., Koonen-Reemst, A. M., Yurttas, P., Robben, T. J., Coonrod, S. and Gossen, J. A.** (2007). Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility. *Mol Cell Endocrinol* **273**, 25-31.

**Faubert, G., Reiner, D. S. and Gillin, F. D.** (1991). *Giardia lamblia*: regulation of secretory vesicle formation and loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Exp Parasitol* **72**, 345-54.

**Feely, D. E. and Erlandsen, S. L.** (1981). Isolation and purification of Giardia trophozoites from rat intestine. *J Parasitol* **67**, 59-64.

**Feely, D. E., Schollmeyer, J. V. and Erlandsen, S. L.** (1982). Giardia spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* **53**, 145-54.

**Fraser, D., Bilenko, N., Deckelbaum, R. J., Dagan, R., El-On, J. and Naggan, L.** (2000). Giardia lamblia carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clin Infect Dis* **30**, 419-24.

**Fraser, D., Dagan, R., Naggan, L., Greene, V., El-On, J., Abu-Rbiah, Y. and Deckelbaum, R. J.** (1997). 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* **57**, 544-9.

**Galkin, A., Kulakova, L., Sarikaya, E., Lim, K., Howard, A. and Herzberg, O.** (2004). Structural insight into arginine degradation by arginine deiminase, an antibacterial and parasite drug target. *J Biol Chem* **279**, 14001-8.

**Gallego, E., Alvarado, M. and Wasserman, M.** (2007). Identification and expression of the protein ubiquitination system in Giardia intestinalis. *Parasitol Res* **101**, 1-7.

**Garaude, J., Farras, R., Bossis, G., Charni, S., Piechaczyk, M., Hipskind, R. A. and Villalba, M.** (2008). SUMOylation regulates the transcriptional activity of JunB in T lymphocytes. *J Immunol* **180**, 5983-90.

**Garcia Penarrubia, P., Ferez Ruiz, X. and Galvez, J.** (2005). Quantitative analysis of the factors that affect the determination of colocalization coefficients in dual-color confocal images. *IEEE Trans Image Process* **14**, 1151-8.

**Gardner, T. B. and Hill, D. R.** (2001). Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* **14**, 114-28.

**Gareau, J. R. and Lima, C. D.** (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 861-71.

**Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-56.

**Gill, G.** (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-59.

**Gillin, F. D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S. B., Reiner, D. S., McCaffery, M., So, M. and Guiney, D. G.** (1990). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of Giardia lamblia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4463-7.

**Gillin, F. D., Reiner, D. S., Gault, M. J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A. and Sauch, J. F.** (1987). Encystation and expression of cyst antigens by Giardia lamblia in vitro. *Science* **235**, 1040-3.

**Gillin, F. D., Reiner, D. S. and McCaffery, J. M.** (1996). Cell biology of the primitive eukaryote Giardia lamblia. *Annu Rev Microbiol* **50**, 679-705.

**Girdwood, D. W., Tatham, M. H. and Hay, R. T.** (2004). SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 201-10.

**Goldman, A., Bosl, G., Johnson, K., Fraley, E. E. and Kennedy, B. J.** (1980). Prognostic factors in cancer of the testis: an approach to identification. *Cancer Treat Rep* **64**, 487-96.

**Gottig, N., Elias, E. V., Quiroga, R., Nores, M. J., Solari, A., Touz, M. C. and Lujan, H. D.** (2006). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*.

**Hashimoto, T., Nakamura, Y., Kamaishi, T., Nakamura, F., Adachi, J., Okamoto, K. and Hasegawa, M.** (1995). Phylogenetic place of mitochondrion-lacking protozoan, *Giardia lamblia*, inferred from amino acid sequences of elongation factor 2. *Mol Biol Evol* **12**, 782-93.

**Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Shirakura, T., Adachi, J., Goto, N., Okamoto, K. and Hasegawa, M.** (1994). Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* **11**, 65-71.

**Hashimoto, T., Sanchez, L. B., Shirakura, T., Muller, M. and Hasegawa, M.** (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6860-5.

**Hay, R. T.** (2001). Protein modification by SUMO. *Trends Biochem Sci* **26**, 332-3.

**Hehl, A. B., Marti, M. and Kohler, P.** (2000). Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. *Mol Biol Cell* **11**, 1789-800.

**Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., Svard, S. G., Meng, T. C., Que, X. and Gillin, F. D.** (1998). Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Exp Parasitol* **88**, 172-83.

**Hickey, C. M., Wilson, N. R. and Hochstrasser, M.** (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 755-66.

**Homan, W. L., Gilsing, M., Bentala, H., Limper, L. and van Knapen, F.** (1998). Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol Res* **84**, 707-14.

**Hopkins, R. M., Constantine, C. C., Groth, D. A., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. and Thompson, R. C.** (1999). PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology* **118 ( Pt 6)**, 531-9.

**Huang, Y. C., Su, L. H., Lee, G. A., Chiu, P. W., Cho, C. C., Wu, J. Y. and Sun, C. H.** (2008). Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* **283**, 31021-9.

**Ihara, M., Koyama, H., Uchimura, Y., Saitoh, H. and Kikuchi, A.** (2007). Noncovalent binding of small ubiquitin-related modifier (SUMO) protease to SUMO is necessary for enzymatic activities and cell growth. *J Biol Chem* **282**, 16465-75.

**Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N. et al.** (2005). Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **80**, 120-8.

**Issar, N., Roux, E., Mattei, D. and Scherf, A.** (2008). Identification of a novel post-translational modification in *Plasmodium falciparum*: protein sumoylation in different cellular compartments. *Cell Microbiol* **10**, 1999-2011.



- Itahana, Y., Yeh, E. T. and Zhang, Y.** (2006). Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2. *Mol Cell Biol* **26**, 4675-89.
- James, S. L.** (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* **59**, 533-47.
- Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., Coggins, J. R. and Erlandsen, S. L.** (1989). Giardia cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol* **32**, 121-31.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.
- Johnson, E. S.** (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82.
- Kelley, L. A. and Sternberg, M. J.** (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**, 363-71.
- Khorasanizadeh, S.** (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**, 259-72.
- Kim, J., Bae, S. S., Sung, M. H., Lee, K. H. and Park, S. J.** (2009). Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of Giardia lamblia. *Parasitol Res* **104**, 475-9.
- Kim, J. H., Lee, J. M., Nam, H. J., Choi, H. J., Yang, J. W., Lee, J. S., Kim, M. H., Kim, S. I., Chung, C. H., Kim, K. I. et al.** (2007). SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20793-8.
- Kim, K. I., Baek, S. H., Jeon, Y. J., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K. and Chung, C. H.** (2000). A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem* **275**, 14102-6.
- Klein, C. A., Droll, D. and Clayton, C.** (2013). SUMOylation in Trypanosoma brucei. *PeerJ* **1**, e180.
- Knodler, L. A., Noiva, R., Mehta, K., McCaffery, J. M., Aley, S. B., Svard, S. G., Nystul, T. G., Reiner, D. S., Silberman, J. D. and Gillin, F. D.** (1999). Novel protein-disulfide isomerases from the early-diverging protist Giardia lamblia. *J Biol Chem* **274**, 29805-11.
- Knodler, L. A., Schofield, P. J. and Edwards, M. R.** (1995). L-arginine transport and metabolism in Giardia intestinalis support its position as a transition between the prokaryotic and eukaryotic kingdoms. *Microbiology* **141 ( Pt 9)**, 2063-70.
- Korman, S. H., Le Blancq, S. M., Deckelbaum, R. J. and Van der Ploeg, L. H.** (1992). Investigation of human giardiasis by karyotype analysis. *J Clin Invest* **89**, 1725-33.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. and Yanagawa, H.** (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* **284**, 478-85.
- Kukuruzovic, R., Robins-Browne, R. M., Anstey, N. M. and Brewster, D. R.** (2002). Enteric pathogens, intestinal permeability and nitric oxide production in acute gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* **21**, 730-9.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D. Y. and Vierstra, R. D.** (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein

modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* **278**, 6862-72.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

**Lalle, M.** (2010). Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infect Disord Drug Targets* **10**, 283-94.

**Lalle, M., Jimenez-Cardosa, E., Caccio, S. M. and Pozio, E.** (2005). Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* **91**, 203-5.

**Landweber, L. F. and Katz, L. A.** (1998). Evolution: Lost worlds. *Trends Ecol Evol* **13**, 93-4.

**Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., de Carvalho, T. M., Kattenbach, W. M. and De Souza, W.** (1998). The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *J Struct Biol* **123**, 225-35.

**Lauwaet, T., Davids, B. J., Torres-Escobar, A., Birkeland, S. R., Cipriano, M. J., Preheim, S. P., Palm, D., Svard, S. G., McArthur, A. G. and Gillin, F. D.** (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* **152**, 80-9.

**Leach, M. D., Stead, D. A., Argo, E. and Brown, A. J.** (2011). Identification of sumoylation targets, combined with inactivation of SMT3, reveals the impact of sumoylation upon growth, morphology, and stress resistance in the pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **22**, 687-702.

**Liao, S., Wang, T., Fan, K. and Tu, X.** (2010). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is essential in cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Exp Cell Res* **316**, 704-15.

**Lin, B. C., Su, L. H., Weng, S. C., Pan, Y. J., Chan, N. L., Li, T. K., Wang, H. C. and Sun, C. H.** (2013). DNA topoisomerase II is involved in regulation of cyst wall protein genes and differentiation in *Giardia lamblia*. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2218.

**Liu, G. Y., Liao, Y. F., Chang, W. H., Liu, C. C., Hsieh, M. C., Hsu, P. C., Tsay, G. J. and Hung, H. C.** (2006). Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis* **11**, 183-96.

**Loftness, T. J., Erlandsen, S. L., Wilson, I. D. and Meyer, E. A.** (1984). Occurrence of specific secretory immunoglobulin A in bile after inoculation of *Giardia lamblia* trophozoites into rat duodenum. *Gastroenterology* **87**, 1022-9.

**Lois, L. M. and Lima, C. D.** (2005). Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *EMBO J* **24**, 439-51.

**Lujan, H. D.** (2011). Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Essays Biochem* **51**, 177-91.

**Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Byrd, L. G. and Nash, T. E.** (1996a). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7628-33.

**Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. and Nash, T. E.** (1995a). Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats.

Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem* **270**, 29307-13.

**Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T. and Nash, T. E.** (1996b). Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biol Cell* **86**, 11-8.

**Lujan, H. D., Mowatt, M. R. and Nash, T. E.** (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 294-304.

**Lujan, H. D. and Touz, M. C.** (2003). Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* **5**, 427-34.

**Lujan, H. J., Dries, D. J. and Gamelli, R. L.** (1995b). Comparative analysis of bedside and operating room tracheostomies in critically ill patients with burns. *J Burn Care Rehabil* **16**, 258-61.

**Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F.** (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107.

**Mahubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M. H., Schaefer, F. W., 3rd, Jakubowski, W. and Atlas, R. M.** (1992). Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* **30**, 74-8.

**Mailliard, M. E., Stevens, B. R. and Mann, G. E.** (1995). Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. *Gastroenterology* **108**, 888-910.

**Manning, P., Erlandsen, S. L. and Jarroll, E. L.** (1992). Carbohydrate and amino acid analyses of *Giardia muris* cysts. *J Protozool* **39**, 290-6.

**Margueron, R., Trojer, P. and Reinberg, D.** (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**, 163-76.

**Matunis, M. J. and Pickart, C. M.** (2005). Beginning at the end with SUMO. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 565-6.

**McGraw, W. T., Potempa, J., Farley, D. and Travis, J.** (1999). Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun* **67**, 3248-56.

**McIntyre, L., Hoang, L., Ong, C. S., Lee, P. and Isaac-Renton, J. L.** (2000). Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *J Parasitol* **86**, 172-7.

**McRoberts, K. M., Meloni, B. P., Morgan, U. M., Marano, R., Binz, N., Eriandsen, S. L., Halse, S. A. and Thompson, R. C.** (1996). Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *J Parasitol* **82**, 711-8.

**Melchior, F.** (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.

**Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Gunther, T., Buettner, R. and Schule, R.** (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**, 436-9.

**Meyer, E. A. and Radulescu, S.** (1979). *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* **17**, 1-47.

**Miura, K., Jin, J. B. and Hasegawa, P. M.** (2007). Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 495-502.

**Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A.** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-42.

**Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. and Ey, P. L.** (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* **16**, 1135-44.

**Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. and Ey, P. L.** (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* **3**, 29-38.

**Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J. et al.** (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**, 1921-6.

**Moscarello, M. A., Mastronardi, F. G. and Wood, D. D.** (2007). The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res* **32**, 251-6.

**Mowatt, M. R., Aggarwal, A. and Nash, T. E.** (1991). Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **49**, 215-27.

**Mowatt, M. R., Lujan, H. D., Cotten, D. B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T. E. and Stibbs, H. H.** (1995). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol* **15**, 955-63.

**Muller, N. and Gottstein, B.** (1998). Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol* **28**, 1829-39.

**Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 202-10.

**Nakai, K. and Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-6.

**Nash, T. E.** (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**, 1369-75.

**Nash, T. E.** (2001). Treatment of *Giardia lamblia* infections. *Pediatr Infect Dis J* **20**, 193-5.

**Nash, T. E.** (2002). Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol* **45**, 585-90.

**Nash, T. E. and Aggarwal, A.** (1986). Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *J Immunol* **136**, 2628-32.

**Nash, T. E., Aggarwal, A., Adam, R. D., Conrad, J. T. and Merritt, J. W., Jr.** (1988). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol* **141**, 636-41.

**Nash, T. E., Conrad, J. T. and Merritt, J. W., Jr.** (1990a). Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **42**, 125-32.

**Nash, T. E., Herrington, D. A., Levine, M. M., Conrad, J. T. and Merritt, J. W., Jr.** (1990b). Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J Immunol* **144**, 4362-9.

**Nash, T. E. and Keister, D. B.** (1985). Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis* **152**, 1166-71.

- Nash, T. E., Lujan, H. T., Mowatt, M. R. and Conrad, J. T.** (2001). Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect Immun* **69**, 1922-3.
- Nash, T. E., Merritt, J. W., Jr. and Conrad, J. T.** (1991). Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect Immun* **59**, 1334-40.
- Nash, T. E. and Mowatt, M. R.** (1992). 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* **51**, 219-27.
- Nino, C. A., Chaparro, J., Soffientini, P., Polo, S. and Wasserman, M.** (2013). Ubiquitination dynamics in the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen* **2**, 525-39.
- Notredame, C., Higgins, D. G. and Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**, 205-17.
- Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J. and Tanaka, K.** (2009). Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol* **50**, 1049-61.
- Orgovan, G. and Noszal, B.** (2011). The complete microspeciation of arginine and citrulline. *J Pharm Biomed Anal* **54**, 965-71.
- Palm, J. E., Weiland, M. E., Griffiths, W. J., Ljungstrom, I. and Svard, S. G.** (2003). Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J Infect Dis* **187**, 1849-59.
- Pan, M. and Stevens, B. R.** (1995). Protein kinase C-dependent regulation of L-arginine transport activity in Caco-2 intestinal cells. *Biochim Biophys Acta* **1239**, 27-32.
- Pan, Y. J., Cho, C. C., Kao, Y. Y. and Sun, C. H.** (2009). A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* **284**, 17975-88.
- Papanastasiou, P., Bruderer, T., Li, Y., Bommeli, C. and Kohler, P.** (1997). Primary structure and biochemical properties of a variant-specific surface protein of *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol* **86**, 13-27.
- Peattie, D. A., Alonso, R. A., Hein, A. and Caulfield, J. P.** (1989). 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* **109**, 2323-35.
- Peranzoni, E., Marigo, I., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Taschin, E., Mantelli, B., Bronte, V. and Zanovello, P.** (2007). Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* **212**, 795-812.
- Pereira, R. V., Cabral, F. J., de Souza Gomes, M., Jannotti-Passos, L. K., Castro-Borges, W. and Guerra-Sa, R.** (2012). Transcriptional Profile and Structural Conservation of SUMO-Specific Proteases in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol Res* **2012**, 480824.
- Perez, P. F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabenhans, C., Brassart, D., De Antoni, G. L. and Schiffrin, E. J.** (2001). Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli*: an in vitro study. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5037-42.

**Peroutka, R. J., Elshourbagy, N., Piech, T. and Butt, T. R.** (2008). Enhanced protein expression in mammalian cells using engineered SUMO fusions: secreted phospholipase A2. *Protein Sci* **17**, 1586-95.

**Piast, M., Kustrzeba-Wojcicka, I., Matusiewicz, M. and Banas, T.** (2005). Molecular evolution of enolase. *Acta Biochim Pol* **52**, 507-13.

**Pimenta, P. F., da Silva, P. P. and Nash, T.** (1991). 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* **59**, 3989-96.

**Ponder, E. L., Albrow, V. E., Leader, B. A., Bekes, M., Mikolajczyk, J., Fonovic, U. P., Shen, A., Drag, M., Xiao, J., Deu, E. et al.** (2011). Functional characterization of a SUMO deconjugating protease of *Plasmodium falciparum* using newly identified small molecule inhibitors. *Chem Biol* **18**, 711-21.

**Ponder, E. L. and Bogyo, M.** (2007). Ubiquitin-like modifiers and their deconjugating enzymes in medically important parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* **6**, 1943-52.

**Prucca, C. G. and Lujan, H. D.** (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* **11**, 1706-15.

**Reiner, D. S., Hetsko, M. L., Meszaros, J. G., Sun, C. H., Morrison, H. G., Brunton, L. L. and Gillin, F. D.** (2003). Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* **278**, 2533-40.

**Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X., Shaw, A., Wen, L., Yao, X. and Xue, Y.** (2009). Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* **9**, 3409-3412.

**Ringqvist, E., Palm, J. E., Skarin, H., Hehl, A. B., Weiland, M., Davids, B. J., Reiner, D. S., Griffiths, W. J., Eckmann, L., Gillin, F. D. et al.** (2008). Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol* **159**, 85-91.

**Rivero, M. R., Vranych, C. V., Bisbal, M., Maletto, B. A., Ropolo, A. S. and Touz, M. C.** (2010). Adaptor protein 2 regulates receptor-mediated endocytosis and cyst formation in *Giardia lamblia*. *Biochem J* **428**, 33-45.

**Roger, A. J., Svard, S. G., Tovar, J., Clark, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D. and Sogin, M. L.** (1998). 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* **95**, 229-34.

**Ropolo, A. S. and Touz, M. C.** (2010). A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *ScientificWorldJournal* **10**, 2019-31.

**Roskens, H. and Erlandsen, S. L.** (2002). Inhibition of in vitro attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. *J Parasitol* **88**, 869-73.

**Rosonina, E., Duncan, S. M. and Manley, J. L.** (2010). SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev* **24**, 1242-52.

**Rothenbusch, U., Sawatzki, M., Chang, Y., Caesar, S. and Schlenstedt, G.** (2012). Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport. *EMBO J* **31**, 2461-72.

**Saksouk, N., Bhatti, M. M., Kieffer, S., Smith, A. T., Musset, K., Garin, J., Sullivan, W. J., Jr., Cesbron-Delauw, M. F. and Hakimi, M. A.** (2005). Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* **25**, 10301-14.

**Salzman, A., Denenberg, A. G., Ueta, I., O'Connor, M., Linn, S. C. and Szabo, C.** (1996). Induction and activity of nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* **270**, G565-73.

**Sambrook, J. and Gething, M. J.** (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-5.

**Sautel, C. F., Cannella, D., Bastien, O., Kieffer, S., Aldebert, D., Garin, J., Tardieux, I., Belrhali, H. and Hakimi, M. A.** (2007). SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol Cell Biol* **27**, 5711-24.

**Savioli, L., Smith, H. and Thompson, A.** (2006). Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* **22**, 203-8.

**Scheschonka, A., Tang, Z. and Betz, H.** (2007). Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles? *Trends Neurosci* **30**, 85-91.

**Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M.** (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28**, 321-8.

**Seeler, J. S. and Dejean, A.** (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 690-9.

**Sehr, P., Zumbach, K. and Pawlita, M.** (2001). A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods* **253**, 153-62.

**Senshu, T., Akiyama, K., Kan, S., Asaga, H., Ishigami, A. and Manabe, M.** (1995). Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J Invest Dermatol* **105**, 163-9.

**Senshu, T., Sato, T., Inoue, T., Akiyama, K. and Asaga, H.** (1992). Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* **203**, 94-100.

**Shang, Q., Xu, C., Zhang, J., Zhang, X. and Tu, X.** (2009). Solution structure of SUMO from *Trypanosoma brucei* and its interaction with Ubc9. *Proteins* **76**, 266-9.

**Shirai, H., Blundell, T. L. and Mizuguchi, K.** (2001). A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanidino groups. *Trends Biochem Sci* **26**, 465-8.

**Singer, S. M., Elmendorf, H. G., Conrad, J. T. and Nash, T. E.** (2001). Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis* **183**, 119-24.

**Singer, S. M. and Nash, T. E.** (2000). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* **68**, 170-5.

**Slack, J. L., Jones, L. E., Jr., Bhatia, M. M. and Thompson, P. R.** (2011). Autodeimination of protein arginine deiminase 4 alters protein-protein interactions but not activity. *Biochemistry* **50**, 3997-4010.

**Slavin, I., Saura, A., Carranza, P. G., Touz, M. C., Nores, M. J. and Lujan, H. D.** (2002). Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **122**, 95-8.

- Smith, M. W., Aley, S. B., Sogin, M., Gillin, F. D. and Evans, G. A.** (1998). Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. *Mol Biochem Parasitol* **95**, 267-80.
- Smith, P. D., Keister, D. B. and Elson, C. O.** (1983). Human host response to *Giardia lamblia*. II. Antibody-dependent killing in vitro. *Cell Immunol* **82**, 308-15.
- Sogin, M. L., Gunderson, J. H., Elwood, H. J., Alonso, R. A. and Peattie, D. A.** (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**, 75-7.
- Solari, A. J., Rahn, M. I., Saura, A. and Lujan, H. D.** (2003). A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell* **27**, 329-46.
- Sonda, S., Morf, L., Bottova, I., Baetschmann, H., Rehrauer, H., Cafilisch, A., Hakimi, M. A. and Hehl, A. B.** (2010). Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol* **76**, 48-67.
- Stager, S. and Muller, N.** (1997). *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect Immun* **65**, 3944-6.
- Su, L. H., Pan, Y. J., Huang, Y. C., Cho, C. C., Chen, C. W., Huang, S. W., Chuang, S. F. and Sun, C. H.** (2011). A novel E2F-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* **286**, 34101-20.
- Sulaiman, I. M., Xiao, L. and Lal, A. A.** (1999). Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4431-5.
- Sullivan, W. J., Jr., Naguleswaran, A. and Angel, S. O.** (2006). Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol* **8**, 1850-61.
- Sun, C. H., McCaffery, J. M., Reiner, D. S. and Gillin, F. D.** (2003). Mining the *Giardia lamblia* Genome for New Cyst Wall Proteins. *J Biol Chem* **278**, 21701-8.
- Sun, C. H., Palm, D., McArthur, A. G., Svard, S. G. and Gillin, F. D.** (2002). A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol* **46**, 971-84.
- Sun, C. H., Su, L. H. and Gillin, F. D.** (2006). Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **146**, 45-57.
- Sun, H. and Crossland, W. J.** (2000). Quantitative assessment of localization and colocalization of glutamate, aspartate, glycine, and GABA immunoreactivity in the chick retina. *Anat Rec* **260**, 158-79.
- Sun, X. M. and Soutar, A. K.** (2003). The Transmembrane Domain and PXXP Motifs of ApoE Receptor 2 Exclude It from Carrying out Clathrin-mediated Endocytosis. *J Biol Chem* **278**, 19926-32.
- Tatham, M. H., Kim, S., Yu, B., Jaffray, E., Song, J., Zheng, J., Rodriguez, M. S., Hay, R. T. and Chen, Y.** (2003). Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry* **42**, 9959-69.
- Thompson, R. C.** (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* **30**, 1259-67.
- Thompson, R. C., Hopkins, R. M. and Homan, W. L.** (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* **16**, 210-3.
- Thompson, R. C. and Meloni, B. P.** (1993). Molecular variation in *Giardia*. *Acta Trop* **53**, 167-84.



- Thompson, R. C., Reynoldson, J. A. and Mendis, A. H.** (1993). Giardia and giardiasis. *Adv Parasitol* **32**, 71-160.
- Touz, M. C., Conrad, J. T. and Nash, T. E.** (2005). A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in Giardia lamblia. *Mol Microbiol* **58**, 999-1011.
- Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. and Lujan, H. D.** (2002). Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote Giardia lamblia. *J Biol Chem* **277**, 50557-63.
- Touz, M. C., Kulakova, L. and Nash, T. E.** (2004). 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* **15**, 3053-60.
- Touz, M. C., Lujan, H. D., Hayes, S. F. and Nash, T. E.** (2003). Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in Giardia lamblia requires a conserved tyrosine-based motif. *J Biol Chem* **278**, 6420-6.
- Touz, M. C., Ropolo, A. S., Rivero, M. R., Vranych, C. V., Conrad, J. T., Svard, S. G. and Nash, T. E.** (2008). Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of Giardia lamblia. *J Cell Sci* **121**, 2930-8.
- Triana, O., Galanti, N., Olea, N., Hellman, U., Wernstedt, C., Lujan, H., Medina, C. and Toro, G. C.** (2001). Chromatin and histones from Giardia lamblia: a new puzzle in primitive eukaryotes. *J Cell Biochem* **82**, 573-82.
- Tripathi, P.** (2007). Nitric oxide and immune response. *Indian J Biochem Biophys* **44**, 310-9.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P. and Zhang, Y.** (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-6.
- Tuttoren, A. E., Holm, A., Jorgensen, M., Stadtmuller, P., Rise, F. and Fleckenstein, B.** (2010). A technique for the specific enrichment of citrulline-containing peptides. *Anal Biochem* **403**, 43-51.
- Ulrich, H. D.** (2009). The SUMO system: an overview. *Methods Mol Biol* **497**, 3-16.
- Upcroft, J. A., Upcroft, P. and Boreham, P. F.** (1990). Drug resistance in Giardia intestinalis. *Int J Parasitol* **20**, 489-96.
- Van Venrooij, W. J., Vossenaar, E. R. and Zendman, A. J.** (2004). Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* **3 Suppl 1**, S17-9.
- Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M.** (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**, 137-42.
- Vossenaar, E. R., Nijenhuis, S., Helsen, M. M., van der Heijden, A., Senshu, T., van den Berg, W. B., van Venrooij, W. J. and Joosten, L. A.** (2003a). Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2489-500.
- Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J. and Pruijn, G. J.** (2003b). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* **25**, 1106-18.

**Wang, C. H., Su, L. H. and Sun, C. H.** (2007). A novel ARID/Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1 gene in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* **282**, 8905-14.

**Wang, J. and Chen, Y.** (2010). Role of the Zn(2+) motif of E1 in SUMO adenylation. *J Biol Chem* **285**, 23732-8.

**Wang, Y., Ladunga, I., Miller, A. R., Horken, K. M., Plucinak, T., Weeks, D. P. and Bailey, C. P.** (2008). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) and SUMO-conjugating system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **179**, 177-92.

**Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y. et al.** (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science* **306**, 279-83.

**Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, J. C., Franklin, C. and McKerrow, J. H.** (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* **89**, 437-44.

**Wielinga, C. M. and Thompson, R. C.** (2007). Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* **134**, 1795-821.

**Wu, G. and Morris, S. M., Jr.** (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **336** ( Pt 1), 1-17.

**Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y.** (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**, 483-95.

**Yee, J., Tang, A., Lau, W. L., Ritter, H., Delpont, D., Page, M., Adam, R. D., Muller, M. and Wu, G.** (2007). Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. *BMC Mol Biol* **8**, 26.

**Ying, S., Dong, S., Kawada, A., Kojima, T., Chavanas, S., Mechin, M. C., Adoue, V., Serre, G., Simon, M. and Takahara, H.** (2009). Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* **53**, 2-9.

**Yu, L. Z., Birky, C. W., Jr. and Adam, R. D.** (2002). The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot Cell* **1**, 191-9.

**Zhang, Y. Y., Aley, S. B., Stanley, S. L., Jr. and Gillin, F. D.** (1993). Cysteine-dependent zinc binding by membrane proteins of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* **61**, 520-4.

**Zinchuk, V., Zinchuk, O. and Okada, T.** (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem* **40**, 101-11.