



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización funcional de un canal de cloruro CLC de *Leishmania*

Michel Andrés García Otálora

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias
Biomédicas

Bogotá, Colombia.

2016

Caracterización funcional de un canal de cloruro CLC de *Leishmania*

Michel Andrés García Otálora

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

Directora de tesis:

M.D. Ph. D. María Marcela Camacho Navarro

Codirectora de tesis:

Ph.D. Martha Lucia Posada Buitrago

Línea de Investigación:

Canales de cloruro CLC en *Leishmania*

Grupo de Investigación:

Biofísica y Biología de Membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias
Biomédicas

Bogotá, Colombia.

2016

Agradecimientos

A todas las personas que me colaboraron durante estos años con sus ideas, apoyo, esfuerzo, dedicación, recomendaciones y formación: Prof. Marcela Camacho, Prof. Martha Posada, Prof. María del Pilar Gómez, Prof. Fernando Palomino, Prof. Enrico Nasi, Prof. María Helena Ramírez, Prof. John Sutachan, Prof. Yolima Torres, Prof. Walter Stühmer, Prof. Luis Pardo, Prof. Elisabetta Ullu (Q.E.P.D.) Prof. Manuel Alfonso Patarroyo, Prof. Jean Paul Vernot, Prof. Carlos Parra, Prof. María Clara Echeverry, Prof. María Adelaida Gómez, Prof. Carlos Clavijo, Prof. Daniel Calvo y Prof. Juan Bolivar.

A mis compañeros de doctorado y maestría: Yenny Lozano, Luis Contreras, Cristina Zapata, July Buitrago, Nicolás Quintero, Alejandra Viviescas, Aura Echeverri, Marvin Carreño, Oscar Parada, Lina García, Iván Navarrete, Abelino Vargas, Tomás Osorno, Carolina Ochoa, Ángela Rojas.

A las entidades que me abrieron sus puertas para realizar los experimentos: Centro Internacional de Física, Universidad Nacional de Colombia, Max Planck Institut für Experimentelle Medizin, Universidad del Rosario.

A las instituciones que me patrocinaron durante el curso del doctorado: Colciencias: Proyecto 521-201. Universidad Nacional: Código Hermes: 13041. Deutscher Akademischer Austauschdienst: Short-Term scholarship.

A la Profesora Camacho por permitirme vincularme a su grupo de investigación. Por mostrarme y vincularme a otros grupos de trabajo internacionales. Por ser una persona apasionada por su trabajo, su disciplina, constancia, perseverancia, respeto, paciencia y resiliencia. Por realizar ciencia en este país a pesar de las múltiples dificultades que se presentan. Por ser una mujer modelo para mí, digna de admirar, mil gracias.

A mi Profe, mentor, amigo, orientador, motivador. Por sus tantas charlas absolutamente fascinantes y por enseñarme miles de cosas más allá de la medicina. Por su rigurosidad y disciplina. Por estar allí siempre durante estos 12 años sin tener ninguna responsabilidad formal. Mi más profunda admiración, lealtad y respeto.

A Adriana Urbina, compañera admirable de laboratorio y trabajo. Por la maravillosa oportunidad que me brindó de vincularme como profesor en la Universidad del Rosario.

A mis tres mujeres de ayer: Alba, Darley y Elvia.

A mi familia, por la paciencia infinita y el abandono en que los tuve durante este tiempo: José, Shirley y Cata.

Al amor de mi vida y única responsable de haberle apostado a hacer un doctorado en Colombia :D

Resumen

Leishmania spp., abarca organismos unicelulares eucariota con un ciclo de vida caracterizado por dos grandes estadios (promastigote y amastigote) expuestos a diferencias de pH, osmolaridad y temperatura. Dados estos cambios, se espera que el parásito desarrolle mecanismos regulatorios para su supervivencia. Estudios previos en promastigotes han descrito bombas H⁺ ATPasas que generan un gradiente electroquímico útil para el transporte secundario de nutrientes (Zilberstein & Shapira, 1994), y que están acopladas a transportadores aniónicos (Vieira, Slotki, & Cabantchik, 1995; Vieira, Lavan, Dagger, & Cabantchik, 1994). Hasta el momento, se conoce poco respecto a la naturaleza molecular o al papel que desempeñan éstas moléculas en la fisiología de *Leishmania* spp., pero se ha observado que su inhibición, altera transporte de aminoácidos, volumen celular (Vieira, Lafuente, Gamarro, & Cabantchik, 1996), pH intracelular (Vieira et al., 1994), y potencial de membrana (Vieira et al., 1995).

Para iniciar el estudio de transportadores aniónicos en *Leishmania* el grupo de Biofísica y biología de membranas registró corrientes rectificadoras de salida, voltaje y Cl⁻ dependientes, inhibidas por ácido 4,4'- diisotiocianostilbeno- 2,2'-disulfónico (DIDS), luego de la microinyección de mRNA total poliadenilado de promastigotes estacionarios de *L. L. amazonensis* (Lagos, Moran, & Camacho, 2007) y *L. V. braziliensis* (Garzón, Stühmer, & Camacho, 2009) en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estas corrientes tienen características electrofisiológicas de canales de cloruro voltaje dependientes o CLC (por sus siglas en inglés). Así, se exploró el genoma de *L. V. braziliensis* encontrando cuatro secuencias codificantes para canales de cloruro que eran CLC putativas (Quintero, 2014; Parada, 2014; Carreño, 2015). La expresión ha sido verificada para tres de estos genes en promastigotes y para todos ellos en amastigotes in situ de *L. V. braziliensis* (Carreño, 2015). A la fecha LbCLC-A, LbCLC-B y LbCLC-C han sido clonados (Lozano Jiménez, 2012; Quintero, 2014; Parada, 2014).

Este trabajo se enfoca en la caracterización funcional de LbCLC-B. Esta proteína se detecta en estructuras puntiformes intracelulares en promastigotes de *L. V. braziliensis*. LbCLC-B posee localización diferencial respecto a LbCLC-A y LbCLC-C en promastigotes. Marcajes dobles (golgina 97-LbCLC-B) indican co-localización parcial con el Complejo de Golgi. Su patrón de expresión difiere dependiendo de la etapa del parásito, siendo puntiforme localizado perinuclear y perikinetoplástico en promastigotes en división e inmaduros, para volverse puntiforme distribuido en todo el citoplasma en promastigotes maduros. Se sugiere además que LbCLC-B es reclutada durante lesión celular por daño osmótico.

Inyección de cRNA LbCLC-B en ovocitos de *X. laevis* altera su volumen. Registros electrofisiológicos de voltage clamp con dos electrodos 48 horas post-inyección muestran corrientes rectificadoras de salida, voltaje dependientes que se incrementan a pH 5 y cuyo potencial de reversión es sub-nernstiano sugestivo de actividad como intercambiador. Se encontró evidencia de la participación de LbCLC-B en la regulación del volumen en promastigotes de *Leishmania* mediante ensayos de interferencia en la expresión. Se escogieron dos líneas de parásitos que presentaban alteraciones en el patrón de expresión de α -tubulina. En una de estas líneas se encontró una disminución regulatoria del volumen inducida en medio hipotónico sugestivo de interferencia. Con base en los hallazgos se propone que LbCLC-B estaría involucrado en la regulación del volumen.

Palabras clave: *Leishmania braziliensis*, canales de cloruro CLC, disminución regulatoria de volumen

Abstract

Leishmania spp., are unicellular eukaryotic organisms with a life cycle characterized by two major stages (promastigote and amastigote) exposed to differences in pH, osmolarity and temperature. Given these changes, it is expected that the parasite develop regulatory mechanisms for survival. Previous studies in promastigotes described H⁺ATPase pumps that generate an electrochemical gradient, useful for secondary transport of nutrients (Zilberstein & Shapira, 1994), coupled to anionic transporters (Vieira, Slotki, & Cabantchik, 1995; Vieira, Lavan, Dagger, & Cabantchik, 1994). Little is known about the molecular nature and the role of these molecules in the physiology of *Leishmania* spp., but it has been observed that their inhibition alters amino acid transport, cell volume (Vieira, Lafuente, Gamarro, & Cabantchik 1996), intracellular pH (Vieira et al., 1994), and membrane potential (Vieira et al., 1995).

To begin the study of anionic transporters in *Leishmania* our group recorded outward rectifying currents, voltage and Cl⁻ dependent, inhibited by 4'- diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonic acid (DIDS) after microinjection of total polyadenylated mRNA from stationary promastigotes of *L. L. amazonensis* (Lagos, Moran, & Camacho, 2007) and *L. V. braziliensis* (Garzón, Stühmer, & Camacho, 2009) in *Xenopus laevis* oocytes. These currents have electrophysiological characteristics of voltage dependent chloride channels or CLC. Thus, *L. V. braziliensis* genome was explored finding four putative coding sequences for CLCs (Quintero, 2014; Parada, 2014; Carreño, 2015). The expression has been verified for three of these genes in promastigotes and for all in in situ amastigotes of *L. V. braziliensis* (Carreño 2015). LbCLC-A, LbCLC- B and LbCLC-C have been cloned (Lozano-Jiménez, 2012; Quintero, 2014; Parada, 2014).

This work focused on the functional characterization of LbCLC-B. This protein was detected in punctate intracellular structures in *L. V. braziliensis* promastigotes. LbCLC-B location is different to LbCLC-A and LbCLC-C in *L. V. braziliensis* promastigotes. Double markings (golgin 97-LbCLC-B) indicate partial colocalization with the Golgi apparatus. Its expression pattern differs depending on the stage of the parasite, being punctate perinuclear and perikinetoplasmic in division and immature promastigotes, to become punctate distributed throughout the cytoplasm in mature promastigotes. It is further suggested that LbCLC-B is recruited during cell injury by osmotic damage.

Injection of cRNA LbCLC-B of *X. laevis* oocytes induces volume alteration. Two electrode recordings in voltage clamp after 48 hours of injection showed an outward rectifying current, voltage dependence at pH 5 with sub-Nernstian reversal potential suggestive of exchanger activity. Evidence of LbCLC-B participation in volume control in *Leishmania* promastigotes by interference tests was found. Two lines of parasites showing alterations in the pattern of expression of α -tubulin were chosen. In one of these lines regulatory volume decrease was found induced in hypotonic medium suggestive of interference. Based on the findings it is proposed that LbCLC-B would be involved in volume regulation.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, *CLC chloride channels*, *regulatory volume decrease*

Contenido

	Pag.
Introducción	3
1. Capítulo 1 Transporte de Cl⁻ y la familia CLC de <i>Leishmania</i>.....	7
1.1 Protón ATPasas en <i>Leishmania</i> spp.....	8
1.2 Regulación de volumen en <i>Leishmania</i> spp.	9
1.3 Transportadores aniónicos CLC	11
1.3.1 Proteínas CLC en mamíferos.....	12
1.3.2 Proteína CLC en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.3.3 Proteínas CLC en <i>Entamoeba histolytica</i>	15
1.3.4 Proteínas CLC en <i>Leishmania</i> spp.....	16
1.3.5 Complementación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con LbCLC-A y LbCLC-B..	19
1.3.6 Funciones putativas de las proteínas CLC en <i>Leishmania</i> spp.	20
1.3.7 RNA de interferencia en <i>Leishmania</i> spp.	20
2. Capítulo 2 En promastigotes LbCLC-B está localizado intracelularmente.....	23
2.1 Materiales y métodos	23
2.1.1 Cultivos celulares.....	23
2.1.2 Diseño de péptidos LbCLC-A, LbCLC-B, LbCLC-C y LbCLC-D.....	24
2.1.3 Modelamiento 3D de LbCLC-B y ubicación del péptido LbCLC-B seleccionado	27
2.1.4 Obtención de anticuerpos policlonales LbCLC-A, LbCLC-B y LbCLC-C	27
2.1.5 Extracción de proteínas totales (EPT) de promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i>	28
2.1.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (1D-SDS- PAGE).....	28
2.1.7 Western Blot para inmunodetección de proteínas.....	28
2.1.8 Inmunofluorescencias	29
2.1.9 Índice morfológico:.....	30
2.1.10 Ensayos de osmolaridad.....	31
2.1.11 Análisis estadístico y gráficas:	31
2.2 Resultados	32
2.2.1 La proteína LbCLC-B de <i>L. V. braziliensis</i> tiene un tamaño menor al predicho por análisis bioinformático.	32
2.2.2 LbCLC-A, LbCLC-B y LbCLC-C tienen localización diferencial en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i>	33
2.2.3 LbCLC-B tiene una distribución diferente dependiendo del estadio del promastigote	36
2.2.4 LbCLC-B colocaliza parcialmente con el Complejo de Golgi en promastigotes de <i>L.V. braziliensis</i>	37

2.2.5 LbCLC-B es reclutada durante el daño celular en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i>	39
3. Capítulo 3 LbCLC-B es voltaje dependiente y sensible a pH ácido.....	41
3.1 El modelo de <i>X. laevis</i> como sistema heterólogo.....	43
3.2 Materiales y métodos	43
3.2.1 Obtención y mantenimiento de ovocitos de <i>X. laevis</i> :	44
3.2.2 Registros electrofisiológicos en ovocitos de <i>X. laevis</i>	44
3.2.3 Producción de cRNA de LbCLC-A y LbCLC-B.....	46
3.2.4 Análisis estadístico y gráficas:	48
3.3 Resultados	48
3.3.1 Los ovocitos no inyectados (NIO) presentan corrientes de salida voltaje dependientes de baja amplitud.....	49
3.3.2 La inyección de h2EAG en Ovocitos (EAG) induce corrientes rectificadoras de salida voltaje dependientes de gran amplitud.....	50
3.3.3 Inyección de cRNA LbCLC-A induce corrientes voltaje dependientes.....	51
3.3.4 LbCLC-B induce corrientes de salida voltaje dependientes sensibles a pH ácido	53
4. Capítulo pSP72RaNeoGFP no es inocuo para promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i>	57
4.1 Materiales y métodos:	57
4.1.1 Amplificación y secuenciación de pSP.....	58
4.1.2 Electroporación de promastigotes.....	59
4.1.3 Curvas de crecimiento de promastigotes	59
4.1.4 Amplificación de gen NEO y GFP en promastigotes transformados con pSP	60
4.1.5 Cuantificación de intensidad de fluorescencia	61
4.2 Resultados	61
4.2.1 Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> electroporados con pSP son resistentes a geneticina y fluorescen.....	61
4.2.2 pSP altera la tasa de crecimiento de promastigotes <i>L. V. braziliensis</i>	62
4.2.3 pSP provoca interferencia de α -tubulina en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i>	63
4.2.4 pSP altera la disminución regulatoria de volumen (DRV) en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> ante retos osmolares severos.....	64
4.2.5 pSP no compromete la expresión de LbCLC-B.....	66
5. Capítulo Reducción del 13% en la expresión de LbCLC-b en promastigotes se asocia con cambios en regulación de volumen.....	68
5.1 Materiales y métodos	68
5.1.1 Generación de fragmentos interferentes contra LbCLC-B.....	68
5.2 Resultados	74
5.2.1 Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> transformados con plásmidos iC1 e iC3 tienen fluorescencia verde transitoria pero resistencia permanente a geneticina	74
5.2.2 Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> transformados con iC1 y iC3 presentan una tasa de crecimiento menor.	75
5.2.3 Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> transformados con iC1 e iC3 tienen un patrón de bandeos de α -tubulina diferente a pSP y WT	76
5.2.4 Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> transformados con iC3 tienen reducción del 13% en la expresión de LbCLC-B.....	76

5.2.5	Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> transformados con <i>iC3</i> tienen una respuesta alterada de decremento de volumen ante retos hipotónicos	77
5.2.6	A partir de DNA total proveniente de promastigotes transformados con <i>iC1</i> e <i>iC3</i> se pueden amplificar los genes de resistencia a neomicina y de fluorescencia verde 79	
6.	Capítulo Discusión	81
	<i>¿Por qué pierden la fluorescencia <i>iC1</i> e <i>iC3</i>?</i>	<i>86</i>
6.1	Implicaciones en un modelo biológico.....	88
7.	Conclusiones y recomendaciones	91
7.1	Conclusiones	91
7.2	Recomendaciones	92
	A. Anexo: Producción de la proteína completa LbCLC-B y generación de anticuerpos policlonales contra ella.....	95
	<i>Inducción de la proteína recombinante β galactosidasa en BL21 como control de expresión</i>	<i>98</i>
	<i>Inducción de la proteína recombinante LbCLC-B en BL21.....</i>	<i>101</i>
	<i>Generación de un fragmento amino terminal de 264 pares de bases de la proteína LbCLC-B e inducción de anticuerpos policlonales contra ella</i>	<i>109</i>
	<i>Comparativo secuencia N_264_LbCLC-A_A1</i>	<i>111</i>
	<i>Traducción del péptido teórico amino terminal LbCLC-A.....</i>	<i>113</i>
	<i>traducción del obtenido N_264_LbCLC-A_A1.....</i>	<i>113</i>
	<i>traducción del obtenido N_264_LbCLC-A_A2.....</i>	<i>114</i>
	<i>Traducción del obtenido N_264_LbCLC-A_A4.....</i>	<i>115</i>
B.	Anexo: Documentación anticuerpos	116
	<i>Documentación anticuerpo anti-LbCLC-A.....</i>	<i>116</i>
C.	Anexo: Inmunofluorescencias de promastigotes de <i>Leishmania</i> con distintos anticuerpos	125
D.	Secuencias desde el promotor T7 de los plásmidos pSGEM LbCLC-A y pSGEM-LbCLC-B	134
E.	Secuencia pSP72RaNeoGFP	137
	<i>Secuencia fragmento F1_R1</i>	<i>140</i>
	<i>Mapa y secuencia obtenida del plásmido pSP72RaneoaGFP_F1_R1_invertido empleado para obtener los clones <i>iC1</i> e <i>iC3</i>.....</i>	<i>141</i>
F.	Distribución intracelular de la proteína verde fluorescente en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> transformados con pSP	144
	Bibliografía	147

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	7
Figura 1-2: Árbol filogenético comparativo de diversos CLC.....	14
Figura 2-1: Alineamiento de péptidos diseñados contra los CLC putativos de <i>L. V. braziliensis</i>	26
Figura 2-2: Modelamiento 3D de LbCLC-B y localización del péptido usado para generar anticuerpo Anti-LbCLC-B.	27
Figura 2-3: Inmunodetección de LbCLC-B en extractos de proteína total de <i>L. V. braziliensis</i>	33
Figura 2-4: Determinación de la localización de la proteína LbCLC-A.....	34
Figura 2-5: Determinación de la localización de la proteína LbCLC-B.....	35
Figura 2-6: Determinación de la localización de la proteína LbCLC-C.	35
Figura 2-7: LbCLC-B tiene una distribución diferente dependiendo del estadio del parásito.	37
Figura 2-8: LbCLC-B colocaliza parcialmente con Complejo de Golgi en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i>	38
Figura 2-9: Colocalización de LbCLC-B con Complejo de Golgi es predominante entre núcleo y kinetoplasto.	39
Figura 2-10: LbCLC-B es reclutada durante el daño celular.....	40
Figura 3-1: Alineamiento de los CLC de <i>L. V. braziliensis</i>	42
Figura 3-2: Liberación de LbCLC-A y LbCLC-B a partir de p416_LbCLCA y p416_LbCLCB.	47
Figura 3-3: Subclonación de LbCLC-A y LbCLC-B en pSGEM y síntesis de cRNA de LbCLC-A y LbCLC-B.	48
Figura 3-4: Aspecto de ovocitos no inyectados e inyectados con h2EAG así como las corrientes generadas en función del gradiente de Cl ⁻ y voltaje empleados.....	50
Figura 3-5: Inyección de cRNA de LbCLC-A (CLC-A) y LbCLC-B (CLC-B), resulta en corrientes voltaje dependientes.	52
Figura 3-6: Inyección de cRNA de LbCLC-B (CLC-B), resulta en corrientes sensibles a pH ácido.	54
Figura 4-1: Plásmido pSP72RaneoαGFP.	59

Figura 4-2:	Promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> en suspensión no sometidos y sometidos a transformación con pSP.	62
Figura 4-3:	Curvas de crecimiento de promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> WT y electroporados con pSP.	63
Figura 4-4:	pSP reduce la expresión de α -tubulina en promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> . 64	64
Figura 4-5:	Cambios en el volumen de promastigotes de <i>L. V. braziliensis</i> ante distintos retos osmóticos.	66
Figura 4-6:	pSP vacío no reduce los niveles de LbCLC-B.....	67
Figura 5-1:	Diagrama del diseño experimental general empleado para generar fragmentos interferentes LbCLC-B. Modificado de (Atayde et al., 2012).....	70
Figura 5-2:	Generación de fragmentos dobles invertidos contra LbCLC-B.....	72
Figura 5-3:	Mapa de restricción de plásmidos iC1, iC2 e iC3.....	73
Figura 5-4:	Promastigotes <i>L.V. braziliensis</i> transformados con plásmidos iC1 y iC3 interferentes LbCLC-B.....	74
Figura 5-5:	Curvas de crecimiento comparativas entre promastigotes de <i>L.V. braziliensis</i> no transformados y transformados con pSP, iC1 e iC3.....	75
Figura 5-6:	Inmunodetección de α -tubulina en EPT de promastigotes de <i>Leishmania</i> no transformados y transformados con iC1 e iC3.....	76
Figura 5-7:	Promastigotes sometidos a transformación con iC3 muestran reducción del 13% en la expresión de LbCLC-B.....	77
Figura 5-8:	La disminución regulatoria de volumen está alterada en promastigotes transformados con iC3.	78
Figura 5-9:	Los promastigotes transformados con iC1 e iC3 tienen los genes de resistencia a neomicina y GFP.	79
Figura 6-1:	Sitio G oxidoreductor está presente en la secuencia LbCLC-B.....	88

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-A.....	25
Tabla 2-2: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-B.....	25
Tabla 2-3: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-C	25
Tabla 2-4: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-D	26
Tabla 2-5: Anticuerpos empleados para inmunofluorescencia.	29
Tabla 3-1: Soluciones usadas para registros electrofisiológicos.	45
Tabla 4-1: Anticuerpos para detección de GFP	58
Tabla 4-2: Condiciones de PCR para amplificación.	60
Tabla 4-3: Secuencias de cebadores NEO y GFP.	61
Tabla 5-1: Oligonucleótidos de interferencia específicos LbCLC-B.....	69

Introducción

Leishmania spp., comprende organismos unicelulares con un ciclo de vida caracterizado por dos grandes estadios. La forma flagelada o promastigote, habita en el intestino delgado de un flebótomo. Allí experimenta temperaturas de $24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, pH alcalino respecto al medio intracelular (Marchesini & Docampo, 2002) y 300 mOsm o más de osmolaridad (Lefurgey, Gannon, Blum, & Ingram, 2005). Durante el proceso de maduración, el parásito migra a la probóscide del insecto. Allí es inoculado en un hospedero mamífero como el humano y fagocitado por células mononucleares, como macrófagos, donde es confinado en una vacuola parasitófora (VP). Un compartimiento de características fagolisosomales (Antoine, Prina, Lang, & Courret, 1998). En la VP el promastigote se diferencia a amastigote y enfrenta una temperatura mayor, un pH externo ácido respecto al intracelular (pH 5) (Antoine, Prina, Jouanne, & Bongrand, 1990) y osmolaridad elevada (McConville, de, Saunders, Likic, & Naderer, 2007).

Cómo sobrevive *Leishmania* en condiciones ambientales tan cambiantes ha sido de interés, y el ion cloruro (Cl^-) y la función de transportadores aniónicos han sido incriminados en este proceso. Zilberstein y Dwyer describieron bombas protón ATPasas tipo P en membrana plasmática de promastigotes de *L. L. donovani*, las cuales generan un gradiente electroquímico de protones (Zilberstein & Dwyer, 1985), usado por el parásito para incorporar glucosa, prolina y otros aminoácidos de interés (Zilberstein & Dwyer, 1985). Vieira y colaboradores encontraron que remover Cl^- del medio extracelular generaba acidificación de los promastigotes de *L. L. major* y su restitución la revertía (Vieira *et al.*, 1995). El efecto de remover Cl^- pudo ser reproducido con la adición del inhibidor de transportadores aniónicos 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) (Vieira *et al.*, 1995) y difirió del efecto por bloqueo de la bomba H^+ -ATPasa que causa acidificación intracelular (Vieira *et al.*, 1995). Posteriormente se encontró que promastigotes de *L. L. major* expuestos a un medio pobre en Cl^- e hipotónico, presentaban disminución de las concentraciones intracelulares de aminoácidos e incremento en la tasa de expulsión de estos al medio extracelular (Vieira *et al.*, 1996). También se encontró que el uso de DIDS reducía este eflujo (Vieira *et al.*, 1996).

Lo anterior permite sugerir que Cl⁻ y transportadores aniónicos, desempeñan un rol en la regulación del pH intracelular, volumen celular y nutrición en *Leishmania spp.* Basados en esta evidencia, el grupo de Biofísica y Biología de membranas inició el estudio de canales de Cl⁻ en este parásito. Se registraron corrientes de salida, voltaje dependientes en ovocitos de *X. laevis* luego de la microinyección de *mRNA* total poliadenilado proveniente de promastigotes estacionarios de *L. L. amazonensis* (Lagos *et al.*, 2007) y *L. V. braziliensis* (Garzón *et al.*, 2009) cuya amplitud cambiaba conforme al gradiente de Cl⁻.

Las corrientes registradas se explicaron por la expresión de proteínas CLC. Así que se buscaron en el genoma de *L. V. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007), transportadores de Cl⁻ putativos. Se encontraron cuatro genes *Lb01.0210* (GI: 389600016), *Lb32.3670* (GI: 389602765), *Lb33.1260* (GI: 389602969) y *Lb04.1010* (GI: 389600188), que codificarían canales CLC putativos (Quintero, 2014; Parada, 2014; Carreño, 2015; Lozano Jiménez, 2012). Las secuencias traducidas fueron clasificadas como LbCLC-A (*LbrM01 V2.0210*), LbCLC-B (*LbrM32 V2.3670*), LbCLC-C (*LbrM33 V2.1260*) y LbCLC-D (*LbrM04 V2.1010*) con base en un árbol filogenético empleando el método de máxima probabilidad y comparando las secuencias con *EhCLC-A* de *Entamoeba histolytica*, el único CLC protozoario con análisis funcional (Salas-Casas *et al.*, 2006). La expresión ha sido verificada para tres de estos genes en promastigotes y para todos ellos en amastigotes *in situ* de *L. V. braziliensis* (Carreño, 2015). Igualmente, los *LbCLC-A*, *LbCLC-B* y *LbCLC-C* han sido clonados (Lozano-Jiménez, 2012; Quintero, 2014; Parada, 2014). No obstante, hasta el momento no se conoce la función que cumple LbCLC-B en la fisiología de *L. V. braziliensis*, o su interacción con las otras proteínas CLC en esta especie.

Considerando la evidencia previa que sugiere la importancia que desempeñan transportadores aniónicos en los procesos de nutrición, ajuste de pH intracelular, y regulación del volumen ante retos osmóticos en *Leishmania*, este trabajo buscó determinar la función que cumple la proteína LbCLC-B en promastigotes de *L. V. braziliensis*. Comprender cómo funciona LbCLC-B, puede ayudar a entender parte del proceso de adaptabilidad del parásito a los cambios en los ambientes que debe enfrentar

a lo largo de su ciclo de vida. Asimismo, este trabajo puede servir para postular alguna estrategia que permita combatir la leishmaniasis.

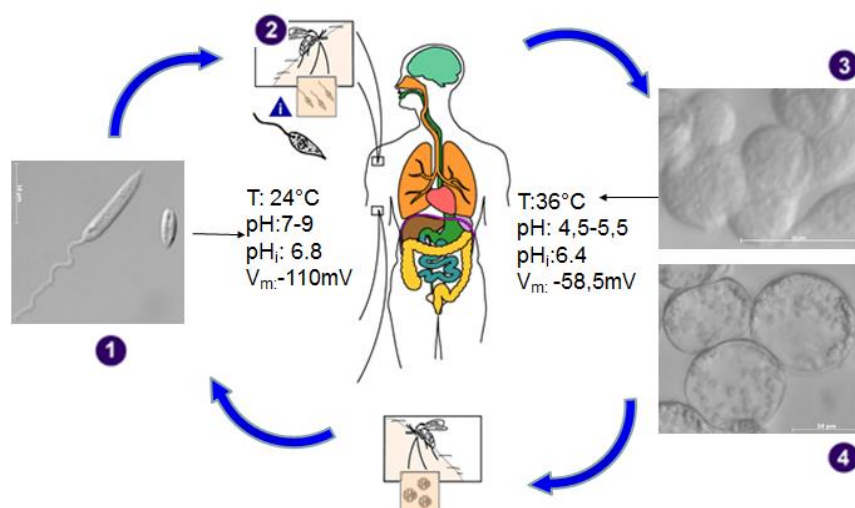
1. Capítulo 1 Transporte de Cl⁻ y la familia CLC de *Leishmania*

Leishmania spp., representa un conjunto de organismos unicelulares responsables de una zoonosis denominada leishmaniasis. Esta enfermedad afecta mamíferos causándoles distintas manifestaciones clínicas que comprometen piel, mucosas y tejido retículo endotelial (Pearson, Jeronimo, & de Sousa, 2001). A nivel mundial existen más de 350 millones de personas en riesgo de adquirir la infección (Kaye & Scott, 2011). En Colombia, leishmaniasis constituye un problema creciente de salud pública, ya que es una patología presente en casi todo el territorio nacional (Instituto Nacional de Salud, 2010). Hasta el momento no existe vacuna para controlar la enfermedad y los medicamentos empleados, además de ser de acceso restringido, han generado resistencia en el parásito y toxicidad en los pacientes (Kaye & Scott, 2011; Singh & Sundar, 2012).

Leishmania spp., presenta dos grandes estadios (Fig. 1-1). El promastigote que habita en el intestino de insectos hembras hematófagas (*Phlebotomus* y *Lutzomia*) (Pearson *et al.*, 2001). Allí experimentan temperaturas de $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$, osmolaridad que varía dependiendo de la dieta del hospedero (rica en azúcares y aminoácidos), y pH extracelular (pH_e) de 8 ± 1 (básico con respecto a su pH intracelular, pH_i , que es $6,75 \pm 0,02$) (Marchesini & Docampo, 2002). En el proceso de diferenciación en el intestino, desde promastigote procíclico a metacíclico, el parásito expresa una serie de glucoproteínas diferenciales en la membrana que le permiten ser infectivo (Kaye & Scott, 2011). Una vez maduro, es inoculado por la picadura del insecto en un hospedero mamífero, donde es endocitado por fagocitos mononucleares y confinado en una VP, experimentando diferenciación a amastigote (Pearson *et al.*, 2001). Allí, enfrenta temperaturas de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, un ambiente hiperosmolar rico en ácidos grasos y aminoácidos (McConville *et al.*, 2007; Camacho & Lozano, 2016) y pH_e $5,0 \pm 0,5$ (Antoine *et al.*, 1990) ácido respecto al parásito, ya que su pH_i es $6,4 \pm 0,05$ (Zilberstein & Shapira, 1994).

Figura 1-1: Ciclo de vida de *Leishmania spp.*

A la izquierda se encuentra la forma flagelada o promastigote (1) que habita en el intestino de un insecto hematófago (2), en donde experimenta las condiciones señaladas con la flecha negra hacia la derecha. T: temperatura; pH: externo pH_i: pH intracelular del promastigote; V_m: potencial de membrana del parásito. A la derecha se presentan macrófagos J774A.1 no infectados (3) que pertenecen al conjunto de células fagocíticas mononucleares capaces de fagocitar promastigotes. En (4) se observan macrófagos infectados con una gran vacuola parasitófora conteniendo amastigotes de *L. L. amazonensis*, al interior (formas redondas y ovaladas). La flecha negra hacia la izquierda, señala las condiciones que *Leishmania spp.*, experimenta en el interior vacuolar. Modificado de <http://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>



1.1 Protón ATPasas en *Leishmania* spp.

Se han descrito bombas H⁺ ATPasa tipo P en membrana plasmática de promastigotes de *Leishmania* spp., dependientes de Mg²⁺ con actividad óptima a pH de 6,5 (Vieira & Cabantchik, 1995; Vieira *et al.*, 1995; Zilberstein, 1993; Marchesini & Docampo, 2002). Éstas utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para expulsar H⁺ en contra de un gradiente electroquímico, generando una fuerza electromotriz para transporte secundario de glucosa (Zilberstein, 1993) y aminoácidos (Darlyuk *et al.*, 2009; Inbar *et al.*, 2012; Zilberstein & Shapira, 1994). Se ha implicado la presencia de transportadores aniónicos en estos parásitos, asociados a las bombas H⁺ ATPasas, ya que promastigotes

suspendidos en medio libre de Cl^- experimentan acidificación (0,3 unidades de pH_i). Bajo estas condiciones el gradiente electroquímico promueve la salida de Cl^- hacia el medio extracelular a través de proteínas transportadoras, junto con acidificación intracelular, por menor actividad de la H^+ ATPasa (Vieira *et al.*, 1995). La acidificación se intensifica en presencia del inhibidor de corrientes aniónicas DIDS (Vieira *et al.*, 1995), lo cual sustenta acople del transporte de Cl^- con la función de H^+ ATPasa. Los parásitos en medio libre de Cl^- , presentan además hiperpolarización (respecto al V_m observado en medio con Cl^-). Promastigotes expuestos a N,N-diciclohexilcarboimida (DCCD, inhibidor de H^+ ATPasa) o al desacoplador de H^+ , carbonilcianuro clorofenil hidrazona (CCCP), presentan acidificación significativa y despolarización de la membrana plasmática (Vieira *et al.*, 1995). Lo anterior sugiere la presencia de un gradiente de H^+ generado por la H^+ -ATPasa que requiere de la actividad en paralelo de un transportador de Cl^- para disipar el gradiente eléctrico generado por la bomba (Vieira *et al.*, 1995).

1.2 Regulación de volumen en *Leishmania spp.*

Las células animales, al igual que *Leishmania*, aumentan su volumen cuando son expuestas a ambientes hipotónicos, resultado de un incremento en el gradiente químico del agua en el exterior. Como mecanismo regulatorio para reducir el volumen ganado, liberan KCl, aminoácidos no esenciales y agua. Proceso denominado: disminución regulatoria de volumen (DRV) (Hoffmann, Lambert, & Pedersen, 2009). Por el contrario, en ambientes hipertónicos, en donde la fuerza química del agua extracelular se reduce, las células disminuyen su volumen debido a pérdida de agua, aumentando la concentración de osmolitos intracelulares. Por lo que eventualmente se genera elevación de la presión coloidosmótica intracelular que activa transportadores en la membrana plasmática, favoreciendo la acumulación de más osmolitos orgánicos, y con ello re-entrada parcial del agua perdida. Mecanismo llamado: incremento regulatorio de volumen (IRV) (Vieira *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2009).

Entre los osmolitos orgánicos empleados para regular volumen, los aminoácidos neutros desempeñan un rol relevante. En *L. L. donovani*, la actividad de cotransportadores K^+/Cl^-

es escasa (Blum, 1992), por lo que almacenan grandes cantidades de prolina, alanina y glutamato dentro de compartimentos especializados, denominados ácidocalcisomas y glicosomas (Zilberstein & Shapira, 1994; Docampo, de, Miranda, Rohloff, & Moreno, 2005). Estos aminoácidos, además de participar en ajustes de volumen ante cambios en la osmolaridad (Inbar *et al.*, 2012; Inbar *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 1996), actúan como fuente de carbono (Zilberstein, 1993).

La respuesta de *L. L. major* ante choque osmótico por modificación de la osmolaridad del líquido extracelular de 300 a 150 mOsm/L ha sido estudiada. Se ha observado un incremento modesto de su volumen celular (1,3 veces) (Vieira *et al.*, 1996). Posteriormente, se estableció que promastigotes de *L. L. donovani* toleraron gradientes osmóticos mayores, los cuales provocaron modificaciones más grandes de su volumen. Al exponer los parásitos a cambios hipotónicos 4 o 5 veces mayores, estos aumentaron entre 2 y 2,2 veces su tamaño sin alterar su viabilidad (Inbar *et al.*, 2013). Aun con estas condiciones hipotónicas extremas, la tasa de disminución regulatoria de volumen fue rápida y el volumen celular se redujo a aquel observado cuando se exponían a duplicación del cambio hipotónico (Inbar *et al.*, 2013).

Dentro de los mecanismos más relevantes de *Leishmania spp.*, para tolerar un reto osmótico, se han estudiado los transportadores de aminoácidos neutros. Se demostró por ejemplo, que *L. L. donovani* posee tres caminos distintos para movilizar prolina a través de su membrana (Mazareb, Fu, & Zilberstein, 1999). El sistema A, característico de promastigotes, dependiente de cationes con baja especificidad y afinidad por prolina (también moviliza alanina, arginina y glutamato) (Inbar *et al.*, 2013); el sistema B, propio de promastigotes, más selectivo e independiente de cationes. Y el sistema C, exclusivo de amastigotes, e independiente de cationes.

Estos mecanismos además de participar en regulación de volumen celular, abastecen las reservas intracelulares de prolina y alanina, al tiempo que regulan transporte y homeostasis de arginina y glutamato (Mazareb *et al.*, 1999). Mientras alanina es fundamental durante el edema celular, se necesita prolina para una recuperación efectiva

del volumen durante la respuesta de DRV. Por tanto, se ha propuesto que este tipo de transportadores de aminoácidos (Inbar *et al.*, 2013), junto con el citoesqueleto rígido del promastigote, constituyen los principales mecanismos responsables de la gran capacidad que tienen estos parásitos para soportar cambios de volumen extremos (Inbar *et al.*, 2013).

La activación de los transportadores de osmolitos orgánicos se acompaña de cambios en niveles de K^+ intracelular (Vieira *et al.*, 1996; Blum, Cabantchik, & Vieira, 1999), y este ajuste regulatorio de volumen puede ser bloqueado por DIDS. Lo que asocia estas moléculas en el proceso de regulación de volumen celular en *Leishmania* (Vieira *et al.*, 1996).

1.3 Transportadores aniónicos CLC

Los CLC están presentes desde bacterias a humanos (Jentsch, 2015). Se asocian con un amplio rango de funciones biológicas. Entre ellas están la polarización eléctrica, (Koch *et al.*, 1992), transporte de H_2O y sales en epitelios (Chen, 2005), o concentración de aniones (De Angeli *et al.*, 2006) (Novarino *et al.* 2010). Originalmente identificados como canales de Cl^- (White & Miller, 1979), las proteínas CLC se entienden ahora como dos subclases mecanísticamente distintas: canales de Cl^- voltaje dependientes (White & Miller, 1979) o intercambiadores anión/protón (Accardi & Miller, 2004). Si bien ambos rechazan en forma eficiente cationes y aniones multivalentes, son débilmente selectivos por aniones monovalentes pequeños como Cl^- , Br^- , I^- , y NO_3^- . Permeando a tasas típicamente dentro de un orden de magnitud entre sí (Miller, 2006). Sin embargo, F^- se desvía de este comportamiento, ya que su transporte a través de los canales CLC (Fahlke, 2001) y mayoría de intercambiadores CLC estudiados es indetectable (Maduke, Pheasant, & Miller, 1999), con excepción de la subfamilia descrita recientemente en procariotas (F^-/H^+) (Baker *et al.*, 2012) que muestra mayor selectividad por F^- respecto a Cl^- (Stockbridge *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista estructural los CLC forman homodímeros, cuyos monómeros albergan cada uno una región para el paso de Cl^- (Miller & White, 1984; Dutzler *et al.*, 2002). Electrofisiológicamente, los canales CLC son voltaje dependientes y tienen un comportamiento característico de apertura en ráfagas, con dos conductancias idénticas alrededor de 10 pS. Se destaca que la misma corriente de Cl^- que pasa por el canal es reguladora alostérica de la apertura del mismo (Dutzler *et al.*, 2002; Dutzler, 2006).

Por otra parte, estudios electrofisiológicos llevados a cabo por Accardi y Miller en uno de los CLC de *E. coli* (EcCLC-1), mostró que éste es un intercambiador $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$, pH dependiente (a mayor acidez, mayor corriente de Cl^-) (Accardi & Miller, 2004), y que existen dos glutamatos importantes en el mecanismo de acoplamiento del protón (Accardi *et al.*, 2005; Dutzler *et al.*, 2002). El E148 presente en el lado externo de la membrana, se ha denominado “glutamato de compuerta”. Mientras no se encuentre protonado, este E148 bloquea el paso del anión (Feng, Campbell, & Mackinnon, 2012). Mutaciones puntuales de este aminoácido por un residuo neutral demuestran pérdida de pH dependencia y del acoplamiento del H^+ (Accardi & Miller, 2004). El segundo glutamato, en la posición 203, denominado “glutamato del protón” o glutamato interno, está localizado cerca del lado intracelular. Se ha visto que al ser remplazado por valina en proteínas CLC intercambiadoras anión/ H^+ , estas quedan convertidas en canales (Accardi *et al.*, 2005). Una vez Cl^- entra en la proteína, es estabilizado por los residuos S107 y Y445 (Dutzler *et al.*, 2002). La sustitución de serina (S) por prolina (P) en AtCLCa hace esta proteína selectiva a NO_3^- más que a Cl^- (De Angeli *et al.*, 2006)

1.3.1 Proteínas CLC en mamíferos

Se han descrito nueve miembros, CLC-1 - CLC-7 (Jentsch, 2015). CLC-1 es un canal y se localiza en membrana plasmática de músculo estriado esquelético. Participa en los eventos de repolarización y estabilización del V_m (Koch *et al.*, 1992). CLC-2 también es canal, y tiene una amplia distribución en los tejidos. Su función se asocia con transporte transepitelial y homeostasis de iones extracelulares (Bosl *et al.*, 2001). CLCKa y CLCKb son canales y se expresan únicamente en riñón y oído. Son fundamentales para el transporte transepitelial (Jentsch, 2015). Por el contrario, los CLC 3-7, son

intercambiadores 2Cl⁻/H⁺ (Jentsch, 2015). CLC 3, 4 y 5, están localizados en endosomas tempranos (Jentsch, 2015), mientras CLC 6 y 7 tienen distribución en endosomas tardíos y lisosomas (Neagoe, Stauber, Fidzinski, Bergsdorf, & Jentsch, 2010; Leisle, Ludwig, Wagner, Jentsch, & Stauber, 2011).

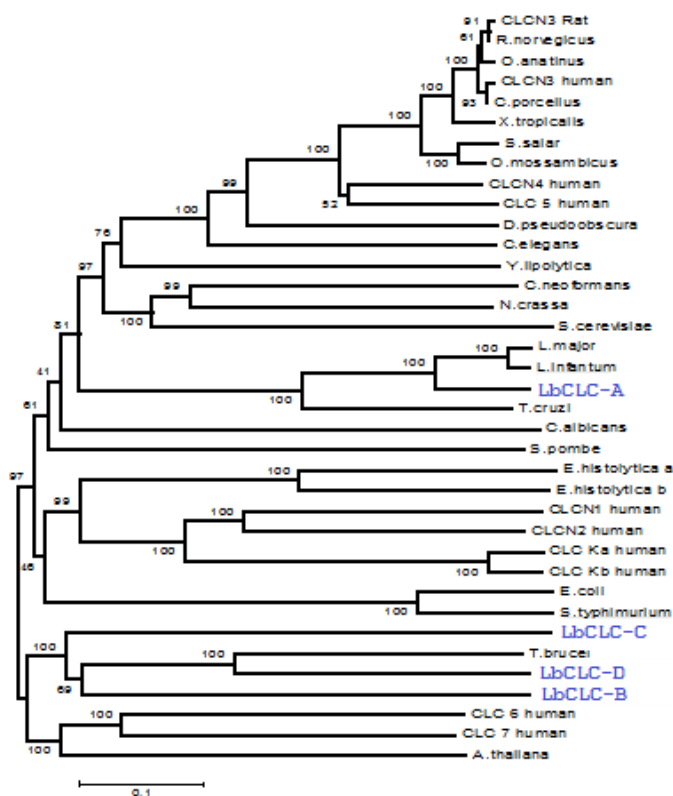
Se han sugerido dos mecanismos de acción para estos intercambiadores. En el primero, actuarían como shunt para el funcionamiento de una bomba a costa de disipar el gradiente electroquímico generado. Así una V-H⁺-ATPasa incorpora dentro del endosoma dos H⁺, haciendo que el interior gane dos cargas positivas, lo que inactiva la bomba. Para favorecer la acidificación, los intercambiadores CLC sacarían 1 H⁺ e ingresarían 2Cl⁻, permitiendo que el interior gane una carga negativa neta, reactivando la bomba (Lamb, Moreland, & Miller, Jr., 2009; Jentsch, 2007). El segundo mecanismo propuesto, que no sería excluyente, usaría el gradiente de H⁺ generado por la bomba para mover aniones en contra de su gradiente. Este modelo postula que la función del CLC operando en paralelo con la V-H⁺-ATPasa concentraría Cl⁻ a nivel intravesicular. En 2010 Novarino y colaboradores mostraron que la función del intercambiador CLC-5 contribuye con reabsorción de proteínas, sales y postularon que es la concentración de Cl⁻ la función asociada (Novarino, Weinert, Rickheit, & Jentsch, 2010).

En mamíferos, CLC-6 se expresa en cerebro, riñón, hígado y corazón (Poet et al., 2006); se ha localizado también en retículo endoplásmico de células COS y como proteína endosomal que colocaliza con Lamp-1, catepsina D, CLC-7 y la subunidad c de la ATP sintasa (Poet et al., 2006). CLC-6 se encuentra filogenéticamente más cerca de LbCLC-B (42% de identidad), (Fig. 1-2). En 2010 Neagoe y colaboradores reportaron que ovocitos de *X. laevis* expresando GFP fusionada a CLC-6 presentaron alcalinización con la despolarización (Neagoe et al., 2010). Esta alcalinización fue dependiente de la presencia de aniones extracelulares y se dio en contra de un gradiente electroquímico de protones (Neagoe et al., 2010). Asimismo, como se observó en otros intercambiadores CLC, el transporte de H⁺ mediado por CLC-6 se eliminó por mutaciones bien fuera en el glutamato de compuerta o del protón (Neagoe et al., 2010). Las mutaciones del glutamato de compuerta del CLC-6 produjeron una conductancia aniónica óhmica que se incrementó con la mutación adicional de la tirosina que coordina el anión (Y445 en EcCLC-1 de *E. coli*). Adicionalmente, los autores mostraron que reemplazar S157 que selecciona Cl⁻, por prolina, incrementó la conductancia por NO₃⁻ en este mutante. Con

todo lo anterior se concluyó que CLC-6 es un intercambiador Cl⁻/H⁺ (Neagoe et al., 2010). Más aún la sobreexpresión del CLC-6-GFP en células CHO desencadenó corrientes rectificadoras pequeñas de salida, con una secuencia de conductancia por Cl⁻ > I⁻ (Neagoe et al., 2010).

Figura 1-2: Árbol filogenético comparativo de diversos CLC

Se aprecian las distancias encontradas entre varias secuencias traducidas de los CLC de *L. V. braziliensis* (en azul) y otras especies. Basado en el algoritmo neighbor-joining (Programa MEGA 4. bootstrap 1000). Modificado de: (Lozano Jiménez, Posada, & Camacho, 2009)



Stauber y colaboradores determinaron los motivos de clasificación de los transportadores CLC endosomales/lisosomales (Stauber & Jentsch, 2010). Se emplearon proteínas de fusión con glutatión s-transferasas a los dominios citosólicos amino y carboxi terminales de todas las CLC intracelulares para comparar sus interacciones con clatrina, los adaptadores AP-1-4 y proteínas GGA (*Golgi-localized, gamma-ear containing, Arf binding*) (Stauber & Jentsch, 2010). Por ejemplo, AP-3 que media transporte hacia endosomas tardíos, interactuó específicamente con CLC-6 y CLC-7/Ost1, mientras que no hubo otra unión con otros CLCs que se localizaron en compartimentos endosomales tempranos o

en membrana plasmática (Leisle *et al.*, 2011). No se encontraron en LbCLC-B los dominios reportados por Stauber y colaboradores ni por Leisle y colaboradores.

1.3.2 Proteína CLC en *Saccharomyces cerevisiae*

Gef1 constituye su único CLC. Es un intercambiador putativo (Braun *et al.*, 2010) que se localiza en el Complejo de Golgi (Schwappach, Stobrawa, Hechenberger, Steinmeyer, & Jentsch, 1998) donde juega un papel importante en la ruta de transporte de hierro de alta afinidad (Gaxiola, Yuan, Klausner, & Fink, 1998). Este transporte en *S. cerevisiae* requiere de la oxidasa de hierro Fet3p que debe ser acoplada con cobre en el Golgi tardío para cumplir su función (Davis-Kaplan, Askwith, Bengtzen, Radisky, & Kaplan, 1998). La carga de cobre sólo puede hacerse en un ambiente ácido, por lo que se pensaba que la importancia de Gef1 estaba relacionada con mantener electroneutralidad del compartimento para facilitar el ingreso de cobre. Sin embargo, Cl⁻ actúa como factor alostérico para la asociación de hierro (Davis-Kaplan *et al.*, 1998). Estudios de complementación en *S. cerevisiae* revelaron que el gen silvestre o CLC de otros organismos como CLC-0 de *Torpedo marmorata*, AtCLCc, CLC-6 de humano (Kida, Uchida, Miyazaki, Sasaki, & Marumo, 2001) y AtCLCd de *Arabidopsis thaliana* (Gaxiola *et al.*, 1998), y AnCLCa del hongo *Aspergillus nidulans* (Oddon, Diatloff, & Roberts, 2007) lograron rescatar el fenotipo *knock out*.

1.3.3 Proteínas CLC en *Entamoeba histolytica*

EhCLC-A fue el primer canal de Cl⁻ caracterizado en protozoarios. Se segrega hacia los canales CLC-1 y 2 (Fig. 2). Se localiza en membrana plasmática de trofozoitos (Salas-Casas *et al.*, 2006). EhCLC-A induce corrientes voltaje dependientes en ovocitos de *X. laevis*, con un potencial de reversión cercano al potencial de equilibrio para Cl⁻. Se activa a pH ácido (5,6), en solución hipotónica, y sus corrientes son inhibidas por el 2,2, ácido disulfónico 4-acetamido-4'isotiocianatostilbeno (SITS), que además compromete el crecimiento de los trofozoitos (Salas-Casas *et al.*, 2006). Se sugirió que esta proteína presenta características similares a las descritas para CLC-2, en términos de la relación corriente-voltaje y selectividad iónica (Salas-Casas *et al.*, 2006). Estos resultados, apoyan la idea que EhCLC-A tiene un rol importante en la supervivencia de trofozoitos.

El segundo CLC de *E. histolytica*, EhCLC-B, ha sido menos estudiado. Se ha encontrado que al igual que CLC-K1 y CLC-K2 de mamífero tiene valina en vez del glutamato externo altamente conservado, sugiriendo que adicional a la falta de voltaje dependencia, esta proteína podría transportar Cl⁻ pero no H⁺ (Salas-Casas *et al.*, 2006).

1.3.4 Proteínas CLC en *Leishmania* spp.

Estudios electrofisiológicos previos con membranas plasmáticas de *L. L. mexicana* reconstituidas en bicapas lipídicas revelaron la presencia de corrientes de Cl⁻ (Difranco *et al.*, 1995). Esas corrientes mostraron ser fundamentales para la supervivencia del parásito, (Ponte-Sucre, Campos, Fernandez, Moll, & Mendoza-Leon, 1998) así como para el transporte de electrones mediado por enzimas de óxido-reducción (Bera *et al.*, 2005). Lagos y Garzón inyectaron *mRNA* total poliadenilado de *L. L. amazonensis* y *L. V. braziliensis* respectivamente, en ovocitos de *Xenopus laevis*. Encontrando tres tipos de corrientes de Cl⁻, una de las cuales no era endógena de ovocitos y parecía ser producto del material inyectado (Lagos *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009). Estas corrientes mostraron ser rectificadoras de salida, voltaje dependientes, con activación lenta y sin inactivación. El reemplazo del Cl⁻ extracelular por otros aniones, mostró permeabilidad relativa con una selectividad por I⁻ > Br⁻ > Cl⁻.

Al emplear inhibidores de canales de potasio como tetraetilamonio (TEA) y 4-aminopiridina (4-AP) se descartó el rol del K⁺ en la generación de estas corrientes estudiadas. Adicionalmente, se evidenció que las corrientes registradas se reducían cuando se empleaban bloqueadores de corrientes aniónicas como DIDS y ácido niflúmico. Finalmente, se mostró que los cationes divalentes extracelulares como Ca²⁺ tenían una contribución <10% en la amplitud de las corrientes de interés (Lagos *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009).

Lozano-Jiménez realizó análisis bioinformático buscando canales de Cl⁻ de la familia CLC, ya que se ajustaban a las características de los registros obtenidos en los ovocitos microinyectados (Lozano Jiménez, 2012). Se encontraron en el genoma de *L. V.*

braziliensis cuatro secuencias homólogas, a saber: *Lb01.0210* (GI: 389600016), *Lb04.1010* (GI: 389600188), *Lb32.3670* (GI: 389602765) y *Lb33.1260* (GI: 389602969), cuyas proteínas fueron denominadas: LbCLC-A (768aa), LbCLC-B (884aa), LbCLC-C (911aa) y LbCLC-D (1185aa) respectivamente. Esto, teniendo en cuenta su alineamiento con los CLC de *E. histolytica*. Lozano-Jiménez comparó las cuatro secuencias CLC de *L. V. braziliensis*, encontrando identidad de 16% entre LbCLC-A y LbCLC-B; 22% entre LbCLC-C y LbCLC-B y 28% entre LbCLC-C y LbCLC-D (Fig. 2).

- LbCLC-A

Lozano-Jiménez describió y caracterizó el gen *LbCLC-A* en *L. L. amazonensis*, *L. V. braziliensis* y *L. V. panamensis* (Lozano Jiménez, 2012), mostrando transcripción de este gen en promastigotes estacionarios. Usando un anticuerpo comercial anti-CLC-3 de mamífero, detectó fluorescencia perimembranal, en membrana plasmática, vesículas intracelulares y en el bolsillo flagelar de promastigotes (Lozano Jiménez, 2012) e identificó una banda única del peso esperado (87kDa) con otro anticuerpo comercial anti-CLC3/4/5 en extractos de proteína total de *L.L. amazonensis*, *L.V. braziliensis* y *L.V. panamensis*. Esta primera aproximación permitió sugerir que se expresaban proteínas CLC en el estadio promastigote (Lozano Jiménez, 2012).

Lozano-Jiménez clonó *LbCLC-A* en vectores de expresión y transfeció células HEK293. Los estudios electrofisiológicos de esta proteína mostraron corrientes rectificadoras de salida, voltaje dependientes, debidas al movimiento de Cl^- , e inhibidas por DIDS (Lozano Jiménez, 2012; Peinado, 2013). La amplitud de las corrientes detectadas por Lozano-Jiménez y Peinado fue pequeña y el potencial de reversión diferente al potencial de equilibrio de Cl^- sugiriendo permeabilidad a otro ion. Adicionalmente, Lozano-Jiménez evaluó el efecto del pH ácido y la osmolaridad sobre las corrientes registradas en células HEK293 pero no encontró variaciones significativas respecto a sus controles (Lozano Jiménez, 2012).

Por otra parte, Echeverri realizó mutaciones puntuales en el gen *LbCLC-A* (G179, E222, E278, D279 y Y547). Que en el intercambiador canónico *EcCLC-1* de *E. coli* corresponderían a: S107, E148, E202, E203 y Y445, respectivamente y que

están involucradas en la selección y acople del anión (Echeverri, 2014). Igualmente, Echeverri realizó estudios de *patch clamp* en configuración de célula entera de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con LbCLC-A encontrando corrientes rectificadoras de salida cuyo potencial de reversión también fue diferente del calculado para Cl⁻. Echeverri realizó además transfección en estas células del mutante LbCLC-A-E222A, observando disminución del volumen celular y luego de 72 horas pérdida de la viabilidad (Echeverri, 2014).

- LbCLC-C

Parada realizó análisis de la estructura de LbCLC-C sugiriendo que ésta proteína no es conservativa respecto a las otras proteínas CLC, especialmente en la región del filtro de selectividad (Parada, 2014). Asimismo, Parada clonó exitosamente el gen *LbCLC-C* que tiene una identidad <38% con CLC-6 y <36% con CLC-7 de mamífero (Fig. 2), y lo ligó en un vector de expresión con el que transfectó células CHO. Parada ejecutó registros de *patch clamp* en configuración de célula entera que no mostraron diferencias en las corrientes registradas entre células no transfectadas, transfectadas con el vector vacío y transfectadas con *pmEGFP-1+ LbCLC-C* a pH neutro (Parada, 2014). Sin embargo, registros piloto realizados por Parada mostraron corrientes rectificadoras de salida voltaje dependientes a pH 5,0 (Parada, 2014). Carreño reportó que la expresión del gen *LbCLC-C* aumenta en las primeras dos horas post-infección en macrófagos de la línea murina J774.A1 (Carreño, 2014).

- LbCLC-D

LbCLC-D tiene una identidad menor al 33% con CLC-6 y <43% con CLC-7 (Fig. 2). Hasta la fecha no se ha logrado clonar. Sin embargo, Carreño detectó un fragmento de 200 pb a partir de DNA genómico de promastigotes de *L.V. braziliensis* que no es detectado en cDNA de este mismo estadio. En contraste Carreño detectó un producto de 100 pb con cebadores específicos para este gen

de *Leishmania* en cDNA obtenido de macrófagos infectados a diferentes tiempos, indicando transcripción diferencial de *LbCLC-D* (Carreño, 2015).

- **LbCLC-B**

Quintero clonó el gen *LbCLC-B* a partir de promastigotes de *L. V. braziliensis*, al tiempo que determinó su expresión tanto en promastigotes, como en amastigotes axénicos de esta especie (Quintero, Lozano Jiménez, Posada, & Camacho, 2011). Quintero analizó por bioinformática el *LbCLC-B*, encontrando que se agrupaba con CLC-6/7 de mamífero (identidad <46% con el CLC-6 y < 32% con el CLC-7). Igualmente, realizó análisis de la estructura tridimensional de *LbCLC-B* aprovechando la estructura cristalográfica reportada de *EcCLC-1* de *E. coli* (Dutzler *et al.*, 2002) reportándolo como un intercambiador putativo CLC.

Quintero ligó *LbCLC-B* al vector *pcDNA3.1* y transfectó células CHO, encontrando localización predominantemente intracelular (Quintero *et al.*, 2011) y realizó marcaciones con un anti-CLC-6 de mamífero (Santa Cruz Biotechnology[®], Ref: 16440), detectando una proteína del peso esperado (97,5kDa) en la fracción enriquecida de membrana de promastigotes de *L. V. braziliensis* y fluorescencia en vesículas intracelulares (Quintero 2013)

1.3.5 Complementación en *Saccharomyces cerevisiae* con *LbCLC-A* y *LbCLC-B*

Considerando que CLC-6 complementa exitosamente el *Knock out Δgef1* (Kida *et al.*, 2001) y que *LbCLC-B* tiene una identidad cercana al 42% con ella, Viviescas evaluó la complementación en *S. cerevisiae* de los genes *LbCLC-A* y *LbCLC-B* en la línea *knock out Δgef1* (Viviescas, 2014). Viviescas realizó ensayos de crecimiento en tres medios de cultivo diferentes (con quelante de hierro, con fuente de carbono no fermentable y suplementado con sales) (Viviescas, 2014). Se encontró que en medios de cultivo con quelante de hierro y no fermentable, los controles positivos crecieron, mientras que las cepas transformadas con *LbCLC-A* no lo hicieron. Con *LbCLC-A* hubo crecimiento pobre pero mayor al control negativo. Con base en lo anterior, Viviescas concluyó que los genes *LbCLC-A* y *LbCLC-B* de *L. V. braziliensis* analizados no complementan la cepa *knock out Δgef1* (Viviescas, 2014).

1.3.6 Funciones putativas de las proteínas CLC en *Leishmania* spp.

Hasta el momento no se sabe el rol de ninguna de las proteínas CLC en *Leishmania* spp. Tampoco se conoce si se requiere de una proteína accesoria para su ensamble, como es el caso del CLC-7 (Leisle *et al.*, 2011). Los datos mostrados por Lozano-Jiménez indican que hay proteínas CLC en *L.V. braziliensis* en membrana plasmática, perimembranal y en bolsillo flagelar. LbCLC-A es voltaje dependiente, genera corrientes de amplitud baja que no cambian con el pH ni con cambios de osmolaridad (Lozano Jiménez, 2012). Quintero sugirió que LbCLC-B sería una proteína predominantemente intracelular y Parada mostró que LbCLC-C es pH dependiente. Como parte de las estrategias de caracterización de LbCLC-B se evaluó la vía de interferencia en *L. V. braziliensis*.

1.3.7 RNA de interferencia en *Leishmania* spp.

El RNA de interferencia (RNAi), descrito por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998), y vías relacionadas, desempeñan roles indispensables en la fisiología celular. Por ejemplo, regula niveles de mRNA y su traducción, silencia cromatina, rearregla DNA y es mecanismo de defensa contra virus (Lye *et al.*, 2010). En eucariota, algunos organismos tienen vías activas de RNAi, mientras que otros no. Más aún, la demostración de una vía de interferencia activa ha resultado difícil en algunas células, aun cuando poseen homólogos razonables de genes canónicos como argonauta (Lye *et al.*, 2010). Por las funciones de regulación que cumple el RNAi, se ha empleado como herramienta para analizar la función de múltiples genes.

En *Trypanosomatidae*, Ullu y colaboradores, demostraron la importancia de RNAi para silenciar retrotransposones, y en el remodelamiento de cromatina (Ullu, Tschudi, & Chakraborty, 2004). Asimismo, describieron la falta de una vía funcional en *T. cruzi*, y *Leishmania* del subgénero *Leishmania*, al tiempo que demostraron su presencia y funcionamiento en *T. brucei* y *Leishmania* subgénero *Viannia* (Lye *et al.*, 2010). La comparación de los mecanismos de RNAi en diferentes organismos sugiere que la

maquinaria mínima común está constituida por una endonucleasa *Dicer* de la familia de las RNasas III, que procesa RNAs largos de doble cadena en pequeños interferentes dobles de RNA (siRNA), con dos nucleótidos característicos de más en el extremo 3'; una endonucleasa *Argonauta* (AGO) que en conjunto con una cadena sencilla guía (ss) siRNA (opuesta a la cadena *pasajera* que es descartada), rompe el mRNA blanco; y un cofactor de *Dicer* con un dominio de unión a RNA de doble cadena, el cual facilita la biogénesis de siRNA y su carga en AGO. Finalmente, AGO-siRNA forman la maquinaria catalítica del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Lye *et al.*, 2010).

Se han descrito tanto en *T. brucei* como en *L.V. braziliensis* la presencia de dos factores de interferencia adicionales TbFIR 4 y 5. TbFIR5 es requerido para RNAi citoplasmático, más no nuclear, y parece actuar en conjunto con TbDCL1, endonucleasa similar a *Dicer* 1, a modo de cofactor. TbRIF4 contiene un dominio C-terminal relacionado con las exonucleasas de la superfamilia DNAQ 3'-5' y se encuentra implicado en la formación del complejo estable AGO1-siRNA, mediante la conversión de siRNAs dobles a cadena sencilla (Barnes, Shi, Kolev, Tschudi, & Ullu, 2012).

2. Capítulo 2 En promastigotes LbCLC-B está localizado intracelularmente.

A la fecha se han descrito dos patrones de localización para proteínas CLC en distintas especies. Aquellas que actúan como canales CLC tienen ubicación en membrana plasmática, por ejemplo: CLC-0, CLC-1 o CLC-2 (Jentsch, Stein, Weinreich, & Zdebik, 2002). En contraste, los intercambiadores están localizados intracelularmente en endosomas tempranos (CLC-3/4/5), endosomas tardíos o lisosomas (CLC-6/7), Complejo de Golgi (Gef1) o vacuola (AtCLC-a) (Jentsch, 2015). Por tanto, establecer la localización morfológica de LbCLC-B en promastigotes de *L.V. braziliensis*, permite postularle una función.

Se determinó la localización de LbCLC-B por inmunofluorescencia indirecta. Esto implicó la generación de un anticuerpo específico anti-LbCLC-B. Se clonó la secuencia completa del gen *LbCLC-B* en pET-101 para obtener la proteína recombinante y emplearla en la generación del anticuerpo así como para su reconstitución en bicapas lipídicas. Se logró el constructo pET-101-LbCLC-B pero no fue posible, por limitaciones atribuidas al sistema de expresión bacteriano, obtener la proteína recombinante (anexo 1). Se optó entonces por el diseño de péptidos para la generación de anticuerpos.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Cultivos celulares

Se emplearon promastigotes de *L. V. braziliensis* (HOM/BR/75/M2903) adquiridos en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM). Los

promastigotes crecieron en 10ml de medio Schneider Insecto (ref.: S0146 SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO), suplementado con suero fetal bovino (inactivado a 56°C) al 5% (ref.: S1810, Biowest, Kansas City, MO) e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ en flask de 25 cm² (ref.: Z707481, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). Los cambios de medio se realizaron cada 96 horas.

2.1.2 Diseño de péptidos LbCLC-A, LbCLC-B, LbCLC-C y LbCLC-D

Hasta antes de este trabajo no existían anticuerpos específicos para los cuatro CLC de *L. V. braziliensis*. Para obtenerlos, se diseñaron péptidos específicos para cada secuencia. Se empleó el software Bepipred que permite predecir en la secuencia de una proteína de interés las regiones con más hidrofiliidad, accesibilidad al solvente y antigenicidad. Esta información se cruzó con la predicción del plegamiento de las proteínas usando la opción TMHMM server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Se enviaron las secuencias de los cuatro CLC de *L. V. braziliensis* a GenScript, Prosci Inc. y Biosynthesis quienes sugirieron péptidos inmunogénicos. Se establecieron coincidencias entre las secuencias predichas con Bepipred y por las compañías en mención para escoger el péptido más inmunogénico. Teniendo en cuenta además que no detectaran otras proteínas en el genoma de *L. V. braziliensis* y en el de otros organismos mediante *Blast* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). El valor esperado (E) y la identidad fueron usados como criterios de selección.

Se seleccionaron los péptidos de la menor extensión posible. En el caso de los péptidos LbCLC-A y LbCLC-B, se eligió una secuencia de 15 aminoácidos (verde en Tablas 1 y 2 respectivamente). Para la proteína LbCLC-C se escogió un péptido de 18 aminoácidos (verde en Tabla 3) y para la proteína LbCLC-D uno de 14 aminoácidos (verde en Tabla 4).

Tabla 2-1: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-A.

Gen	AMINOÁCIDOS	Arranca y termina	Total	Mejor puntuación ≥ 0.6	Arranca y termina	Total	Ubicación membrana	N° Proteínas que reconoce en <i>L. braziliensis</i>
LbCLCA	MTEAGGSCGGNGVGGDDEA	1-19	19	NA	NA	NA	OUTSIDE	
	TIPSTTHSPYGEKRPAYS	55-72	18	NA	NA	NA	OUTSIDE	
	C-STTHSPYGEKRPAY	58		Prosci				2
	C-GAFPSYQOETKERE	238-252		Prosci				1
	C-MRVKEREENMEDDE	717		Prosci				1
	C-IEENKLPYLDPKKE	551		Genscript				1
	HTIPSTTHSPYGEK-C	54		Genscript				2
	CRFKTAPSNQDPNF	646		Genscript				1
	CLDFSADKVVYKQKF	567		Genscript				1
	CTTTASAVRATAHHR	755		Genscript				1
	CINFMRVKEREENME	714		Genscript				1
	CQVAAVNRDVLST	630		Genscript				1
	CRYAKFEGFISKDF	700		Genscript				1
	CAGEAVGVKGTIEIV	537		Genscript				1
	Cys-DRTTASAVRATAHHR	753-768	16	Biosynthesis				4
	CRWRKKHVQWRLAEV	354-369	16	Biosynthesis				2
	Cys-SGAFPSYQOETKERELIT	237-254	18	Biosynthesis				2
	Cys-EDDELEERERRELARORRRRE	726-746	21	Biosynthesis				61
	Cys-SGAFPSYQOETKERE	237-252	16	Sugerido 0210				1

Tabla 2-2: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-B

Gen	AMINOÁCIDOS	Arranca y termina	Total	Mejor puntuación ≥ 0.6	Arranca y termina	Total	Ubicación membrana	N° Proteínas que reconoce en <i>L. braziliensis</i>
LbCLCB	ARYGTAGSSGVLDTPSATCRRREADAA	3-29	27	GTAGSSGVLDTPSATCRRRE	6-25	20	INSIDE	
	DNEGNANDEADSVDGATDARSGSASEQASSE	736-766	31	ANDEADSVDGATDARSGSAS	741-760	20	OUTSIDE	
				DNEGNANDEADSVDGATDAR	736-755	20	OUTSIDE	
				SVDGATDARSGSASEQASSE	747-766	20	OUTSIDE	
	MSARYGTAGSSGVL-C	1		Genscript				3
	C-GNANDEADSVDGAT	739		Genscript				1
	C-DARSGSASEQASSE	753		Genscript				1
	RVSTTRQSQTDTOG-C	91		Genscript				1
	CVPTPQPTREKKEAL	467		Genscript				5
	CLGLRHLPVLDLRRQD	837		Genscript				2
	C-AFPVVRVGEADQTY	693		Genscript				1
	DTPSATCRRREAD	15		Prosci				3
	C-SFFDQFRNPRDGRD	291		Prosci				4
	CVPTPQPTREKKEA	466		Prosci				5
	CVPTPQPTREKKEALHVELF	466-485	20	Biosynthesis				12
	FEKAHRPHVFTAERRRMD	57-76	20	Biosynthesis				6
	Cys-ESLIQSHVTAADLKRVEF	766-784	19	Biosynthesis				2
	Cys-TDARSGSASEQASSE	752-766	16	sugerido				1

Tabla 2-3: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-C

Gen	AMINOÁCIDOS	Arranca y termina	Total	Mejor puntuación ≥ 0.6	Arranca y termina	Total	Ubicación membrana	N° Proteínas que reconoce en <i>L. braziliensis</i>
1260	QRYPNVSEAPPVNMGSSGRDTAHS	78-102	25	YPNVSEAPPVNMGSSGRDT	80-99	20	OUTSIDE	
				QRYPNVSEAPPVNMGSSGR	78-97	20	OUTSIDE	
				VSEAPPVNMGSSGRDTAHS	80-99	20	OUTSIDE	
EATTSALS	GDSSAQASGRADSNSSSSNGGADEHTPA	405-450	51	PVTDEATTSALS	405-424	20	OUTSIDE	
				TSSSSNGGADEHTPAVCRP	431-450	20	OUTSIDE	
				GRADSNSSSSNGGADEHT	426-445	20	OUTSIDE	
	GSYPDVGAAAGVYDAAPQEKALG	477-499	23	SYPDVGAAAGVYDAAPQEKGA	478-497	20	OUTSIDE	
				GSYPDVGAAAGVYDAAPQEK	477-496	20	OUTSIDE	
				PDVGAAGVYDAAPQEKALG	480-499	20	OUTSIDE	
	C-LYKDHLERSHEPR	16		Prosci				1
	C-DPTQRLRQERLHTD	779		Prosci				1
	MARYESVDTYAESC	1		Genscript				1
	CESQDSPHTDRVPS	856		Genscript				3
	NVMGSSGRDTAHSAC	90		Genscript				3
	CSSSSNGGADEHTPA	433		Genscript				1
	FVDHFRNPRDRRIVC	229		Genscript				4
	C-DPTQRLRQERLHTD	779		Genscript				1
	LYKDHLERSHEPRC	16		Genscript				1
	CPAGSYPDVGAAGV	474		Genscript				1
	CPVTDEATTSALSGD	405		Genscript				2
	Cys-SIDPTQRLRQERLHTDQV	777-794	18	Byosynthesis				1
	ESMLYKDHLERSHEPRWF-Cys	13-31	19	Byosynthesis				3
	CYHVHFDVHFRNPRDRRI	224-241	18	Byosynthesis				6
	Cys-SIDPTQRLRQERLHTDQV	777-794	18	Sugerido 1260				1

Tabla 2-4: Péptidos evaluados a partir de la proteína LbCLC-D

Gen	AMINOÁCIDOS	Arranca y termina	Total	Mejor puntuación ≥ 0.6	Arranca y termina	Total	Ubicación membrana	N° Proteínas que reconoce en <i>L. braziliensis</i>
LbCLCD	VENGNTSAAEGETRGRGISHSFEPGHHTPVSPPLPAE	1132-1168	37	NTSAAEGETRGRGISHSFEP	1136-1155	20	OUTSIDE	
				VENGNTSAAEGETRGRGISH	1132-1151	20	OUTSIDE	
				ISHSFEPGHHTPVSPPLPAE	1149-1168	20	OUTSIDE	
	C-DEDNKAMSPPTQPD	720		Prosci				5
	C-DHSQPHSDGDRNE	985		Prosci				1
	ANADSFTSPDADSG-C	96		Genscript				1
	C-DPSSSPSADPKVDP	1084		Genscript				1
	C-HSTKLGAGDASARP	743		Genscript				3
	C-HMPDGALNGAEVGA	868		Genscript				2
	C-AVPLTAKDSDGFGG	817		Genscript				1
	QASFESLDYYKPYP-C	53		Genscript				1
	VEYLREHEDRWHYTHG-Cys	70-87	18	Biosynthesis				3
	LGDHSQPHSDGDRNE-Cys	983-998	16	Biosynthesis				8
	LQAFRNKDRRDFIT	295-309	15	Biosynthesis				2
	DHSQPHSDGDRNE-Cys	985-998	14	Sugerido 1010				1

Adicionalmente, se comparó la especificidad de los cuatro péptidos generados con las secuencias proteicas LbCLC-A, LbCLC-B, LbCLC-C y LbCLC-D correspondientes, encontrando que solo existe identidad absoluta con las proteínas de interés (Fig. 3).

Figura 2-1: Alineamiento de péptidos diseñados contra los CLC putativos de *L. V. braziliensis*.

La cisteína observada en todos los péptidos (verde) fue adicionada por GenScript.

```

PEPTIDOLbCLCB  -----CTDARSGSASEQASSE----- 16
LbCLCB          NANDEADSVDGATDARSGSASEQASSESLIQSHVTAADLKRVEFVFWNRLPSIPMMEYL 799
LbCLCC          VEDHVFHSGWQSIDPTQRLRQERLHTDQVSLYPYVDTSAFTVLDTTSLPRTYEMFTTLGL 825
LbCLCD          HMPDGALNGAEVGAERTAFISESHLPPVLDLSLIVNRSWPVIPPFFNLQMTYHTFRMNGL 927
LbCLCA          -----FKTAPSNSQDPNFLEVNLTNVL E SCLLQVEPECSVKLLLYL F KSLGT 693
                *
PEPTIDOLbCLCA  C-----SGAFPSYQ QETKERE----- 16
LbCLCA          .CVGG-----IISGAFPSYQ QETKERELITAGAGGMAVAFGAPVGGVIFALED 278
LbCLCB          LIGAGLPTGRSRLRCSATSFDFQFR NPRDGRDFISAGAACGLTSAFSSPLGGMLFVME 332
LbCLCD          ITGAGVTQGRSRTLGFQTSLLQAFR NNKDRRDFITAGAACGVSVAFGAPIGGLLVVE 334
LbCLCC          MLGAQLLQRRHG-VRCYHVHFVDHFR NPRDRRIVLVIGAAAGIAAFCVSVGGLLVLEL 268
                *
PEPTIDOLbCLCC  C-----SIDPTQRLRQERLHTDQV----- 19
LbCLCC          .CTYDVMQRVEDHVFHSGWQSIDPTQRLRQERLHTDQVSLYPYVDT-----SAFTVLDTT 812
LbCLCD          LFFRTSDRYEWRTHMPDGALNGAEVGAERTAFISESHLPPVLDLSLIVNRSWPVIPPFF 914
LbCLCB          -----LPLSTI RSYIDLRPYVDSSAP-----YVQQGV 826
LbCLCA          -----YAKF EGFISKKDFINFMRVKE----- 713
                *
PEPTIDOLbCLCD  -----DHSQPHSDGDRNEC----- 15
LbCLCD          TRGMLGDHSQPHSDGDRNEMASVQLTRAGAHVNRGGTPLEFRNSANANGRAAASTWKSP 1038
LbCLCB          -VSFVGDRLMEKVGARAAGDFVDEWRR----- 884
LbCLCC          -KDLIGDHL SAVLESQDSPHTDRVPSSAVFAAAL TSLRKPFPHTTAQVSEVARQSSMSN 902
LbCLCA          --DFINFMRVKEREENMEDDELERERRELARQRRREAVATAVIDRTTASAVRATAHHR- 768

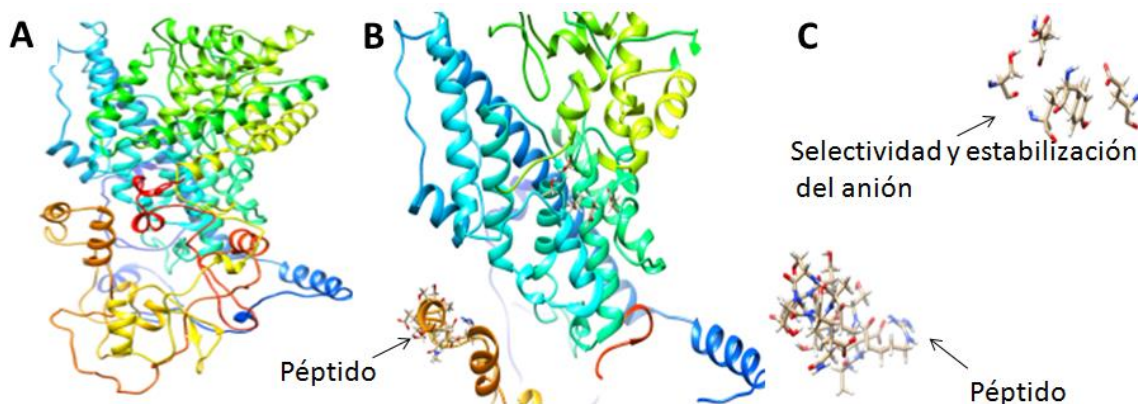
```

2.1.3 Modelamiento 3D de LbCLC-B y ubicación del péptido LbCLC-B seleccionado

Se modeló la estructura 3D de LbCLC-B desde el servidor I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; (Yang & Zhang, 2015), usando como plantilla *Cyanidioschyzon merolae* (Feng *et al.*, 2010) (Fig. 2-2A) para identificar la ubicación del péptido LbCLC-B seleccionado (Fig. 2-2B-C).

Figura 2-2: Modelamiento 3D de LbCLC-B y localización del péptido usado para generar anticuerpo Anti-LbCLC-B.

A-B) Estructura 3D de LbCLC-B modelada en el servidor I-Tasser usando como plantilla *Cyanidioschyzon merolae*. Se observa la estructura de un monómero. B) En acercamiento, ubicación estimada del péptido LbCLC-B. C) parte superior derecha: los residuos asociados con la selección y estabilización del anión (E: 263; S: 220; I: 222; E331; Y: 636). Parte inferior izquierda, ubicación de la secuencia peptídica escogida.



2.1.4 Obtención de anticuerpos policlonales LbCLC-A, LbCLC-B y LbCLC-C

Con las secuencias peptídicas seleccionadas, GenScript realizó síntesis de los péptidos acoplado una cisteína en el extremo amino o carboxilo para la conjugación con *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH). Los péptidos fueron luego inyectados en conejos (cepa Nueva Zelanda). Luego de 3 retos se recuperó suero de los animales y los anticuerpos

policlonales (anti-LbCLC-A, anti-LbCLC-B y anti-LbCLC-C) fueron purificados por cromatografía de afinidad (Anexo 3).

2.1.5 Extracción de proteínas totales (EPT) de promastigotes de *L. V. braziliensis*

Se utilizaron 1×10^7 promastigotes *L. V. braziliensis* que fueron recolectados por centrifugación a 1000g por 10 min. Se lavaron tres veces con PBS 1X frío y se sometieron a lisis utilizando el buffer RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Tritón X-100) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail, Roche®) por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 10.000 g por 20 min a 4°C.

2.1.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (1D-SDS-PAGE)

Los EPT fueron separados por electroforesis SDS-PAGE en cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). La preparación de las muestras se realizó mezclando un volumen del EPT con buffer de carga 1X denaturante (30mM Tris-HCl pH 6,8, 5% glicerol, 5,5% β -mercaptoetanol, 2% SDS y 0,01% azul de bromofenol) y calentamiento a 100°C por 5 min. Los EPT fueron separados con buffer de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina y 0,1% SDS), inicialmente a 80 V durante 15 min y luego a 150 V. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción del gel en solución de azul Coomassie

2.1.7 Western Blot para inmunodetección de proteínas

50 μ g de proteína, cuantificados por el método de ácido bicinonínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ref: 23225, Life Technologies™), fueron resuspendidos en buffer de carga 1X denaturante y separados por electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente, mediante transferencia húmeda en buffer (48 mM Tris, 39 mM glicina, 0,037% SDS y metanol 20% a pH 9,2), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, con un gradiente de potencial: 10 V - 10min, 20 V - 10min, 30 V - 10min, 40 V - 10 min, 50 V - 50 min. La membrana de nitrocelulosa y el gel se equilibraron previamente en buffer de transferencia durante 15 min. Posteriormente, la membrana se incubó una hora en buffer TBST-leche 5% (leche descremada 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween

20 0,05% V/V). Luego se incubó con 5 ug/ml de anticuerpo primario (Tabla 5) en TBST-leche 5% por cuatro horas a 4 °C. Se hicieron siete lavados en agua desionizada y uno en TBST x 10 min y se agregó un anticuerpo secundario x 1 h (Tabla 5). El anticuerpo secundario se retiró igual que el anticuerpo primario. Finalmente, la membrana se reveló por quimioluminiscencia utilizando el sustrato *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Life Technologies)

2.1.8 Inmunofluorescencias

2×10^5 promastigotes de *L.V. braziliensis* se depositaron sobre láminas previamente tratadas con poli-L-lisina (100 mM/PBS1X). Las células se fijaron con solución de formalina 1% durante 15 min a temperatura ambiente. Se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% en PBS1X (V/V) durante 15 min a 4 °C. El marcaje inespecífico se minimizó mediante adición de BSA 1% (P/V) en PBS1X (solución de bloqueo) por 1 h a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos primarios (Tabla 5) se realizó durante 16 h a 4 °C en solución de bloqueo (10 ug/ml). Se emplearon anticuerpos secundarios α -IgG acoplados a AlexaFluor® (10 ug/ml) incubándolos en oscuridad durante 1 h, a temperatura ambiente (Tabla 5). Dobles marcajes con un anticuerpo anti-tubulina de ratón (10 μ g/ml) o anti-golgina 97 (10 ug/ml) se realizaron para sugerir localización. DNA fue marcado con DAPI (1 ug/ml en PBS) durante 5 min a temperatura ambiente. Las láminas se cubrieron con medio de montaje Fluoromount-G (Life Technologies) y se visualizaron por microscopía de epifluorescencia en un microscopio Zeiss Axio observer A.1® (Zeiss, Alemania) o un microscopio Nikon eclipse Ni automático. Para todas las inmunofluorescencias reportadas se utilizaron como controles negativos promastigotes sin exposición al anticuerpo primario (incubados 16 horas en solución de bloqueo) más adición del anticuerpo secundario respectivo.

Tabla 2-5: Anticuerpos empleados para inmunofluorescencia.

Nombre	Tipo	[μ g/ml]	Referencia	Fabricante	Fuente
anti-LbCLC-A	Policlonal	10 μ g/ml	SC1031, 486611-4	GenScript®	Conejo
anti-LbCLC-B	Policlonal	10 μ g/ml	SC1031, 486611-5	GenScript®	Conejo

anti-LbCLC-C		Policlonal	10µg/ml	SC1031-509601-1	GenScript®	Conejo
anti-VATPasa-A1		Policlonal	10µg/ml	sc-31462	SantaCruz®	Cabra
anti-golgin-97(CDFX)		Monoclonal	10µg/ml	sc-59820	SantaCruz®	Ratón
anti-LAMP-1(c-20)		Policlonal	10µg/ml	sc-8098	SantaCruz®	Cabra
anti-LAMP-2(C-20)		Policlonal	10µg/ml	sc-8100	SantaCruz®	Cabra
anti-alfa-tubulina		Monoclonal	10µg/ml	322500	Invitrogen®	Ratón
goat anti-mouse AlexaFluor®488	IgG	Policlonal	10µg/ml	a21121	Life Technologies ^T _M	Cabra
goat anti-rabbit AlexaFluor®488	IgG	Policlonal	10µg/ml	a11008	Life Technologies ^T _M	Cabra
anti-Mouse Secondary Antibody, Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Policlonal	10µg/ml	A-21235	Life Technologies ^T _M	Cabra
anti-Rabbit Secondary Antibody, Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Policlonal	10µg/ml	A-21244	Life Technologies ^T _M	Cabra
anti-Goat Secondary Antibody, Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Policlonal	10µg/ml	A-21446	Life Technologies ^T _M	Conejo

2.1.9 Índice morfológico:

Se midió el diámetro longitudinal del promastigotes de *L. V. braziliensis* y se dividió entre su diámetro transversal. Se definió la presencia de un patrón puntiforme localizado perinuclear y perikinetoplástico cuando se observaron 4 o más imágenes puntiformes agrupadas, en tanto que se catalogó como puntiforme generalizado cuando se distribuía

en el citoplasma. Se realizó su medición en distintos campos excluyendo el flagelo. Patrón puntiforme generalizado (n: 41; mediana: 3,61, rango intercuartílico: 2,86-4,49) vs patrón puntiforme localizado (n: 58; mediana: 1,68, rango intercuartílico: 1,35-1,82).

2.1.10 Ensayos de osmolaridad

Se empleó el contador de partículas *Z2 Coulter Counter* (Beckman) para contar y determinar tamaño celular, con límites entre 3 y 8 μm . Un ml de promastigotes fue disuelto en la solución de interés hasta completar 10 ml, previo equilibrio a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$). La ganancia y ruido de fondo de la solución fueron determinados antes de las mediciones. 4000 promastigotes/ml fueron mezclados por rotación suave y, número y tamaño medidos a diferentes tiempos. Después de finalizar cada registro, se realizó lavado de la apertura por 5 min con PBS 1X estéril, antes de realizar la siguiente medición. De cada experimento se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas. A cada registro se le sustrajo el ruido de fondo de la solución, y posteriormente se ajustaron los datos para representar el valor numérico acumulativo. Se tomó el número de eventos reportados y la mediana de los mismos. Se realizó ANOVA de una vía de las medianas entre grupos empleando el *software* sigmastat 3.1 y se consideró significancia estadística con $p < 0,05$.

Se preparó una solución de 330 mOsm/L con (en mM): 137 NaCl; 4 KCl; 1,5 KH_2PO_4 ; 8,5 Na_2PO_4 ; 20 Hepes; 11 glucosa; 1 CaCl_2 ; 0,8 MgSO_4 y 7,4 pH). Se realizaron diluciones con agua desionizada para lograr osmolaridades finales de 300, 150, 70 y 60 mOsm/L. Se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se midió osmolaridad mediante un Vapro5600[®] (Wescor[®]). Se toleró un error de ± 2 mOsm/L por solución.

2.1.11 Análisis estadístico y gráficas:

Para la comparación de los índices morfológicos entre el patrón difuso y puntiforme se empleó la prueba de Mann-Whitney. Para la presentación de las gráficas se usó el *software* graphpad[®] 6.0. Se consideró que había significancia estadística cuando $p < 0,05$.

2.2 Resultados

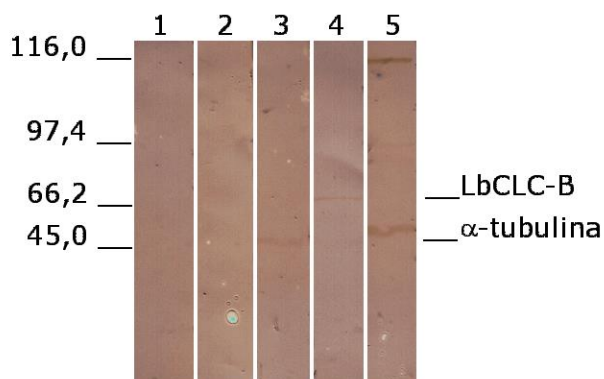
2.2.1 La proteína LbCLC-B de *L. V. braziliensis* tiene un tamaño menor al predicho por análisis bioinformático.

Para determinar que el anticuerpo anti-LbCLC-B es específico y detecta una banda única se realizó Western Blot a partir de EPT de promastigotes de *L.V. braziliensis* (Fig. 5). Los controles experimentales con exposición sólo a anticuerpos primarios (Fig. 5 Carril 1) o solo a anticuerpos secundarios (Fig. 5 carril 2) no mostraron banda alguna. En el carril 4 (Fig. 5) se identificó 1 banda entre 66,2 y 97,4 kDa que correspondería a LbCLC-B (aproximadamente 77kDa). En vista que dicha banda no aparece en el carril 3 en donde el anti-LbCLC-B fue preincubado con su péptido LbCLC-B. Los datos sugieren que el anticuerpo anti-LbCLCB reconoce una banda única en promastigotes. Además, se encontró que anti-LbCLC-B detecta dos bandas en EPT de HEK293 WT (Fig. 5 Carril 5). Una entre 97,4 kDa y 116,0 kDa y otra >116kDa. En los carriles 3, 4 y 5 se empleó α -tubulina como control de carga, detectándose una banda entre 45 y 66kDa, peso esperado (52 kDa) para esta proteína.

La identificación de una banda de 77 kDa comparada con lo predicho por el análisis bioinformático (peso estimado de 97 kDa), sugiere que la proteína LbCLC-B expresada in-vivo en los promastigotes tiene un peso molecular menor.

Figura 2-3: Inmunodetección de LbCLC-B en extractos de proteína total de *L. V. braziliensis*

EPT separados por electroforesis en SDS-PAGE y transferidos a membrana de nitrocelulosa 1-4: EPT de *L.V. braziliensis* WT. 1) Anticuerpo primario anti-LbCLC-B y anti- α -tubulina, sin adición de anticuerpos secundarios; 2) anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón, sin adición de anticuerpos primarios; 3) anti-LbCLC-B preincubado con péptido LbCLC-B (relación 1:5 respectivamente) y anti- α -tubulina, + anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón; 4) anti-LbCLC-B + anticuerpo secundario anti-conejo y anti- α -tubulina, + anticuerpo secundario anti-ratón; 5) EPT de HEK293 + anti-LbCLC-B, anti- α -tubulina, anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón.



Se realizaron *Western blots* similares empleando los anti- LbCLC-A y anti-LbCLC-C, comprobando que reconocen proteínas de tamaños distintos y cuya expresión se reduce con la adición de los péptidos respectivos (Zapata AC, comunicación personal).

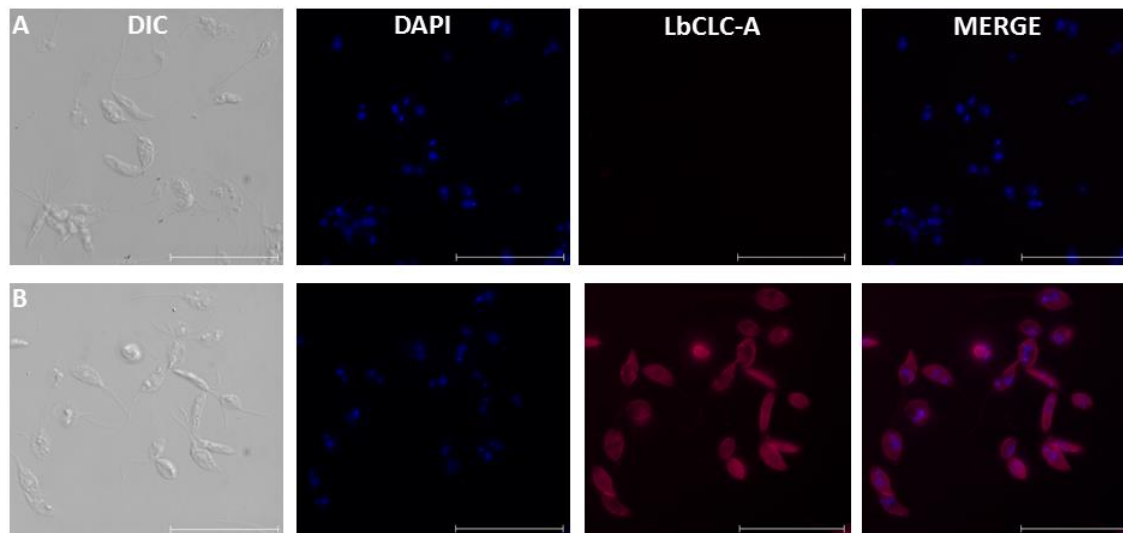
2.2.2 LbCLC-A, LbCLC-B y LbCLC-C tienen localización diferencial en promastigotes de *L. V. braziliensis*.

LbCLC-A tiene distribución predominante membranal, peri-membranal y en dos o tres compartimentos intracelulares bien definidos (Figura 2-4A control negativo; 6B marcaje LbCLC-A, video suplementario 1). Esta localización también se observa en promastigotes de *L. L. amazonensis* (Fig. A.3.1). Previamente se reportaron intercambiadores CLC-3 en células embrionarias de riñón humano (HEK293) (Matsuda et al., 2008). Inmunomarcaje de HEK293 empleando el anti-LbCLC-A (figura A.3.2) reveló señal fluorescente en estructuras próximas a membrana plasmática, distribución vesicular en citoplasma y

ausencia de marcaje en núcleo. Corroborando que existe reactividad cruzada de LbCLC-A con el CLC de HEK-293 y compatible con la localización celular esperada en esta línea.

Figura 2-4: Determinación de la localización de la proteína LbCLC-A.

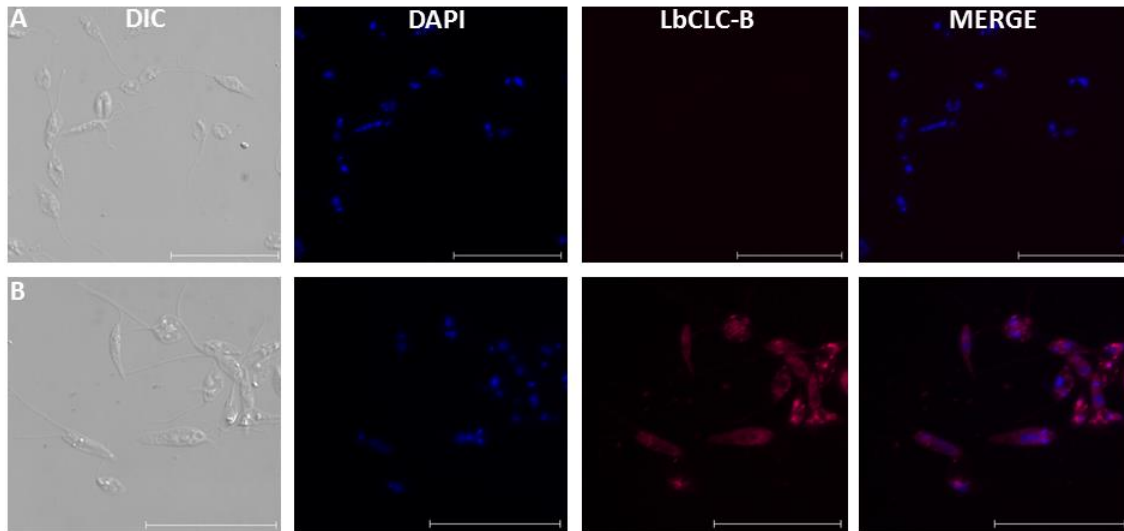
A Control negativo. B) Marcaje con el anti-LbCLC-A. Las líneas representan 20 um.



LbCLC-B, presenta un patrón intracelular puntiforme (Fig. 2-5B, video suplementario 2). Este tipo de marcaje se observa también en promastigotes de *L. L. amazonensis*, con intensidad menor (Fig. A.3.3). La inmunofluorescencia empleando un anti-CLC-6 de mamífero reveló un patrón similar en estos promastigotes (Fig. A.3.4). En HEK293 WT se identificó un marcaje intracelular muy abundante alejado de ácidos nucleicos (Fig. A.3.5).

Figura 2-5: Determinación de la localización de la proteína LbCLC-B.

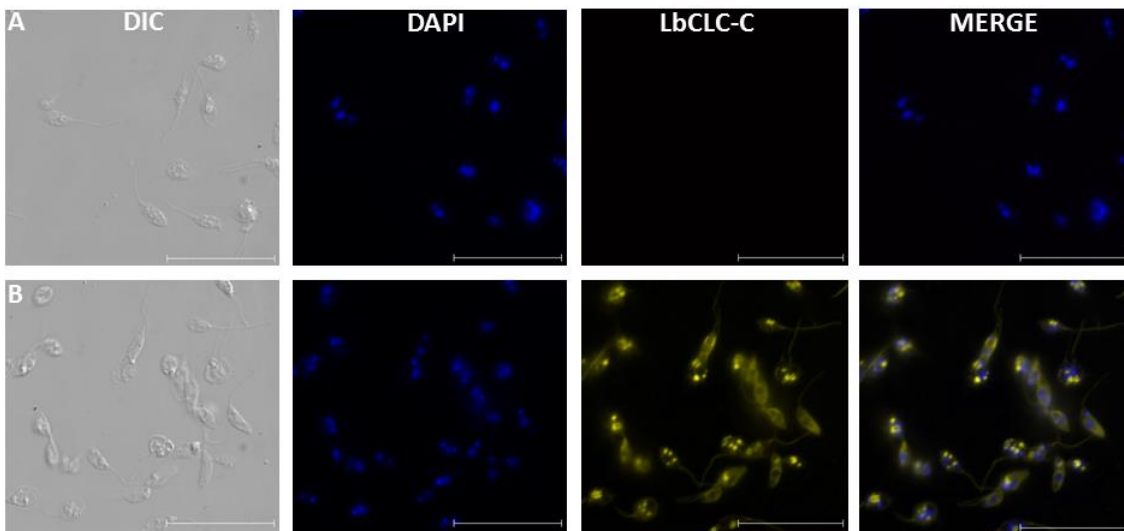
A Control negativo. B) Marcaje con el anti-LbCLC-B. Las líneas representan 20 um.



LbCLC-C es intracelular, localizada en tres o cuatro compartimentos discretos de mayor tamaño que los detectados en LbCLC-B, especialmente en parásitos con formas redondeadas o en división (Fig. 8B, video suplementario 3). En promastigotes de *L. L. amazonensis* se identificó un patrón de marcaje similar (Fig. A.3.3). Las células HEK293 WT marcadas con este anticuerpo revelaron un patrón de predominio en zonas próximas a membrana plasmática de mayor intensidad (Fig. A.3.5).

Figura 2-6: Determinación de la localización de la proteína LbCLC-C.

A Control negativo. B) Marcaje con el anti-LbCLC-C. Las líneas representan 20 um.



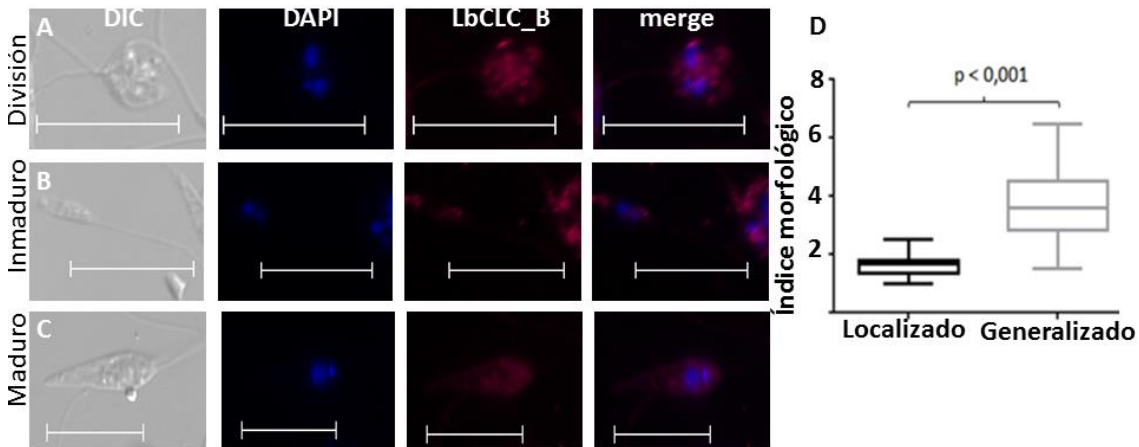
2.2.3 LbCLC-B tiene una distribución diferente dependiendo del estadio del promastigote

Aquellos promastigotes en división, con dimensión longitudinal cercana a 6 μm presentan distribución puntiforme predominante en cisterna perinuclear, con regiones de alta fluorescencia (Fig. 2-7A). Los promastigotes inmaduros, con una longitud promedio de 14 μm , presentan una distribución hacia los extremos y puntiforme alejándose del núcleo, y la base del flagelo (Fig. 2-7B). Por el contrario, los promastigotes maduros (más grandes y elongados), con una longitud superior a 18 μm tienen un patrón de distribución puntiforme en todo el citoplasma (Fig. 2-7C).

Para corroborar que los promastigotes más pequeños y en división tienen un patrón puntiforme perinuclear y los más grandes tienen un patrón puntiforme en todo el citoplasma, se calculó el índice morfológico (IM) como criterio de maduración (Fig. 9D). Aquellas células con IM menor a 2 presentan un patrón puntiforme localizado, en tanto que las células con IM mayor a 2,5 tienen distribución citoplasmática ($p < 0,001$). Entre IM de 2,0 a 2,5 se observaron ambas distribuciones. Lo anterior, sugiere que el patrón de fluorescencia de LbCLC-B cambia en los varios estadios analizados.

Figura 2-7: LbCLC-B tiene una distribución diferente dependiendo del estadio del parásito.

A) Promastigotes de *L.V. braziliensis* en división. B) promastigote inmaduro; C) promastigote maduro. Las líneas denotan 10 μm . D) Diagrama de caja y bigotes comparativo del índice morfológico entre los promastigotes de *L.V. braziliensis* que presentaron patrón puntiforme generalizado vs patrón puntiforme localizado.

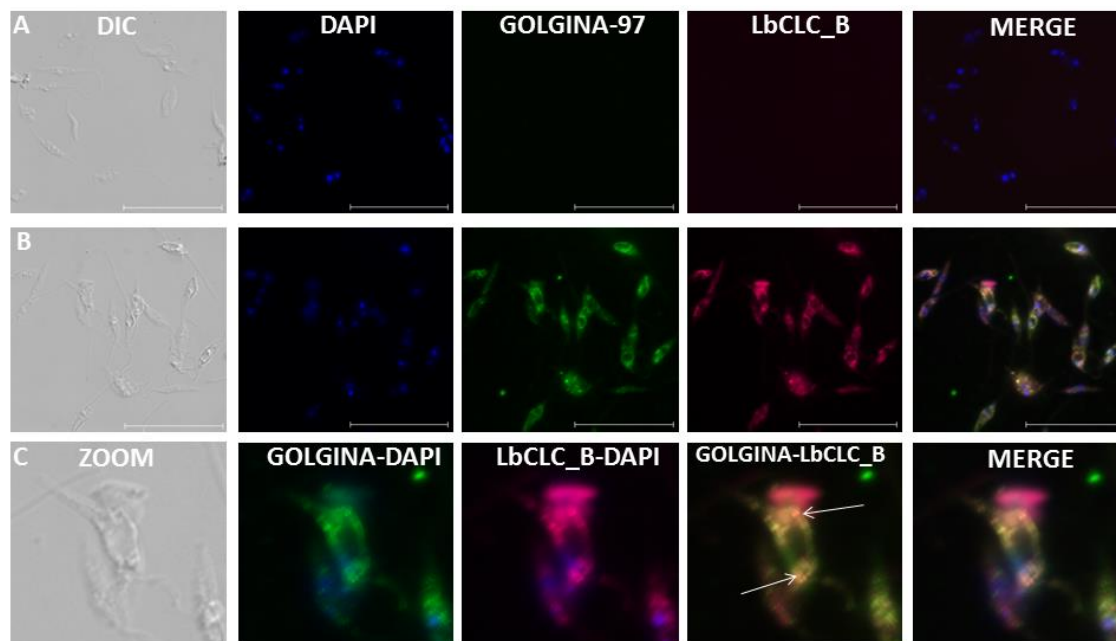


2.2.4 LbCLC-B colocaliza parcialmente con el Complejo de Golgi en promastigotes de *L.V. braziliensis*

Con el patrón de distribución puntiforme localizado perinuclear y perikinetoplástico de LbCLC-B, se propuso colocalizarla con Golgina 97, proteína periférica asociada a la hemicapa citosólica de la membrana del Golgi (Fig. 2-8). Golgina 97 (verde) tiene una distribución netamente intracelular, con gran concentración a nivel perinuclear (Fig. 2-8B y 10C) en promastigotes *L.V. braziliensis*. Notar que LbCLC-B (magenta) tiene un patrón similar (Fig. 2-8B y 2-8C). La superposición de imágenes (Fig. 2-8B y C merge), evidenció colocalización parcial de ambas proteínas en región perinuclear y bolsillo flagelar (flechas).

Figura 2-8: LbCLC-B colocaliza parcialmente con Complejo de Golgi en promastigotes de *L. V. braziliensis*.

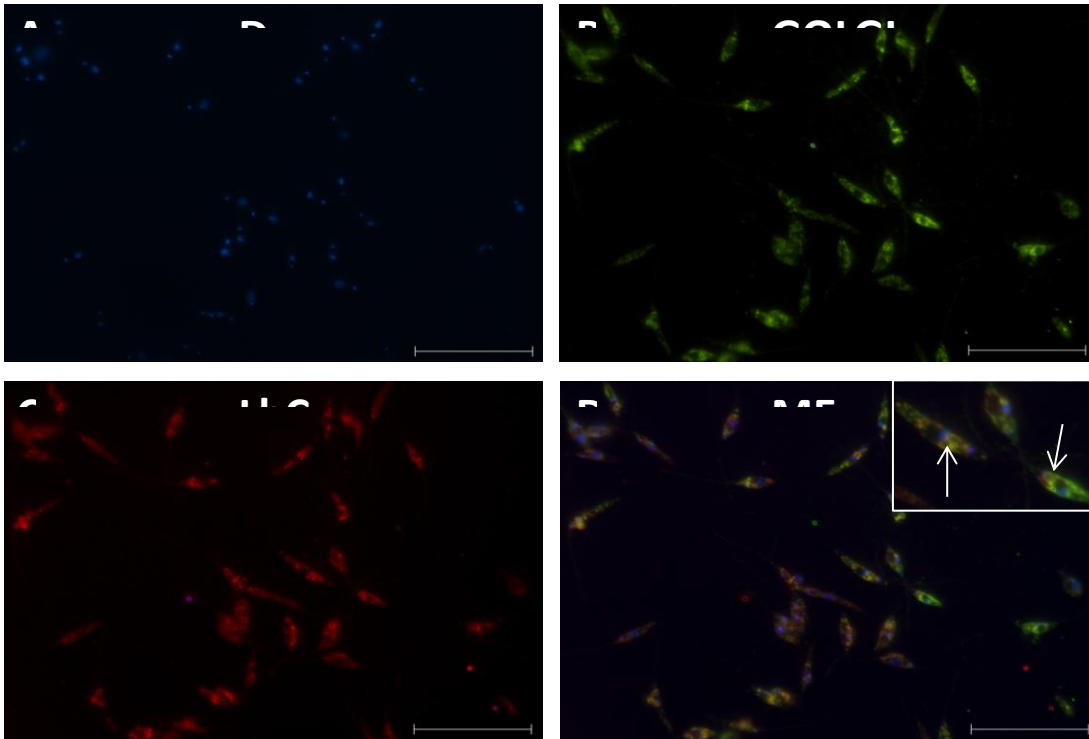
A) Control negativo. B) Promastigotes inmunomarcados contra las proteínas Golgina 97 y LbCLC-B; C) Imagen aumentada de B. Las flechas blancas señalan la colocalización Golgina 97-LbCLC-B. Las líneas denotan 20 μm .



Por microscopía confocal se corroboraron zonas de superposición entre Golgina 97 y LbCLC-B, especialmente en el polo inferior de los promastigotes, cerca de la zona del bolsillo flagelar (Fig. 2-9A-D). Adicionalmente, se realizó inmunomarcaje con las proteínas asociadas a membranas lisosomales 1 y 2 (LAMP-1, Fig. A.3.6 y LAMP-2, Fig. A.3.7), así como con V-ATPasa (Fig. A.3.8), sin encontrar colocalización. Los resultados previamente mostrados permiten sugerir que LbCLC-B colocaliza parcialmente con el complejo de Golgi.

Figura 2-9: Colocalización de LbCLC-B con Complejo de Golgi es predominante entre núcleo y kinetoplasto.

Promastigotes de *L.V. braziliensis* inmunomarcados con anti-Golgina 97 y anti-LbCLC-B vistos empleando el microscopio Nikon Eclipse Ni Automático. Las flechas destacan las zonas de colocalización entre proteínas. Las líneas denotan 20 μm .

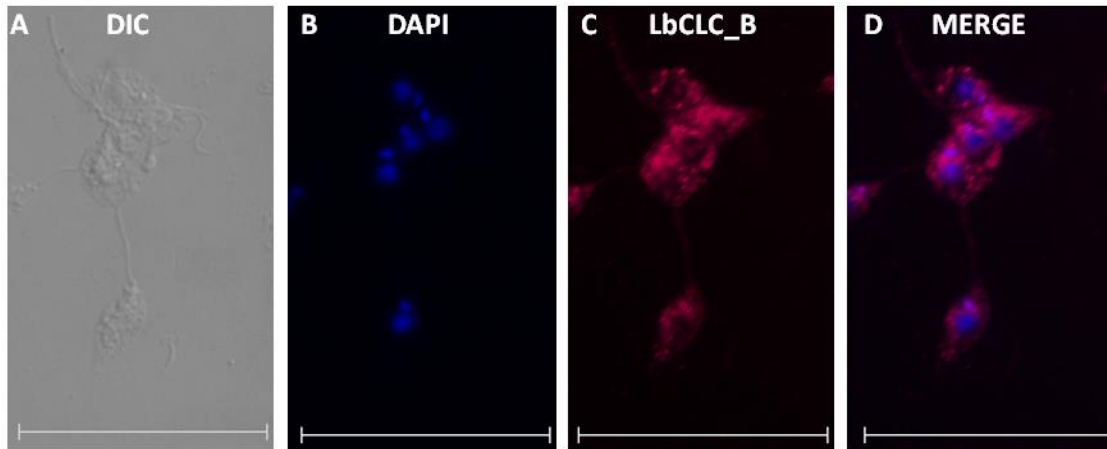


2.2.5 LbCLC-B es reclutada durante el daño celular en promastigotes de *L. V. braziliensis*

Se probó mediante reto osmótico hipotónico si LbCLC-B podría tener algún rol en este proceso. Se encontró que al someter promastigotes a una solución hipotónica de 150mOsm/L pobre en Cl^- se generó un aumento de volumen y apariencia granulada del citoplasma (Fig. 2-10A). Adicionalmente, la inmunofluorescencia empleando el anti-LbCLC-B reveló que muchos de los gránulos observados en luz transmitida corresponden con la localización de LbCLC-B. Es decir, durante estrés osmótico hay reclutamiento intracelular en puntiformesículas intracelulares de esta proteína en estos promastigotes (Fig. 2-10 C-D).

Figura 2-10: LbCLC-B es reclutada durante el daño celular.

Promastigotes de *L. braziliensis* sometidos a solución hipotónica de cloruro. A) DIC; B) marcación de ácidos nucleicos con DAPI; C) LbCLC-B; D) superposición de imágenes B y C. La línea denota 20 μm .



Este trabajo describe por primera vez la localización de las proteínas LbCLC-A, LbCLC-B y LbCLC-C empleando anticuerpos específicos en promastigotes de *L. V. braziliensis*, *L. L. amazonensis* y HEK 293. Todos tienen una distribución distinta en promastigotes. LbCLC-A está ubicado perimembranal y en membrana plasmática, mientras que LbCLC-B presenta una distribución de predominio intracelular puntiforme citoplasmático y LbCLC-C está confinada a tres o cuatro compartimentos intracelulares muy específicos de mayor volumen.

LbCLC-B tiene un tamaño menor al predicho por los análisis bioinformático, indicando modificaciones postraduccionales de esta proteína. Igualmente, el patrón de inmunofluorescencia LbCLC-B cambia en función del estadio del parásito siendo puntiforme localizado perinuclear en las fases más inmaduras, para tener una distribución puntiforme citoplasmática más general en los promastigotes maduros. LbCLC-B colocaliza parcialmente con Golgina 97 y parece ser reclutada ante retos osmóticos.

3. Capítulo 3 LbCLC-B es voltaje dependiente y sensible a pH ácido.

El alineamiento múltiple de CLCs (Fig. 3-1 rectángulos), muestra que LbCLC-A y LbCLC-B poseen los residuos clave que confieren características electrofisiológicas de intercambiador $2\text{Cl}/\text{H}^+$ respecto al canónico EcCLC-1 y cuyas corrientes aumentarían a pH ácido. Para explorar este supuesto se hicieron registros electrofisiológicos en un sistema heterólogo.

Figura 3-1: Alineamiento de los CLC de *L. V. braziliensis*

Respecto a canales e intercambiadores CLC descritos. Canales: CLC-0 de *T. marmorata* (CAA40078.1) y CLCN-1 de *H. sapiens* (P35523.3). Intercambiadores 2Cl-/H+: EcCLC-1 de *E. coli* (CAP74726.1) y GEF-1 de *S. cerevisiae* (EWH17593.1). 1F-/H+: PsyCLC-F de *P. syringae* (YP_234574.1) y RpiCLC-F de *R. pickettii* (YP_001892513.1). 2NO₃⁻/H⁺: AtCLC-a de *A. thaliana* (AED94613.1; EhCLC-A de *Entamoeba histolytica*; LbCLC-A; LbCLC-B, LbCLC-C y LbCLC-D. Los rectángulos destacan la localización de los glutamatos de compuerta (EcCLC-1 E148) y del protón (EcCLC-1 E203), el EcCLC-1 E202, estabilizador del conducto acuoso y los residuos EcCLC-1 S107 y EcCLC-1 Y445 encargados de la estabilización del Cl⁻ dentro de esta proteína.

CLC-0	ALVEGNIQLQYL-----VWCYPLALILFSSLFQIVSPQAVGSGIPELKTIIIRGAVL	137
CLC-1	AQMPSLPLQFL-----VWTFPLVLILFSALFCHLISPQAVGSGIPEMKTILRGVWL	203
PsyCLC-F	SLDHATQWRETH-----PWIIWLLPVAGFAVGLAYHLIGKPVDA GNNLIIDEIHDPKK	92
RpiCLC-F	ALDWATNTRTAH-----PWLLWFLPVAGLAVGLLYHYTGRSVEGGNNLLIIDEIHDPKR	93
EhysCLC-A	SLVEN-SFYKVI-----IWIYITIVLVTMAFLWTKFISPTANGSGVPEMKVTLLGNRI	165
EcCLC-1	VHTADNYPLLLT-----VAF LCSAVLAMFGYFLVRKYAPEAGGSGIPEIEGALDQR-	120
LbCLC-D	YHIMASQRHRSIGCLQGFFYTVLGSVVLVSIAGVWVYFEPAAASGGGIPDVMAYLNGVHL	237
AtCLC-a	-----MVFTGANLGLTLVATVLVWYFAPTAAAGPGIPEIKAYLNGIDT	42
LbCLC-B	LRTISWSALLRG-----WMLYTMWGLMALLSSLCCLVMP SAAGSGIPDVMAYLNGVMF	234
LbCLC-C	GNNVGLYGIASPRWYNSGYALWIAFAVCTS AVASGV CYLVPQSVGSGIPEVLAYLNGVSY	172
Gef-1	ECEAQGLWIANKGHVSPFIIIFMLLSVLFALISTLLVKYVAPMATGSGISEIKVWVSGFEY	200
LbCLC-A	NHVAVFVDFVMY-----VGFSTLAAVTAAYLCKTYAPYASGGGIAE VKTIVSGYHV	193
		. * : : .
CLC-0	-HEYLT LRTFVAKTVGLTVALSAGFPLGKEGPFVHIASICATLLNQLLCFISGRREOPY	196
CLC-1	-KEYLTMKAFVAKWALTAGLGSIPVKGEGPFVHIASICAAVLSKFMSVFCGVYEQPY	262
PsyCLC-F	-IVPLRMVPMVLIGTVVSHLFGA--SVGREGTAVQMG GALADQLTHVFLRRREDRR----	145
RpiCLC-F	-VVPKRMAPLILLSTVVTIFGG--SAGREGTAVQMGGSFADYLRFLSLAPADRR----	146
EhysCLC-A	-PNLLTFKTLIAKVI GLVFLVGGGMWAGKEGPFHISSCIASQLTRLPIFRFLRNSNE--	222
EcCLC-1	--PVRWVRVLPVKFFGGLGLTGGGMVLGREGPTVQIGGNI GRMVLDFVRLKGDEAR----	174
LbCLC-D	-RKAMNLRTFIAKAISICAVGGGLPVGLEAPLIHLGAITGAGVTQGRSRTLGFQTSLLQ	296
AtCLC-a	-PNMFGFTTMMVKIVGSI GAVAAGLDLKGEGPLVHIGSCIASLLGQGGPDNHR IKWRWLR	101
LbCLC-B	-PRIFNVRNLVIKSLSCILAVSAGLPVGI EGPMIHMGS LIAGLPTGRSRLRCSATSFF	293
LbCLC-C	-PMMRSTRVLVAKLVAVVFTVASGVCTGHYGHMLLAGAMLGAQLLQRRHGVR CYHVHFVD	231
Gef-1	NKEFLGLLTLVIK SVALPLAISSGLSVGKEGPSVHYATCCGYLLTKWLLRDTLTYSTQY-	259
LbCLC-A	-KRYLGGWTLITKVVAMCFSTGSGLTVGKEGPFVHIGACVGGIISGAFPSYQQETKE---	249
		: .. * . : . . :

Figura 3-1 continuación

CLC-0	LR-----ADILTVGCALGISCCFGTPLAGVLFSEI	EVTCS----	HFGVRSYWRGFLGGA	245
CLC-1	Y-----SDILTVGCAVGVGCCFGTPLGGVLFSEI	EVTST----	YFAVRNYWRGFFAAT	310
PsyCLC-F	-----VILMAGISAGFASVFGTPLAGALFGL	EVLAIG---	RMRYDALFPCVVAAI	192
RpiCLC-F	-----ILLMAGISAGFASVFGTPLAGAVFGL	EVLAIG---	RLRYDAILPCFIAAI	193
EhysCLC-A	LF-----MQMLSTATSCGVSSNFGTAIIGLLFSEI	EVTAT----	YFSVRNYWFGTFSSV	271
EcCLC-1	-----HTLLATGAAAGLAAAFNAPLAGILFII	EMRPQF--	RYTLISIKAVFIGVI	223
LbCLC-D	AFR-NMKDRRDFITAGAACGVSVAFGAPIGGLFV	EEVSSFWDRSSNGQIFLATMLCFT		355
AtCLC-a	YFN-NDRDRRDLITCGSASGVCAAFSPVGGVLF	EEVATWWRSAALLWRTFSTAVVVV		160
LbCLC-B	DQFRNPRDGRDFISAGAACLTSAFSSPLGGMLF	VMEEMATHFSVRLAWLVFLSCLSCMW		353
LbCLC-C	HFR-NPRDRRIVLVIGAAAGIAAAFVSVGGLLV	LELLSAVYPVRFALYIFAACLLSTL		290
Gef-1	-----EYLTAASGAGVAVAFGAPIGGVLFGL	EEIASAN--	RFNSSTLWKSYIVAL	307
LbCLC-A	-----RELITAGAGGGMAVAFGAPVGGVIFAL	EDVSTS---	YNFKALMAALICGV	296
	: . . *	* . . *	: . . *	
CLC-0	SHVLPMMVAVILANMVAQGLQPS--L	YDSIIQIKKLPYLP	ELSWSSA--NKYNIQVGDIM	543
CLC-1	AHILPMMVAVILANMVAQSLQPS--L	YDSIIQVKKLPYLP	DLGWNL--SKYTIFVEDIM	609
PsyCLC-F	IAPLAAIACIASYLVSGHTGIYH--A	QRVGHSKHHRPLPEEIRLSDI--	KQFHAQSEAS	437
RpiCLC-F	VGTFAGIACVSYLVSGHTGIYH--A	QRIGHAKRP-----	TEAAP	414
EhysCLC-A	SILVPMIATVITICFRFFTVTC--V	DKIAIDKKLPYIPDIQYSS--	NQTAEMVMDTN	543
EcCLC-1	QLILPMIITGLGATLLAQFTGGK-PL	YSAILART-----	LAKQEAQLA	461
LbCLC-D	HYLLPVMVAIVMSKTTADWLCEP--L	YHQMLFMDSPYLPPIVIVK--	EFEQLTAADVM	678
AtCLC-a	LLLPIITMFVLLIAKTVGDSFNLS--I	YEIILHLKGLPFLEANPEPWM--	RNLTVGELNDA	463
LbCLC-B	SHITCLMLGILLAKGIADKCHS--F	YHASLEVKAVPFLEAQSMH--	LLDITYTARDIM	666
LbCLC-C	RHLLPLMFAIAVARRVLLQWGRD--V	HTVYLEARAVPLLNAEYSLG--	RYGLLDARHVM	694
Gef-1	MYIIPLMIVVAITRIILSTSGISGGI	ADQIMVNGFPYLEDEQDEEEETLE	KYTAEQLM	591
LbCLC-A	EYMPPIIVGILCAKAAEAVGVKGT- Y	EIVIEENKLPYLP	DKKEFYLDPSAKDVYKMKQF	580

3.1 El modelo de *X. laevis* como sistema heterólogo.

Los ovocitos de *X. laevis* han sido empleados para la caracterización de otros CLCs, aunque poseen corrientes endógenas de Cl⁻ (Kowdley, Ackerman, John, III, Jones, & Moorman, 1994). Éstas son insensibles a acidificación externa (Kowdley *et al.*, 1994) y tienen mayor selectividad por I⁻ que Cl⁻ (Kowdley *et al.*, 1994). Los ovocitos expresan también corrientes de Cl⁻ activadas por cambios de volumen que dependen de la membrana folicular que los envuelve, las cuales se minimizan al retirarla (Arellano & Miledi, 1995) y se postula son el resultado de la función de CLC-3 (Duan *et al.*, 2001). Adicionalmente, se han reportado corrientes de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺, las cuales pueden ser inhibidas por el ácido tetra-acético -N,N,N',N'- 1,2-bis(o-aminofenoxy)etano), BAPTA (Boulin *et al.*, 2008).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Obtención y mantenimiento de ovocitos de *X. laevis*:

Hembras adultas de *X. laevis* mantenidas en tanques de agua de clorinada a 15°C, alimentadas dos veces a la semana y con ciclos de luz de 12 horas, se emplearon para extracción quirúrgica de fragmentos de lóbulo ovárico. Se fraccionaron en solución ND96 sin calcio (Tabla 6), se lavaron y separaron mecánicamente con pinzas previa exposición a 1,5 mg/ml a colagenasa tipo II (Worthington Biochemical®) durante 2 horas a 18°C. Los ovocitos aislados fueron lavados, defoliculados y seleccionados según tamaño y apariencia para asegurar estadios de desarrollo V-VI. Posteriormente fueron mantenidos en solución ND96 suplementada con penicilina y estreptomina (100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente) a 18°C ± 2°C (Stuhmer, 1992). El medio se cambió cada 24 horas

Cada ovocito se inyectó 4-24 horas post-extracción con un nanoinyector Drummond® siguiendo el protocolo de Stühmer (Stuhmer, 1992). Dependiendo del material inyectado se repartieron así:

- Ovocitos no inyectados (NIO), control de extracción.
- Ovocitos inyectados con H₂O libre de nucleasas (DIO), control de inyección.
- Ovocitos inyectados con *cRNA* del canal de potasio voltaje dependiente hEAG2 (Lorinczi, Napp, Contreras-Jurado, Pardo, & Stuhmer, 2009), donado por Stühmer, control de expresión.
- Ovocitos inyectados con *cRNA* de *LbCLC-A* (CIC-A)
- Ovocitos inyectados con *cRNA* de *LbCLC-B* (CIC-B).

3.2.2 Registros electrofisiológicos en ovocitos de *X. laevis*

Corrientes macroscópicas de ovocitos de los diferentes grupos se registraron con la técnica de *voltage clamp* y dos electrodos, entre 24 y 110 horas después de la inyección, empleando el amplificador Turbo TEC 10 CX npi. Los pulsos de voltaje generados y las corrientes desencadenadas se digitalizaron con una interfaz análogo-digital *Patch Clamp EPC 9* (HEKA elektronik, Alemania). Las señales se filtraron y almacenaron en una computadora Apple. Para la generación de los potenciales y la obtención de los registros

Teofilina	-	-	-	0,5	-	-	10,0	-
Na-Piruvato	-	-	-	2,5	-	-	10,0	-
HEPES	10,0	-	-	5,0	5,0	5,0	5,0	-
MES	-	10,0	-	-	-	-	-	-
TRIS	-	-	10,0	-	-	-	-	-
pH	7,4	5,0	8,0	7,4	7,5	7,5	7,5	-
E_{Cl^-} (mV)	79	79	79	84	136	97	68	
E_{K^+} (mV)	-171	-171	-171	-100	-100	-100	-100	

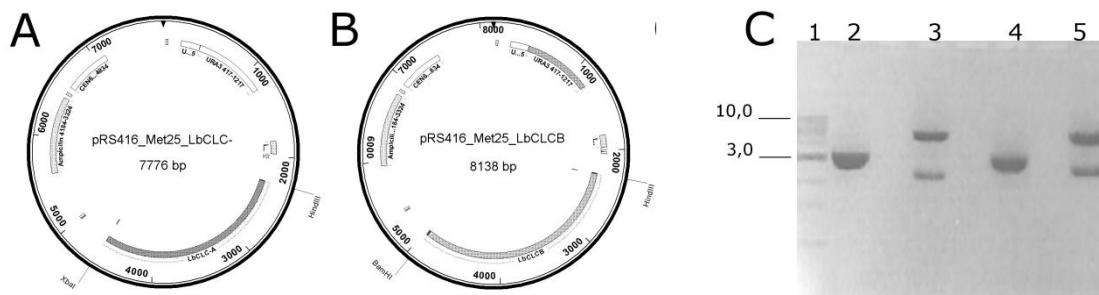
NFR y ND96 modificadas de Zdebik *et al.* 2008 en *voltage clamp* (Zdebik, Zifarelli, Jentsch, & Pusch, 2008).

3.2.3 Producción de cRNA de LbCLC-A y LbCLC-B.

Se partió de los plásmidos de levadura *pRS416_met25+LbCLCA* y *pRS416_met25+LbCLCB*, generados por Viviescas, en adelante, *p416_LbCLCA* y *p416_LbCLCB* (Fig. 14A-B), los cuales contenían los genes de interés con los sitios de restricción Xba I y Hind III (*LbCLC-A*) y Bam HI y Hind III (*LbCLC-B*) en sus extremos (Viviescas, 2014). *p416_LbCLCA* (Fig. 3-3A) y *p416_LbCLCB* (Fig. 3-3B) fueron digeridos para liberar los genes de interés (Fig. 3-3C). Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis, cortados y purificados para subclonación en *pSGEM*.

Figura 3-2: Liberación de LbCLC-A y LbCLC-B a partir de p416_LbCLCA y p416_LbCLCB.

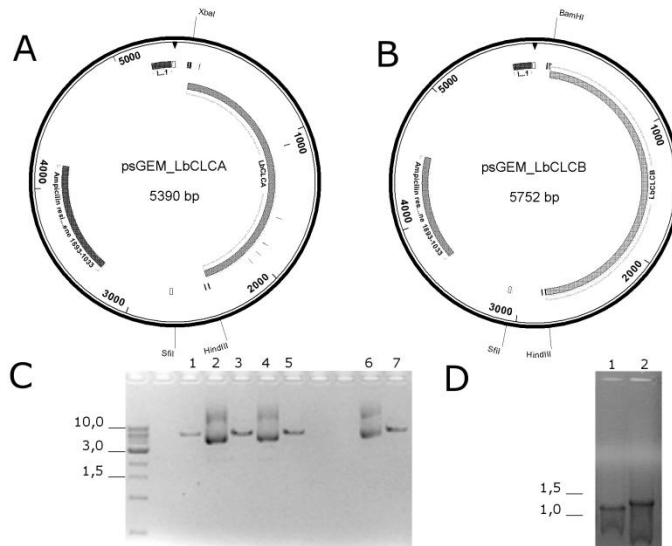
A) p416_LbCLCA, y B) p416_LbCLCB. C) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%: 1) Marcador de peso molecular (1 kb New England Biolabs); 2) p416_LbCLC-A no digerido 3) p416_LbCLC-A + Xba I y Hind III 4) p416_LbCLC-B no digerido, 5) p416_LbCLC-B + BamH I y Hind III.



pSGEM+LbCLC-A (Fig. 3-3A) y *pSGEM+LbCLC-B* (Fig. 3-3B), fueron verificados por secuenciación (anexo 4) y linearizados con Sfi I (Fig. 3-3C) para usarlos como plantilla en la síntesis de *cRNA* usando el kit mMACHINE[®]. El *cRNA* obtenido de ambos genes se cuantificó y separó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (Fig. 3-3D).

Figura 3-3: Subclonación de LbCLC-A y LbCLC-B en pSGEM y síntesis de cRNA de LbCLC-A y LbCLC-B.

A) pSGEM + LbCLC-A. B) pSGEM + LbCLC-B. C) Gel de agarosa al 1%; Carriles 1, 3,5 pSGEM + LbCLC-A linearizados con Sfi I; 2,4 pSGEM + LbCLC-A no digeridos; 6: pSGEM + LbCLC-B no digerido; 7: pSGEM + LbCLC-B digerido con Sfi I D) cRNA LbCLC-A (1) y LbCLC-B (2) obtenidos a partir de los pSGEM linearizados



3.2.4 Análisis estadístico y gráficas:

Se utilizó un análisis de varianzas de una vía, con prueba post-hoc de Holm-Sidak para la comparación de las corrientes registradas entre los distintos grupos evaluados empleando el software sigmastat® 3.1. Se consideró que existía diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Para la presentación de las gráficas se usó el software graphpad® 6.0.

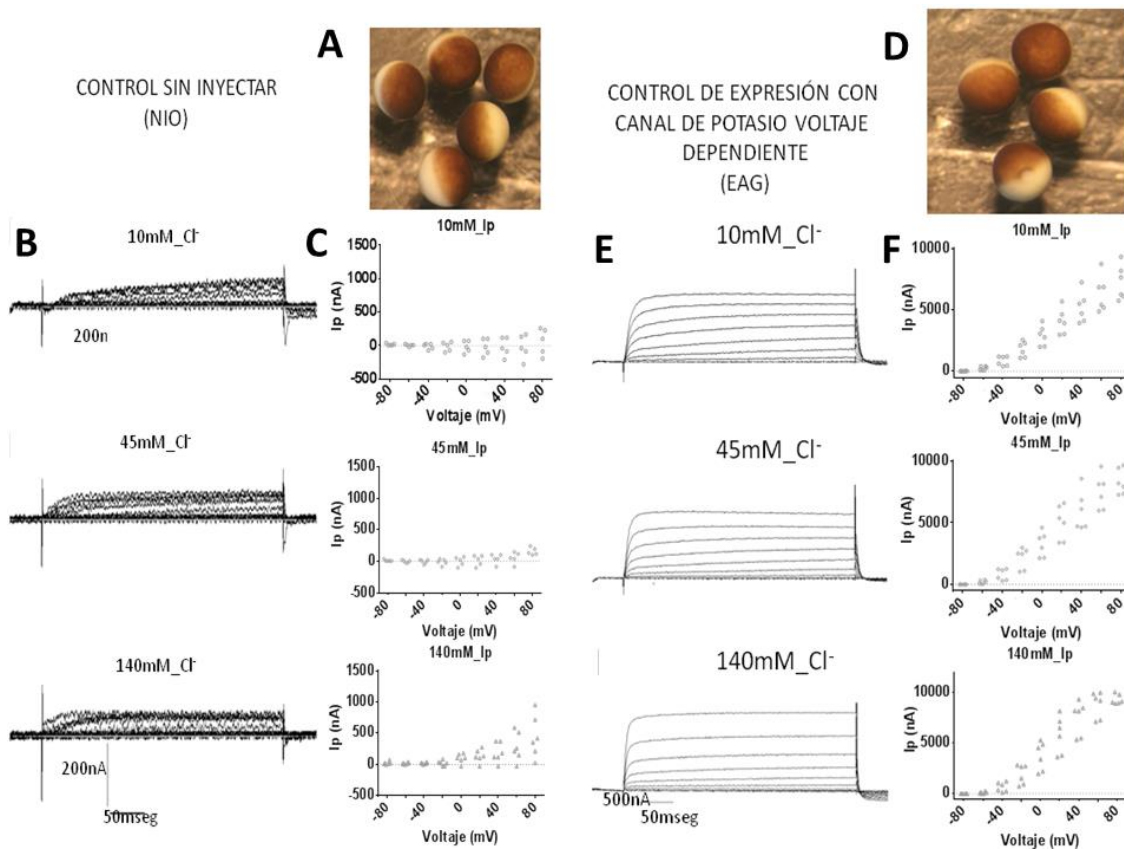
3.3 Resultados

3.3.1 Los ovocitos no inyectados (NIO) presentan corrientes de salida voltaje dependientes de baja amplitud

Se hicieron registros de *voltage clamp* con dos electrodos en soluciones con diferente concentración de Cl^- extracelular ($[\text{Cl}^-]_e$), en ovocitos no inyectados (NIO, Fig. 3-4A). La figura 3-4B muestra las corrientes desencadenadas en NIO luego de pulsos de voltaje desde -80 a +80 mV, a partir de un potencial de sostenimiento a -40 mV. A 10mM de $[\text{Cl}^-]_e$ se registró en NIO una corriente de entrada temprana, que luego de unos milisegundos revierte y persiste como corriente de salida (Fig. 3-4B-C). La presencia inicial de corrientes de entrada seguidas de corrientes de salida sugiere la permeación de dos o más iones de carga opuesta. A 45mM de $[\text{Cl}^-]_e$, la corriente de entrada inicial se minimiza y se presentan corrientes de salida de baja amplitud, i.e. < 200 nA que no se inactivan (Fig. 3-4B-C mitad). A 140mM de $[\text{Cl}^-]_e$, se observan corrientes de salida, voltaje dependientes, de activación rápida que no se inactivan (Fig. 3-4B-C, inferior).

Figura 3-4: Aspecto de ovocitos no inyectados e inyectados con h2EAG así como las corrientes generadas en función del gradiente de Cl⁻ y voltaje empleados.

A) ovocitos no inyectados (NIO). B) Registros de corriente superpuestos de NIO (nA/s) en diferentes concentraciones de Cl⁻ externo. C) Gráficas de la corriente máxima pico (I_p) vs voltaje (V) en nA/mV para NIO. D) Ovocitos inyectados con h2EAG. E) Registros de corriente superpuestos de EAG (nA/s) en diferentes concentraciones de Cl⁻ externo. F) Gráficas de la corriente máxima pico (I_p) vs voltaje (V) en nA/mV para EAG.



3.3.2 La inyección de h2EAG en Ovocitos (EAG) induce corrientes rectificadoras de salida voltaje dependientes de gran amplitud

Se inyectaron ovocitos con *cRNA* del canal voltaje dependiente de potasio h2EAG (EAG) como control de expresión (Fig. 16D). Notar que no hubo cambios en el aspecto general de estos ovocitos al cabo de 110 horas postinyección. Ante un gradiente de [Cl⁻]_e igual al aplicado a NIO, la expresión de EAG resultó en corrientes rectificadoras de salida, voltaje dependientes, de activación rápida, no inactivantes de gran amplitud ($9.404 \pm 494 \mu\text{A}$ a

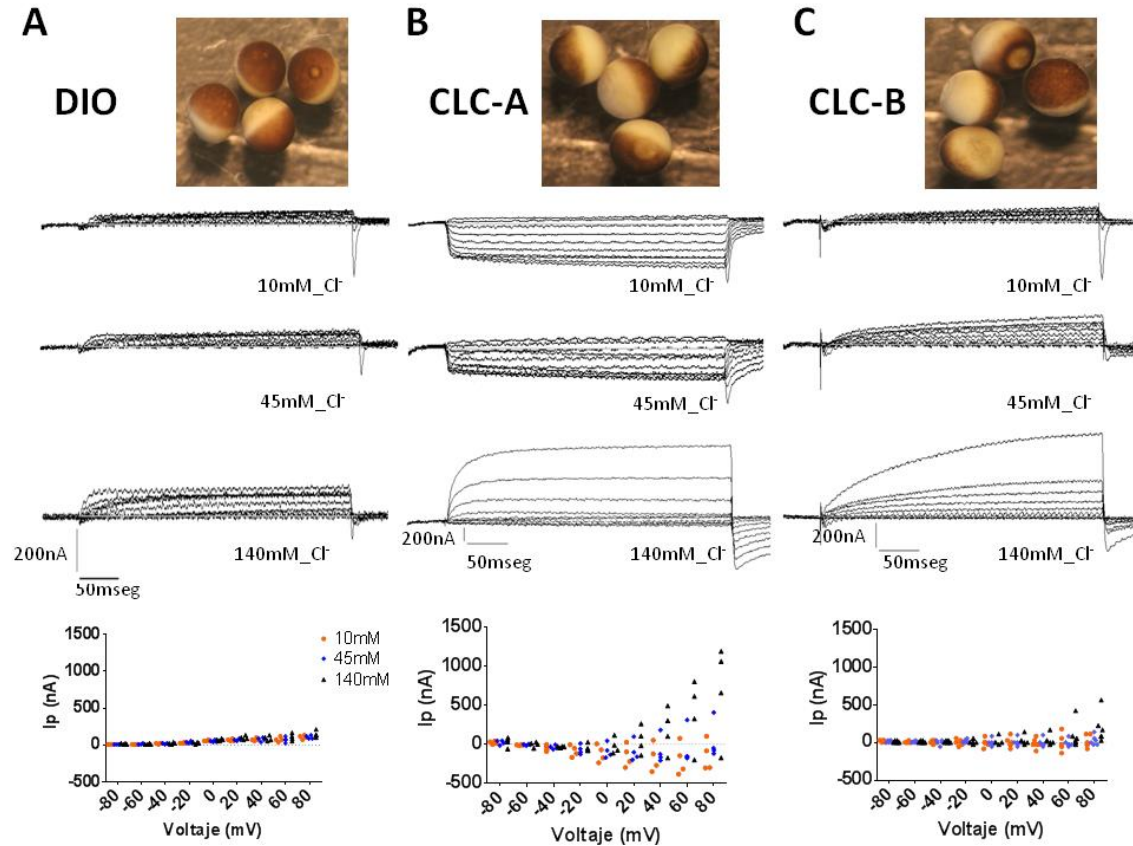
+80 mV en 140 mM) (Fig. 16E-F). El ANOVA comparativo de las I_p entre todos los EAG a diferentes $[Cl^-]_e$, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,174$), coherente con que al no ser modificada la $[K^+]_e$, el gradiente eléctrico es el único que determina la permeación de este ion.

3.3.3 Inyección de cRNA LbCLC-A induce corrientes voltaje dependientes

Ovocitos inyectados con agua libre de nucleasas (DIO) sirvieron como control de inyección. Las corrientes registradas en este grupo control (Fig. 3-5A), tienen cinética similar a la observada en NIO (Fig. 3-4A-C). El comparativo entre I_p y corrientes obtenidas al 95% del total del tiempo de registro entre DIO y NIO, no mostró diferencia estadísticamente significativa, excepto a 140mM, $p = 0,023$, siendo menores en DIO, e indicando que la inyección *per se* no induce corrientes. Se inyectaron ovocitos con cRNA *LbCLC-A (CLC-A)* (Fig. 3-5B) y cRNA de *LbCLC-B (CLC-B)* (Fig. 3-5C). En estos grupos se encontraron cambios en la pigmentación y turgencia, sugiriendo alteración del volumen celular.

Figura 3-5: Inyección de cRNA de LbCLC-A (CLC-A) y LbCLC-B (CLC-B), resulta en corrientes voltaje dependientes.

Ovocitos de *X. laevis* junto con los registros superpuestos de corriente en función del tiempo y curvas corriente-voltaje ante gradiente de $[Cl^-]_e$. A) DIO. B) CLC-A. C) CLC-B.



Los ovocitos CLC-A mostraron diferencias en la cinética de las corrientes con respecto a NIO y DIO (Fig. 3-5B). A 10mM de $[Cl^-]_e$, hay corrientes de entrada de activación rápida, sin inactivación. Luego de 400 msec no se alcanza estabilización de la corriente (Fig. 3-5B). La I_p fue mayor en CLC-A comparada con DIO ($p = 0,045$). El cambio del gradiente químico de Cl^- con 45mM disminuye las corrientes de entrada que presentan activación temprana (150msec), sin inactivación y se estabilizan transcurridos 250 msec (Fig. 3-5B). A 140mM de $[Cl^-]_e$, se registraron corrientes de salida, voltaje dependientes que se estabilizan luego de 150msec y que alcanzan su mayor amplitud a +80mV. La comparación de I_p , indica 3,3 veces ($p = 0,032$) más corriente en CLC-A que en DIO a este pulso. Las corrientes de cola observadas al final de estos registros sugieren que la activación alcanzada no fue de 100% a los potenciales más despolarizantes durante los

400mseg de duración de los pulsos. Luego, la evidencia apunta a que LbCLC-A induce corrientes rectificadoras de salida, voltaje dependientes de Cl^- .

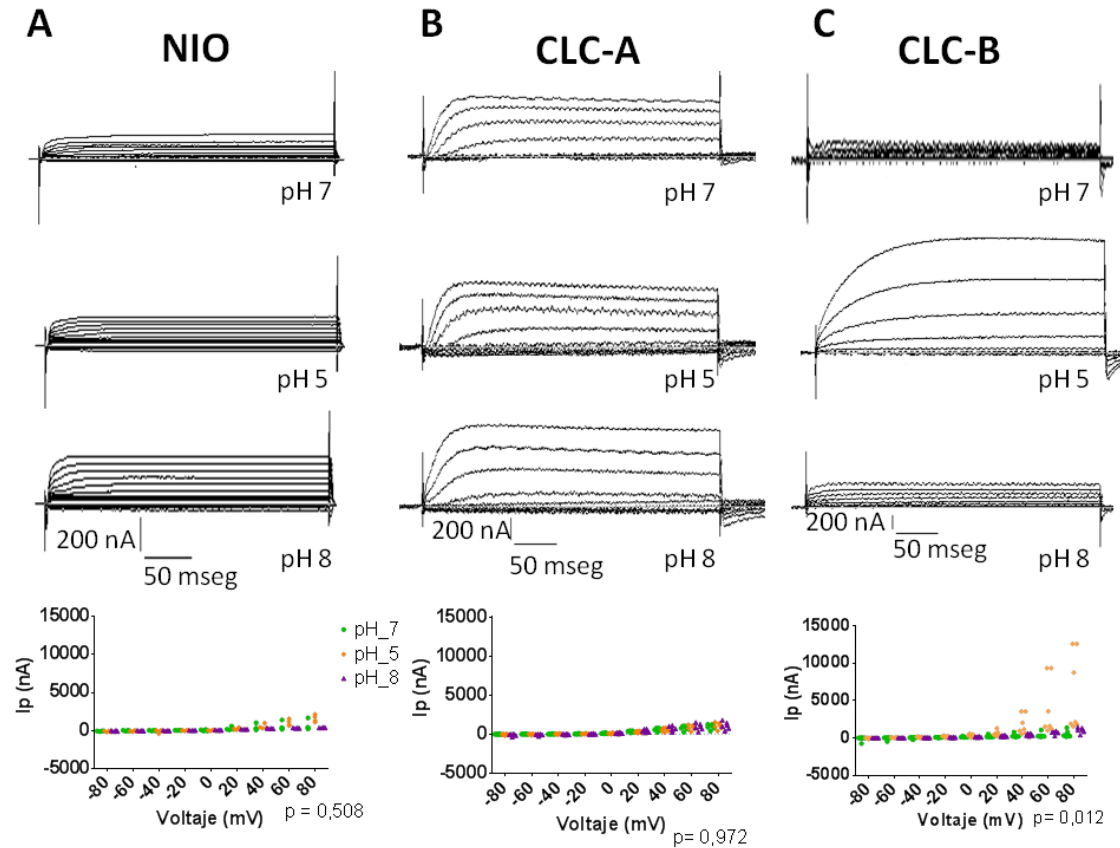
En los ovocitos inyectados con cRNA de *LbCLC-B*, se observan diferencias respecto a CLC-A, NIO y DIO. La cinética de las corrientes muestra una corriente de entrada temprana, atribuible a entrada de cationes, que revierte y se hace de salida a todos las $[\text{Cl}^-]_e$, siendo más evidente a 140mM (Fig. 3-5C). A esta concentración la activación de la corriente de salida es mucho más lenta, es voltaje dependiente y no se estabiliza en los 400 ms de duración de los pulsos (Fig. 3-5C).

3.3.4 LbCLC-B induce corrientes de salida voltaje dependientes sensibles a pH ácido

Se evaluó el efecto del pH externo en corrientes inducidas luego de inyectar cRNA *LbCLC-A* (CLC-A) o cRNA de *LbCLC-B* (CLC-B) en ovocitos expuestos a solución NFR (tabla 6) y pulsos despolarizantes -80 a +80 mV, a partir de un potencial de sostenimiento a -80 mV. En NIO no se detectaron corrientes de entrada tempranas descritas en medios con diferente $[\text{Cl}^-]_e$ (Fig. 3-6A vs Fig. 3-4A). Se registraron corrientes de salida de activación rápida y no inactivantes (Fig. 3-6A). A pH: 7 la cinética de activación y amplitud de las corrientes son comparables con pHs: 5 y 8 (Fig. 3-6A). En ovocitos CLC-A a pH: 7, se observan corrientes rectificadoras de salida, voltaje dependientes con activación más lenta a la registrada en NIO, que se estabilizan entre 50 y 100 mseg, no se inactivan y son comparables en amplitud y cinética con las observadas a pH: 8. Sólo a pH: 5 se observó una corriente temprana de entrada, atribuible a cationes que por el gradiente podrían ser H^+ (Fig. 3-6B).

Figura 3-6: Inyección de cRNA de LbCLC-B (CLC-B), resulta en corrientes sensibles a pH ácido.

Efecto de un gradiente de pH extracelular sobre corrientes de membrana en ovocitos de *X. laevis* inyectados con cRNA LbCLC-A (CLC-A) y LbCLC-B (CLC-B). Se presentan registros superpuestos de corriente en función del tiempo y curvas corriente-voltaje a pulsos desde -80 a +80 mV. A) NIO. B) CLC-A. C) CLC-B.



Registros en gradiente de $[Cl^-]_e$ indicaban que ovocitos CLC-B presentaban corrientes activadas por voltaje de poca amplitud, con una cinética diferencial con respecto a NIO y CLC-A. A pH: 7 se observa una corriente de entrada temprana de activación más rápida en estas condiciones que revierte en una corriente de salida, pobremente inactivante (Fig. 3-6C). Estas corrientes sin el componente temprano de entrada son comparables con las registradas a pH 8. Sin embargo, a pH: 5 se observan corrientes rectificadoras de salida, voltaje dependientes, que se estabilizan entre 150 – 200 msec, no inactivantes y cuya amplitud fue 3,7 veces mayor comparadas con NIO ($p = 0,034$) (Fig. 3-6C). Notar

que la pendiente de activación también cambió dado el gradiente de protones, siendo mayor a pH: 5.0 (Fig. 3-6C).

Los resultados anteriores permiten sugerir que LbCLC-A es un transportador de Cl^- voltaje dependiente cuya I_p no se altera con cambios de pH. En contraste, la voltaje dependencia de LbCLC-B, es óptima a pH ácido. Por los cambios de cinética observados en $[\text{Cl}^-]_e$, baja amplitud de las corrientes (comparadas con las obtenidas con el EAG, fig. 3-4) y pH diferentes se sugiere que estos dos CLC de *Leishmania* son intercambiadores.

4. Capítulo pSP72RaNeoaGFP no es inocuo para promastigotes de *L. V. braziliensis*

En *Trypanosomatidae* horquillas de RNA entre 100 y 1550 pb son el mecanismo más eficiente para inducir iRNA (Atayde *et al.*, 2012); constructos que generaban esta estructura fueron usadas en este estudio para promover silenciamiento de LbCLC-B en promastigotes de *L. V. braziliensis* y determinar el efecto sobre su fisiología. Sin embargo, se encontró que el plásmido empleado para insertar las secuencias de interferencia específica para LbCLC-B provocó silenciamiento de α -tubulina. A continuación se mostrara el efecto.

4.1 Materiales y métodos:

Para introducir en promastigotes de *L.V. braziliensis*, RNAs de doble cadena cortos invertidos LbCLC-B específicos se empleó el plásmido *pSP72R*□*Neo*□*GFP*, (en adelante *pSP*). Cultivos celulares, obtención de extractos de proteína total, separación por electroforesis en SDS-PAGE, Western Blot, inmunofluorescencias y valoración de número y volumen de promastigotes, así como el análisis de los datos fueron descritos previamente en materiales y métodos del capítulo 2. Se emplearon adicionalmente anticuerpos referenciados en la tabla 7. En todos los casos el anticuerpo primario se usó a diluciones 1:2000, incubando un mínimo de cuatro horas a 4°C.

Tabla 4-1: Anticuerpos para detección de GFP

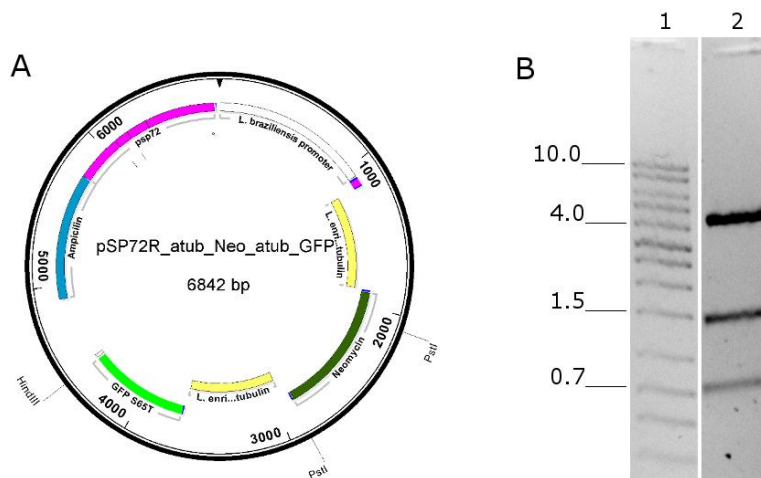
Anticuerpo primarios	Descripción	Tipo	Origen
anti- α GFP	Roche [®] (ref.: 11814460001)	IgG	ratón monoclonal
Anticuerpo secundario			
anti-ratón (H+L)	Invitrogen	IgG	cabra

4.1.1 Amplificación y secuenciación de pSP

pSP (donado por Prof. Elisabetta Ullu, Yale School of Public Health, Yale University, Estados Unidos) fue amplificado transformando *E. Coli* DH5 α competentes seleccionadas con ampicilina y purificado por lisis alcalina (Ausubel *et al.*, 2003) con *Endotoxin free plasmid DNA purification kit* (Macherey-Nagel). Su integridad se evaluó mediante digestión simultánea del plásmido con Hind III y Pst I. De ser correcto el vector y no tener presente ningún inserto, se deberían observar tres fragmentos de 4484pb, 1546pb y 806pb (Fig. 4-1A). Adicionalmente, se realizó secuenciación completa del *pSP* por método Sanger (Macrogen y Max Planck Institut für Experimentelle Medizin, anexo 5.1). La secuenciación difirió en 6 nucleótidos respecto a reportado previamente (Atayde *et al.*, 2012).

Figura 4-1: Plásmido pSP72RaneoαGFP.

A) Mapa de psp72RaNeoαGFP secuenciado donde se señalan los sitios de restricción Pst I y Hind III. B). Gel de agarosa 0,8% donde se separaron los productos de la digestión de pSP72RaneoαGFP con Hind III y Pst I. 1) Marcador de peso molecular; 2; pSP digerido.



4.1.2 Electroporación de promastigotes

10 x 10⁸ promastigotes de *L. V. braziliensis* fueron lavados dos veces con 3 ml de PBS 1X y resuspendidos en 3 ml de citomix estéril (en mM: KCl 120, CaCl₂ 0,15, K₂HPO₄ 10, Hepes 25, pH: 7,6, EDTA 2 y MgCl₂ 5). Dos (2) x 10⁶ promastigotes/ml en 0,4 ml de citomix y 22,5 ug/ul del constructo a incorporar fueron adicionados a una cubeta para electroporación de 0,4 cm de apertura (BioRad). Las células se electroporaron usando el Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems de Bio-Rad, aplicando tres pulsos de 1600 V, 25 mF y resistencia infinita, separados entre sí 20 segundos. Los parásitos electroporados fueron inmediatamente puestos en hielo por 10 segundos y transferidos a frascos de cultivo con 5 ml de medio Schneider + 20% de SFB, sin antibiótico e incubados 16 h a 26 °C. Posteriormente se adicionaron 60 ug/ml de geneticina para la selección de parásitos transfectados.

4.1.3 Curvas de crecimiento de promastigotes

1X10⁶ promastigotes resuspendidos en 10ml de medio Schneider insecto suplementado con 10% de suero fetal bovino en flask de 25 cm² fueron usados. Cada 24 horas se tomó

una alícuota de 100 µl del cultivo para cuantificar en el Z2 Coulter Counter® de Beckman Coulter. Se realizaron tres experimentos cada uno por triplicado en ausencia de antibiótico

4.1.4 Amplificación de gen NEO y GFP en promastigotes transformados con pSP

Se extrajo DNA genómico de promastigotes de *L.V. braziliensis silvestre* (WT), y transfectados con pSP (Wizard® genomic DNA purification Kit de Promega). El DNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría en Nanodrop. La presencia de los genes que codifican neomicina fosfotransferasa (Neo) y proteína verde fluorescente (GFP) fue verificada por PCR (Tabla 8) empleando cebadores específicos diseñados por Celis y Viviecas (Tabla 9) que amplificaran un producto parcial de cada uno de ellos.

Tabla 4-2: Condiciones de PCR para amplificación.

	[inicial]		[final]		Volumen (ul)
Agua HPLC					25
Buffer	10	X	1	X	17,05
Mg+2	50	mM	1,5	mM	2,5
dNTPS	10	mM	20 0	uM	0,75
Cebador F	10	uM	0,2	uM	0,5
Cebador R	10	uM	0,2	uM	0,5
Taq Polimerasa Invitrogen	5	U/uL	0,0 4	U/uL	0,2
DNA			20 0	ng	3
				Total	25

T° [°C] (Neo)	T° [°C] (GFP)	Tiempo (min)	N° de ciclos
94	94	5	1
94	94	1	1
68	55	1	30
72	72	1	1
72	72	5	1
10	10	∞	1

Tabla 4-3: Secuencias de cebadores NEO y GFP.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Extensión	Tm	GC %	Autocomplementariedad	
NEO - Fw	TGCTCCTGCCGAGAAAGTA TCCATCATGGC	30	69, 79	53, 33	7,00	5,00
NEO - Rv	CGCCAAGCTCTTCAGCAAT ATCACGGGTAG	30	68, 85	53, 33	4,00	0,00
GFP PSP72 CIF - Fw	GCAAGCTGACCCTGAAGTT C	20	59, 12	55, 00	5,00	5,00
GFP PSP72 CIF - Rv	GTCTTGTAGTTGCCGTCGT C	20	58, 94	55, 00	3,00	3,00

4.1.5 Cuantificación de intensidad de fluorescencia

Para cuantificar los niveles de fluorescencia en las fotos obtenidas se usó el software ImageJ. Se calculó para cada campo de fluorescencia (GFP o α -tubulina) la intensidad de pixeles reportada en escala de grises. Siendo 0 ausencia y 256 máxima fluorescencia.

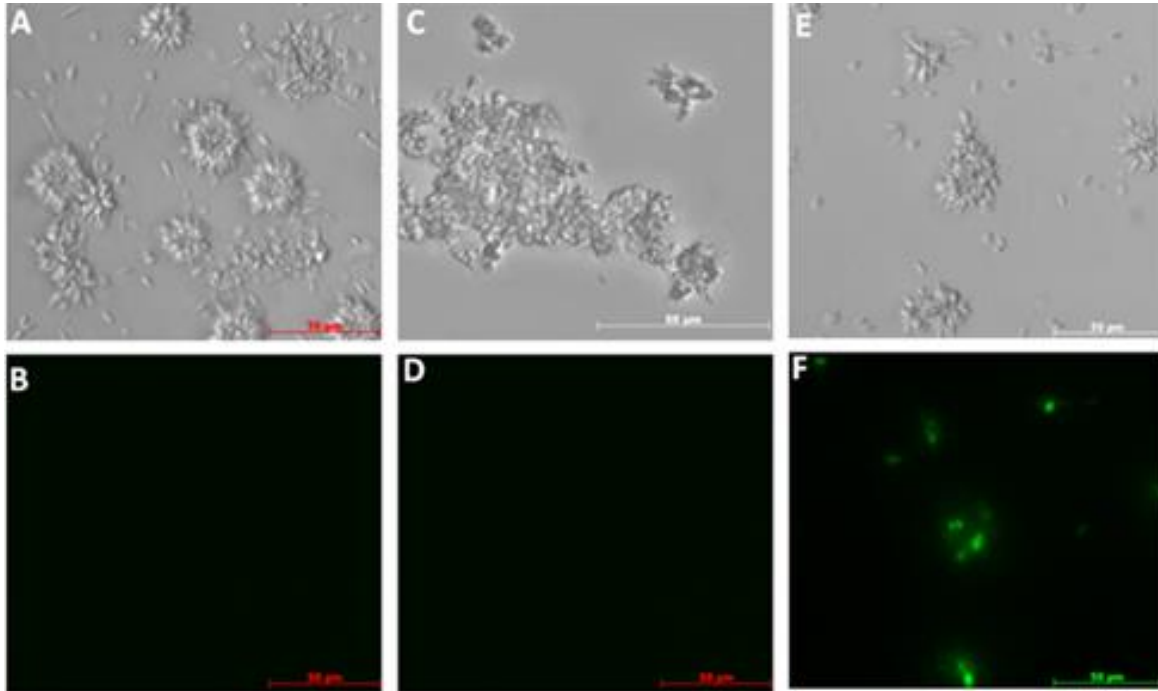
4.2 Resultados

4.2.1 Promastigotes de *L. V. braziliensis* electroporados con pSP son resistentes a geneticina y fluorescen

Los promastigotes silvestres (WT) presentaron su morfología típica alargada, bordes regulares y homogéneos, rosetas simétricas, pocas células redondeadas o granuladas y múltiples células en división (Fig. 4-2A y video suplementario 4). Estos parásitos en epifluorescencia no evidenciaron ninguna señal (Fig. 20B). Promastigotes electroporados en agua fueron incapaces de crecer en medio con geneticina y no presentaron fluorescencia (Fig. 4-2C-D). Promastigotes *L. L. amazonensis* electroporados con pSP tampoco sobrevivieron (datos no mostrados). Promastigotes electroporados con pSP y expuestos a geneticina proliferaron en este medio (Fig. 20E, y video suplementario 5), y presentaron fluorescencia (Fig. 4-2F y video suplementario 6), la cual se encontró distribuida en todo el parásito, con especial concentración en núcleo y kinetoplasto (Fig. A.6). No se observaron cambios aparentes en forma, movilidad de los promastigotes o rosetas.

Figura 4-2: Promastigotes de *L. V. braziliensis* en suspensión no sometidos y sometidos a transformación con pSP.

A) Promastigotes WT en luz. B) epifluorescencia de células vistas en A; C) promastigotes WT electroporados + H₂O+ geneticina en luz; D) epifluorescencia de células vistas en C; E) promastigotes WT + pSP + geneticina en luz; F) epifluorescencia de células vistas en E.

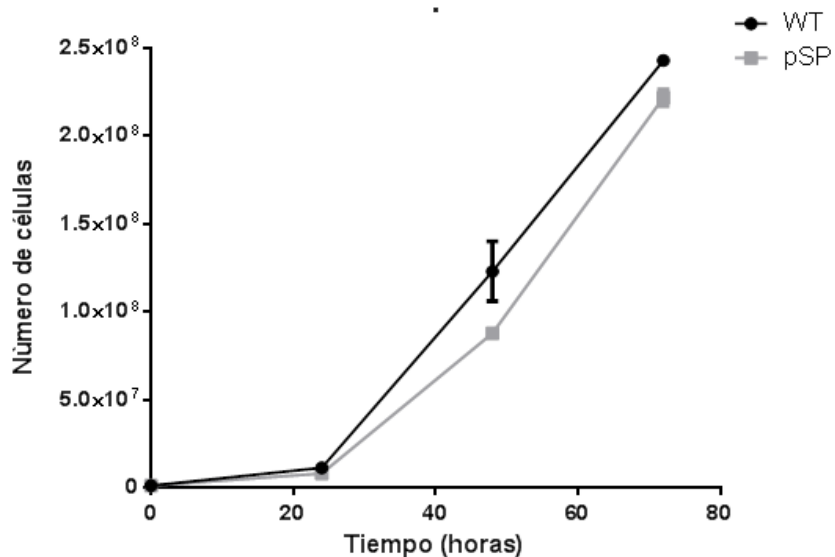


4.2.2 pSP altera la tasa de crecimiento de promastigotes *L. V. braziliensis*

Se realizaron curvas de crecimiento comparativas entre WT y pSP durante 72 horas. A las 48h horas la media de parásitos WT fue $123\ 110.000 \pm 17\ 008.322$ mientras que en el mismo tiempo se observó una disminución de 28% ($p < 0,01$) en los pSP (Fig. 4-3). A las 72 horas esta reducción persiste.

Figura 4-3: Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. V. braziliensis* WT y electroporados con pSP.

Todos los promastigotes crecieron en medio Schneider suplementado con 10% de SFB a 27°C. Se presenta la media y el error estándar de la misma (n = 6) durante 72 horas.



4.2.3 pSP provoca interferencia de α -tubulina en promastigotes de *L. V. braziliensis*

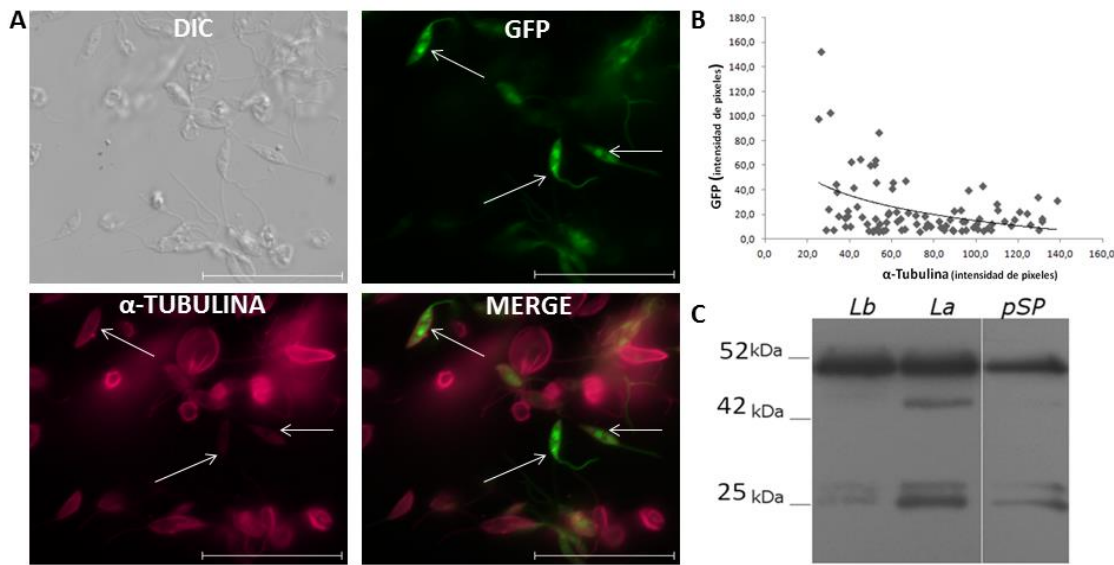
La localización de α -tubulina en promastigotes transformados con pSP se valoró por microscopía de epifluorescencia (Fig. 4-4A). Esta proteína se encontró perimembranal. Sin embargo, aquellos promastigotes pSP con mayor expresión de GFP (Fig. 4-4A), tuvieron reducción en la intensidad de señal para α -tubulina (Fig. 4-4A flechas). Se encontró una tendencia inversamente proporcional entre las señales analizadas (coeficiente de correlación $r = 0,164$), indicando que la expresión de GFP reduce la expresión de α -tubulina (n = 96, Fig. 4-4B).

Se realizó cuantificación de la reducción de α -tubulina mediante *Western Blot* (Fig. 4-4C). La intensidad de las bandas de α -tubulina en *L. L. amazonensis* sugiere mayor expresión de estas proteínas en este parásito en vista que se cargó la misma cantidad de

proteína (Fig. 22C). No obstante, se aprecia disminución de un 60% en la intensidad de la banda de 52kDa de α -tubulina en EPT de promastigotes *pSP* (Fig. 4-4C), así como de la segunda banda cercana a 47kDa. Estos datos sugieren que *pSP* induce interferencia de esta proteína.

Figura 4-4: *pSP* reduce la expresión de α -tubulina en promastigotes de *L. V. braziliensis*.

A) Fotografías de promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con *pSP* e inmunomarcados con anti- α -tubulina. Las flechas resaltan los promastigotes con mayor fluorescencia GFP y menor fluorescencia para α -tubulina. Las líneas denotan 20 μ m. B) Cuantificación por pixeles de las intensidades de fluorescencia para GFP vs α -tubulina. C) Western Blot usando EPT de promastigotes de *L. V. braziliensis* (Lb), *L. L. amazonensis* (La) y *L. V. braziliensis*+ *pSP* inmunomarcaje para α -tubulina.



4.2.4 *pSP* altera la disminución regulatoria de volumen (DRV) en promastigotes de *L. V. braziliensis* ante retos osmolares severos

Se exploró el impacto de soluciones hipotónicas en la DRV. Se encontró que los promastigotes WT ante una solución 300mOsm/L experimentan inicialmente una ganancia de volumen de 7,2% durante los primeros 60 segundos (Fig. 4-5A), seguido de la DRV esperada. Este hallazgo sugiere que *Leishmania* es capaz de detectar cambios de osmolaridad de sólo 10% (330mOsm/L osmolaridad del medio de cultivo). Una

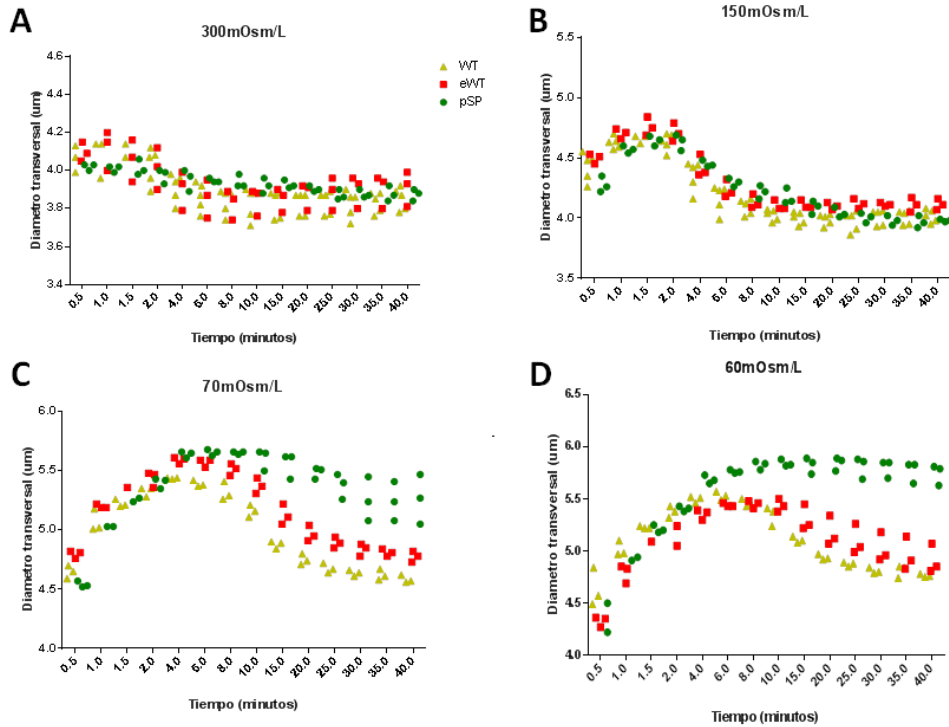
respuesta similar de mayor ganancia de volumen (19%) y ajuste en un tiempo mayor (10min) se observó en solución 150mOsm/L (Fig. 4-5B). A estas dos osmolaridades los promastigotes *pSP* mostraron el mismo comportamiento.

Sin embargo, cuando los WT se sometieron a retos hipotónicos de 70 y 60mOsm/L, se encontró aumento de volumen de 38,5% y 43,6% respectivamente que se ajustaron a 30 min pero cuya línea de base fue 17% y 23% mayor con respecto a la encontrada a 330 mOsm/L. En contraste los promastigotes *pSP* presentaron ajuste pobre de regulación de volumen a 70mOsm/L que se pierde completamente a 60mOsm/L (Fig. 4-5C y D).

Estos datos sugieren, que *pSP* altera la respuesta regulatoria de decremento de volumen de promastigotes ante osmolaridades < 70 mOsm/L.

Figura 4-5: Cambios en el volumen de promastigotes de *L. V. braziliensis* ante distintos retos osmóticos.

A) 300mOsm/L; B) 150mOsm/L; C) 70mOsm/L; D) 60mOsm/L. WT: fenotipo Silvestre; eWT: silvestre + electroporación sin geneticina.

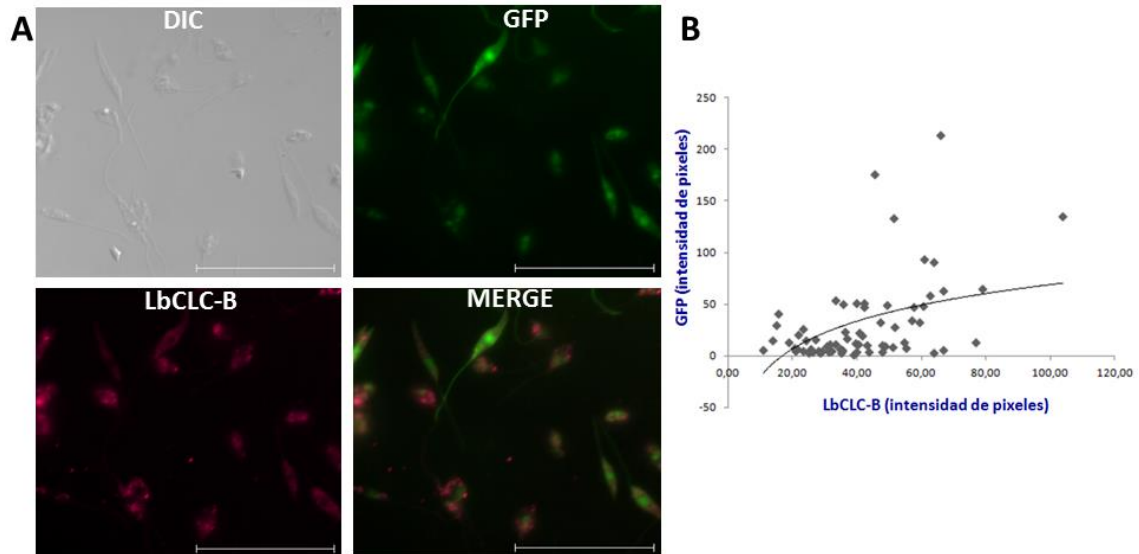


4.2.5 pSP no compromete la expresión de LbCLC-B.

Se exploró el efecto de pSP sobre cantidad relativa y ubicación de LbCLC-B, por inmunofluorescencia. La localización de esta proteína en promastigotes pSP es similar (Fig. 4-6 A) a la encontrada en WT (Fig. 2-5B). Se observó además que si bien la intensidad de fluorescencia de GFP no es igual entre parásitos (Fig. 4-6A GFP), aquellos con mayor señal de GFP, tuvieron mayor intensidad de fluorescencia para LbCLC-B (Fig. 4-6A merge). Análisis comparativo de la intensidad de señales GFP vs LbCLC-B, mostró una relación directa entre estas (Fig. 4-6B, coeficiente de correlación $r = 0,182$), indicando que no habría efecto deletéreo de pSP sobre LbCLC-B.

Figura 4-6: pSP vacío no reduce los niveles de LbCLC-B.

A) Promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con pSP vacío e inmunomarcados con anti-LbCLC-B. Las líneas denotan 20 μm B) Relación entre intensidad de fluorescencias de GFP y LbCLC-B medida en escala de grises (n=70).



5. Capítulo Reducción del 13% en la expresión de LbCLC-b en promastigotes se asocia con cambios en regulación de volumen

5.1 Materiales y métodos

Cultivos celulares, obtención de extractos de proteína total, separación de éstos por electroforesis en SDS-PAGE, Western Blot, inmunofluorescencias y valoración de número y volumen de promastigotes, así como el análisis de los datos fueron descritos en materiales y métodos de capítulos 2 y 4.

5.1.1 Generación de fragmentos interferentes contra LbCLC-B

Se analizó la secuencia de LbCLC-B para diseñar cebadores. Con ellos se generaron fragmentos parciales sencillos. Se diseñaron oligonucleótidos sentido con el sitio de restricción Xba I, seguido de una región específica del gen LbCLC-B (Tabla 5-1). Los cebadores antisentido, tenían un sitio de restricción EcoR I, seguido de 10 nucleótidos CTGTAGGCAC (Atayde et al., 2012) y 50 nucleótidos al azar (con el objetivo de formar la horquilla), culminando con una región específica del gen LbCLC-B (30 nucleótidos) que generaran fragmentos entre 150 y 500 pb (Tabla 5-1).

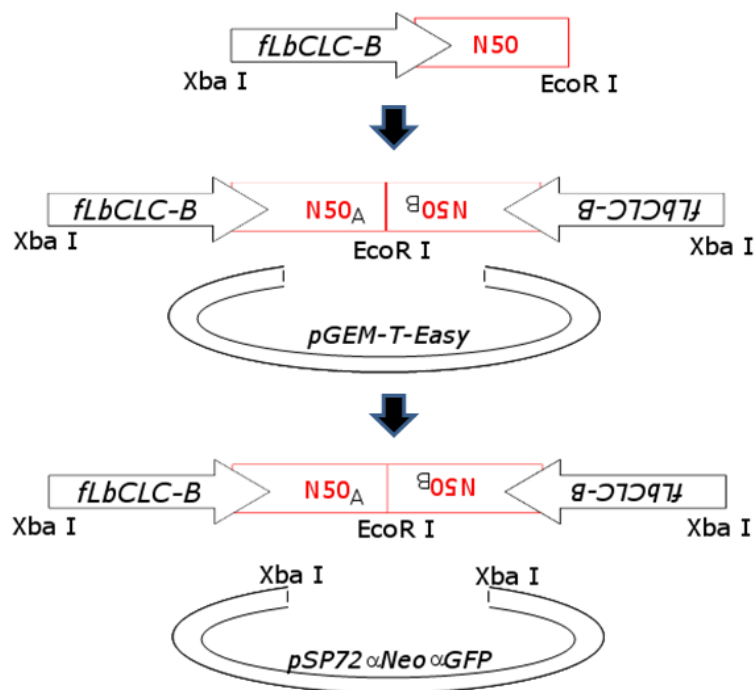
Tabla 5-1: Oligonucleótidos de interferencia específicos LbCLC-B.

Oligonucleóti do	Secuencia (5'->3')	Combinaci ón	Producto sencillo (pb)
<i>LbCLC-B</i> Fw 1	<u>TCTAGA</u> ATGAGTGCACGGTACGGCACTG CT	F1R1	285 + 50
<i>LbCLC-B</i> Fw 2	<u>TCTAGATA</u> AAATCGTTCTCGAGCGCCACTG TTT	F1R2	414 + 50
<i>LbCLC-B</i> Rv 1	<u>GGAATTC</u> CCTGTAGGCACNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNAGTAGTACTGACGCGGT GAACGAGGGATTGA	F2R1	140 + 50
<i>LbCLC-B</i> Rv 2	<u>GGAATTC</u> CCTGTAGGCACNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNATTCAGCTTCACCTCCG CAAGGTAGTCTA	F2R2	269 + 50

Los oligonucleótidos *sentido* los sintetizó Metabion[®], mientras que los *antisentido* Macrogen[®].

Se seleccionaron esos tamaños porque aquellos menores de 150pb no son eficientes en interferencia, y si son mayores de 500pb, son difíciles de propagar en *E. coli* (Atayde *et al.*, 2012), La figura 25 resume los pasos a seguir para la generación de los fragmentos dobles invertidos y su ligación en *pSP*.

Figura 5-1: Diagrama del diseño experimental general empleado para generar fragmentos interferentes LbCLC-B. Modificado de (Atayde et al., 2012).



El constructo *pGEM-T-Easy+LbCLC-B* clonado por Quintero (Quintero, 2014), se usó como plantilla para amplificar por PCR los oligonucleótidos descritos. Se generaron amplicones sencillos con los sitios de restricción Xba I y Eco RI en sus extremos, usando distintas combinaciones de cebadores y temperaturas de anillamiento (Fig. 26A). En todos los casos se consiguió amplificar con éxito fragmentos del peso esperado (Tabla 10) para F1R1, F1R2, F2R1 y F2R2 (Fig. 26A), y se escogió para la amplificación temperaturas de anillamiento entre 63-65°C.

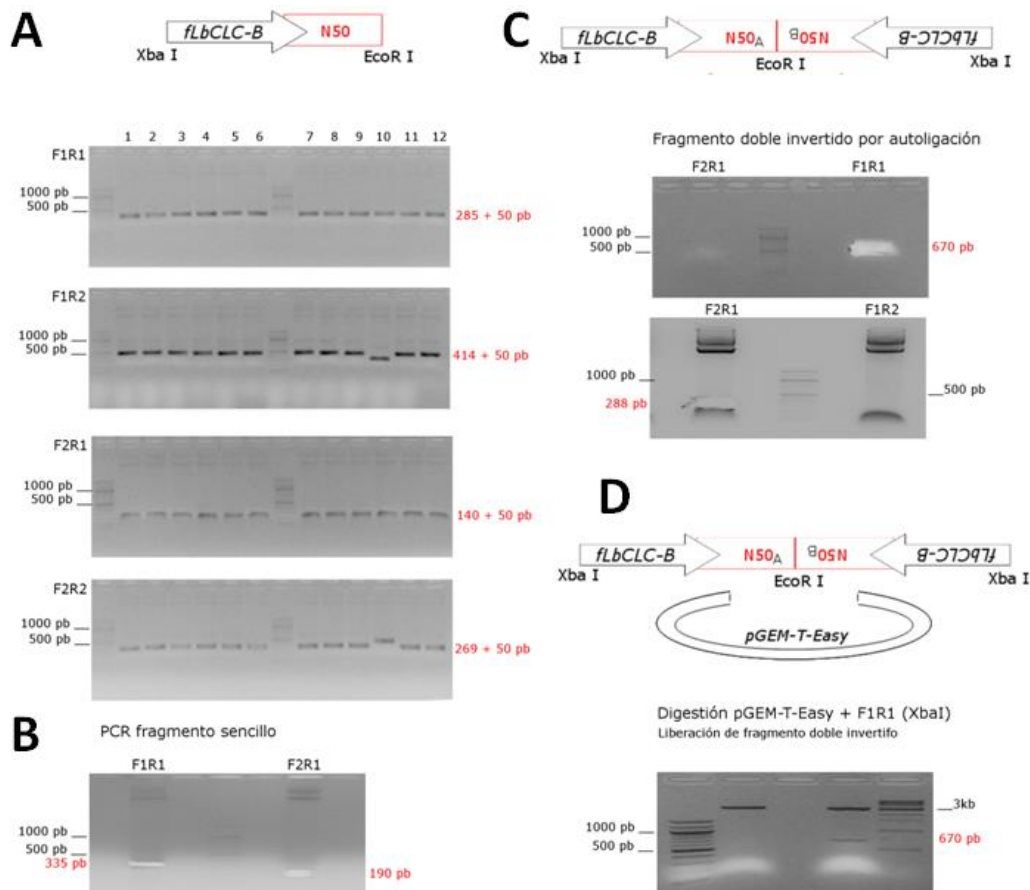
Se realizaron PCRs para amplificar fragmentos sencillos *LbCLC-B* F1R1 y F2R1 para obtener 5 ug de cada fragmento. El resultado de la amplificación reveló la presencia de una banda F1R1 de ≈335pb y otra F2R1 de ≈190pb. Ambas bandas fueron cortadas (Fig. 26B) y purificadas. Posteriormente, los fragmentos sencillos se digirieron con Eco RI (Fig. 26C). Los productos de esta ligación se separaron por electroforesis en gel de agarosa obteniéndose una banda de ≈670pb para F1R1-R1F1 y otra de ≈288pb para F2R1-R1F2. Ambas fueron cortadas (Fig. 26C).

Los fragmentos dobles invertidos fueron purificados, digeridos con Xba I y ligados a *pGEM-T-Easy* (Fig. 26D). Para verificar la inserción de F1R1-R1F1 y F2R1-R1F2 se digirieron los constructos con Xba I (Fig. 26D). En este paso sólo se obtuvo inserto del peso esperado para F1R1-R1F1 (i.e. 670pb). El constructo *pGEM-T-Easy_LbCLCB_F1R1-R1F1*, se amplificó en *E. coli DH5α* a partir de la cuales se aisló DNA plasmídico. Éste se secuenció y mostró dos sitios Xba I flanqueando regiones *LbCLC-B* (Anexo 5.2 y 5.3).

El fragmento doble invertido F1R1-R1F1 fue ligado a *pSP* previa digestión Xba I. Con el constructo obtenido se transformaron bacterias *E. coli DH5α*. La eficiencia de esta transformación baja. Se seleccionaron al azar las colonias *iC1*, *iC2* e *iC3* y se amplificaron. Posteriormente se aisló DNA plasmídico de cada una.

Figura 5-2: Generación de fragmentos dobles invertidos contra LbCLC-B.

A) Esquema del fragmento sencillo LbCLC-B y gradientes de temperatura para determinar el rango óptimo de amplificación de varios fragmentos LbCLC-B usando distintas combinaciones de cebadores. B) Amplificación, y purificación a partir de gel de fragmentos F1R1 y F2R1 específicos contra LbCLC-B. C) Esquema y obtención del fragmento doble invertido esperado luego de digestión de fragmentos sencillos con EcoR I y autoligación. D) Dibujo de ligación del fragmento doble invertido específico F1R1 LbCLC-B en pGEM-T-Easy y su liberación luego de digestión con Xba I.

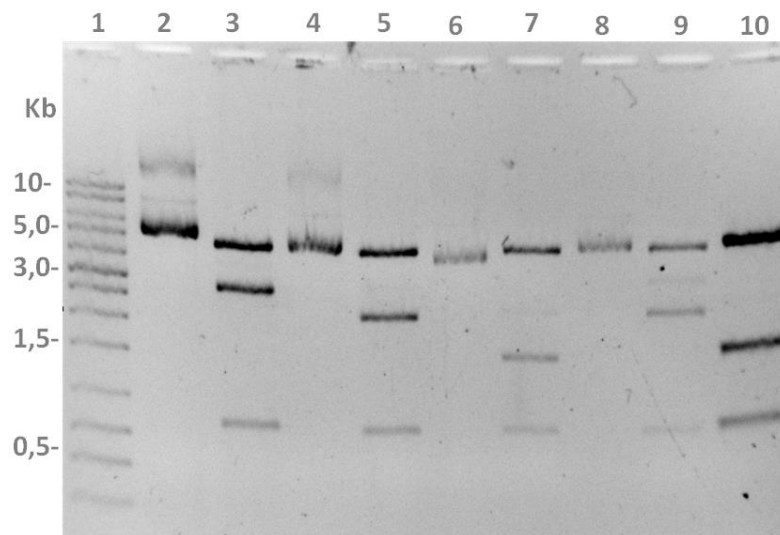


Para verificar la presencia del fragmento doble invertido F1R1-R1F1 específico anti-LbCLC-B, se realizó un mapa de restricción con las enzimas Hind III y Pst I. Para el vector vacío se esperaban tres fragmentos de 4484, 1546 y 806pb (Fig. 27 carril 10). Si los plásmidos aislados *iC1*, *iC2* e *iC3* tenían el inserto de interferencia, la banda de 1546 pb sería de mayor tamaño. El mapa de restricción muestra plásmidos no digeridos y digeridos (Fig. 27). Los carriles tres y siete presentan las bandas obtenidas luego de la

digestión de *iC1* e *iC3* respectivamente. Se observa que la banda intermedia tiene peso de ≈ 2200 pb, indicativo de la presencia del fragmento interferente (670 pb). En contraste, el plásmido *iC2* (carril 5) tiene un patrón de bandeado igual a *pSP* (carril 10) por lo que se concluye que carece del fragmento doble invertido. Las bandas de ≈ 670 pb de *iC1* e *iC3* fueron cortadas, el DNA plasmídico fue purificado y enviado a secuenciar (A.5.3).

Figura 5-3: Mapa de restricción de plásmidos *iC1*, *iC2* e *iC3*.

Gel de agarosa al 0,8% con plásmidos *pSP* más fragmentos F1R1 dobles invertidos aislados de tres colonias distintas y sometidos o no sometidos a digestión con *Hind* III y *Pst* I.1) Marcador de peso molecular; 2) DNAp extraído de colonia transformada con interferente LbCLC-A, *iE1* (Zapata AC, tesis doctoral); 3) *iE1* digerido; 4,6,8) DNAp proveniente de colonias transformadas con el constructo *pSP* +F1R1 doble invertido LbCLC-B, *iC1*, *iC2* e *iC3* no digeridos respectivamente; 5,7,9) *iC1*, *iC2* e *iC3* digeridos respectivamente; 10) *pSP* vacío digerido.



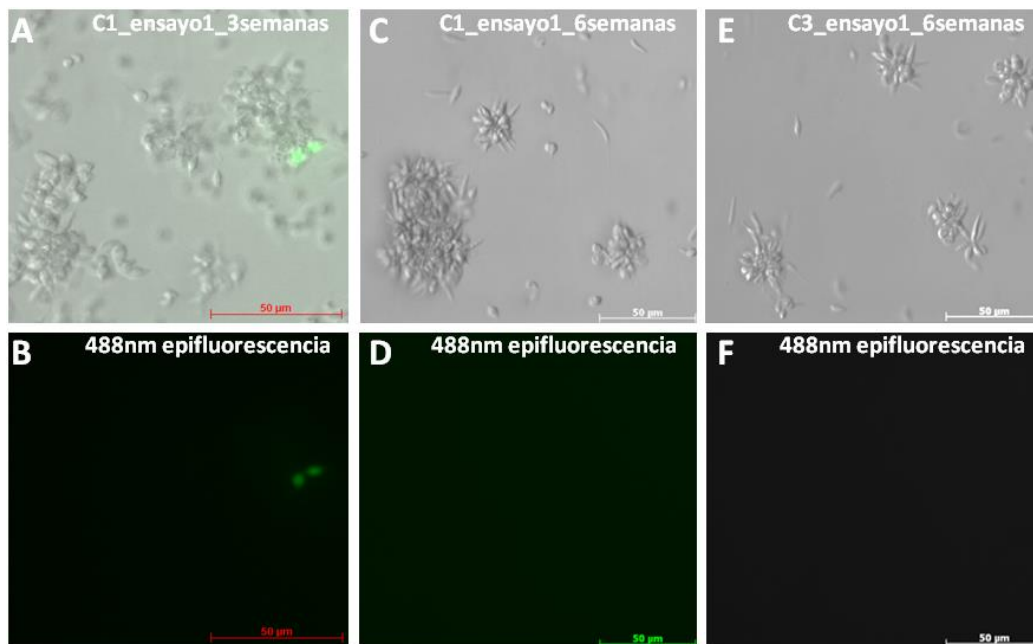
5.2 Resultados

5.2.1 Promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con plásmidos iC1 e iC3 tienen fluorescencia verde transitoria pero resistencia permanente a geneticina

Los parásitos *iC1* e *iC3* presentan una forma más redondeada, granulada y con mayor agregabilidad en tiempos más cortos (Fig. 28 A, C, E, y video suplementario 7). Sin embargo, a diferencia de los promastigotes *pSP* se detectó fluorescencia conspicua sólo en la primera semana, que se redujo hacia la semana 3 (Fig. 28B, video suplementario 8), para desaparecer por completo en la semana 6 (Fig. 28 D y F), aun cuando persistió la resistencia a geneticina.

Figura 5-4: Promastigotes *L.V. braziliensis* transformados con plásmidos *iC1* y *iC3* interferentes LbCLC-B.

A) Parásitos *iC1* en luz trascurridas tres semanas de electroporación B) promastigotes de A, expuestos a fluorescencia; C) parásitos *iC1* en luz luego de seis semanas de electroporación; D) células de C, en fluorescencia; E) parásitos *iC3* en luz trascurridas seis semanas de electroporación; F) promastigotes de E, en fluorescencia.

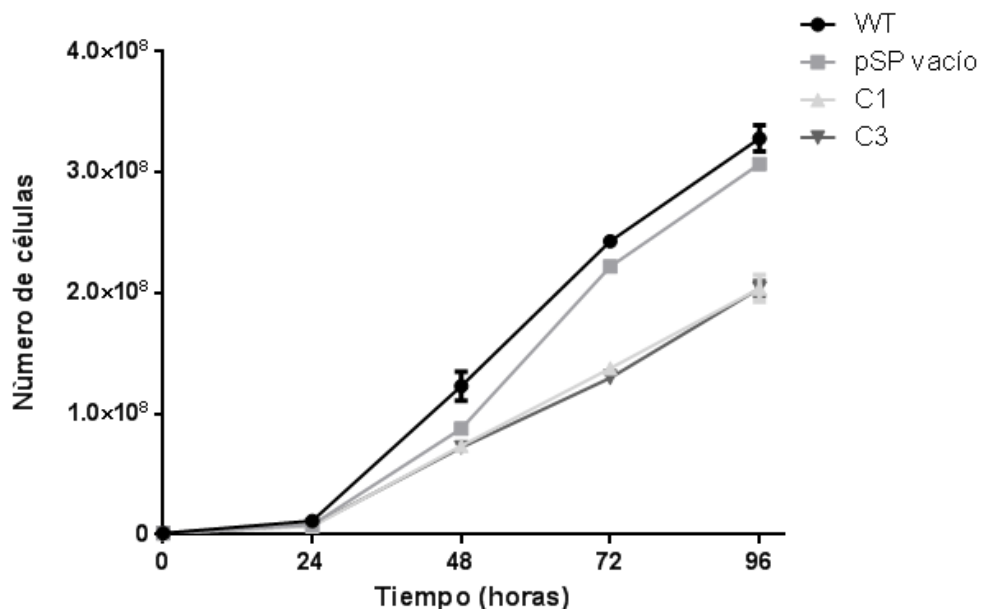


5.2.2 Promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con *iC1* y *iC3* presentan una tasa de crecimiento menor.

No se detectaron diferencias significativas entre los cuatro grupos, $p = 0,760$ al tiempo 0 (Fig. 29). A las 24 horas tampoco se observaron diferencias en la tasa de crecimiento entre los cuatro grupos ($p = 0,123$). No obstante, a partir de las 48 horas de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de crecimiento entre los grupos analizados, siendo mayor en WT (mediana: $123,1 \times 10^6$; RI: 111,1-135,1) vs *pSP* (mediana: $87,8 \times 10^6$; RI: 87,7 – 88,1), *iC1* (mediana; $73,5 \times 10^6$; RI: 72,1-74,9) e *iC3* (mediana: $72,2 \times 10^6$; RI: 70,2-74,3) ($p = 0,008$). El efecto detectado no se atribuye al vector, puesto que los parásitos *pSP* crecieron más rápido que *iC1* e *iC3* ($p = 0,048$). Para las 72 horas la diferencia detectada fue aún mayor. Tomando como 100% la tasa de crecimiento de *pSP*, se encontraron tasas 38% y 41% menores para *iC1* e *iC3* ($p < 0,001$) respectivamente (Fig. 5-5).

Figura 5-5: Curvas de crecimiento comparativas entre promastigotes de *L.V. braziliensis* no transformados y transformados con *pSP*, *iC1* e *iC3*.

(●) WT; (■) *pSP* vacío; (▲) *iC1* y (▼) *iC3*. En todos los casos se grafica la media y el error estándar de la misma ($n = 3$). Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres periodos de tiempo distintos. Se presentan los datos más representativos.

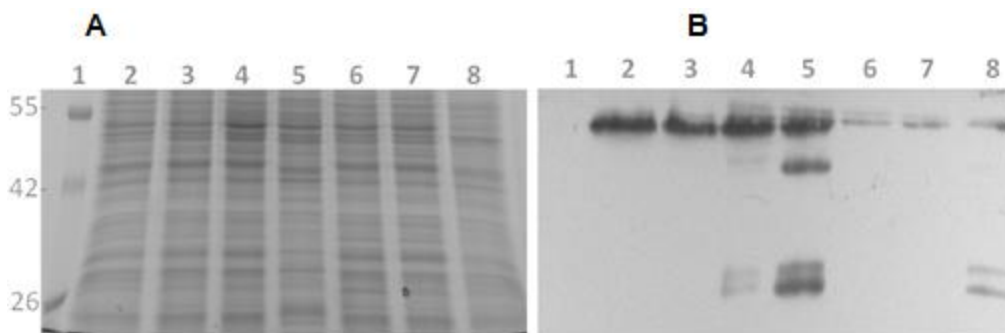


5.2.3 Promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con *iC1* e *iC3* tienen un patrón de bandeo de α -tubulina diferente a *pSP* y WT

Se realizó SDS-PAGE (Fig. 30A, empleado como control de carga) y *Western Blot* para detectar la expresión de α -tubulina. Se encontraron 5 bandas en ETP de promastigotes *L. V. braziliensis* (Fig. 30B carril 4) y *L. L. amazonensis* (Fig. 5-6B carril 5) de 25, 29, 47, 52, 54 kDa, siendo la de 52 kDa la de mayor intensidad (Fig. 5-6B). Para *pSP* se detectaron las mismas 5 bandas pero su intensidad es menor en particular para las bandas de 54 y 47kDa (Fig. 30B, carril 8). Sin embargo, llama la atención la pérdida aparente de las bandas de 47, 29 y 25 kDa en los parásitos *iC1* e *iC3* (Fig. 5-6B, carriles 3 y 7 respectivamente), que no puede atribuirse sólo al vector.

Figura 5-6: Inmunodetección de α -tubulina en EPT de promastigotes de *Leishmania* no transformados y transformados con *iC1* e *iC3*.

A. SDS-PAGE al 16% teñido con azul Coomassie; B. Membrana de nitrocelulosa expuesta a anti- α tubulina. 1) Marcador de peso molecular; 2) *iE1*; 3) *iC1*; 4) *L.V. braziliensis* WT; 5) *L. L. amazonensis* WT; 6) *iC1*; 7) *iC3*; 8) *pSP*.



5.2.4 Promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con *iC3* tienen reducción del 13% en la expresión de *LbCLC-B*

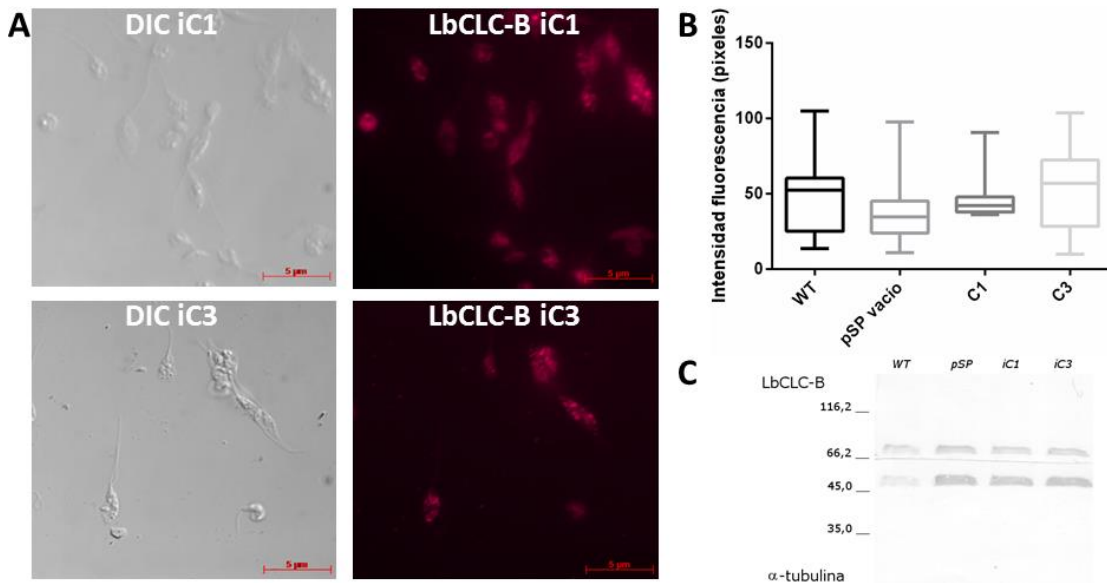
Se marcaron promastigotes transformados con *iC1* e *iC3* con anti-*LbCLC-B* (Fig. 31A). La localización es intracelular puntiformesicular y aparentemente igual entre todos los grupos evaluados. Al cuantificar las intensidades de fluorescencia para *LbCLC-B*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre *iC1* (mediana: 42,3; RI:

37,9-47,2), *iC3* mediana: (57,1; RI: 32,9-67,5), *pSP* (mediana: 34,7; RI: 24,5-43,4) y WT (mediana: 52,6; RI: 26,8-59,4) ($p = 0,142$, Fig. 31B).

Adicionalmente, se cuantificó LbCLC-B por *Western Blot*. La comparación entre el área e intensidad de las bandas de α -tubulina/LbCLC-B, arroja un cociente de 0,87 para WT, 0,85 *pSP*, 0,86 en *iC1* y 0,73 en *iC3*. La diferencia de 13,5% (Fig. 31C) entre *pSP* y *iC3*, sugiere disminución de LbCLC-B en estos parásitos.

Figura 5-7: Promastigotes sometidos a transformación con *iC3* muestran reducción del 13% en la expresión de LbCLC-B.

A) Promastigotes transformados con *iC1* e *iC3* vistos en luz e inmunomarcados con anti-LbCLC-B. B) comparativo de las intensidades de fluorescencia entre promastigotes WT (Fig. 7), *pSP* (Fig. 22), *iC1* e *iC3*. C) Western Blot a partir de EPT de promastigotes de *L.V. braziliensis* WT, y transformados con *pSP*, *iC1* o *iC3*. Se realizó marcación con anti-LbCLC-B y anti-tubulina.



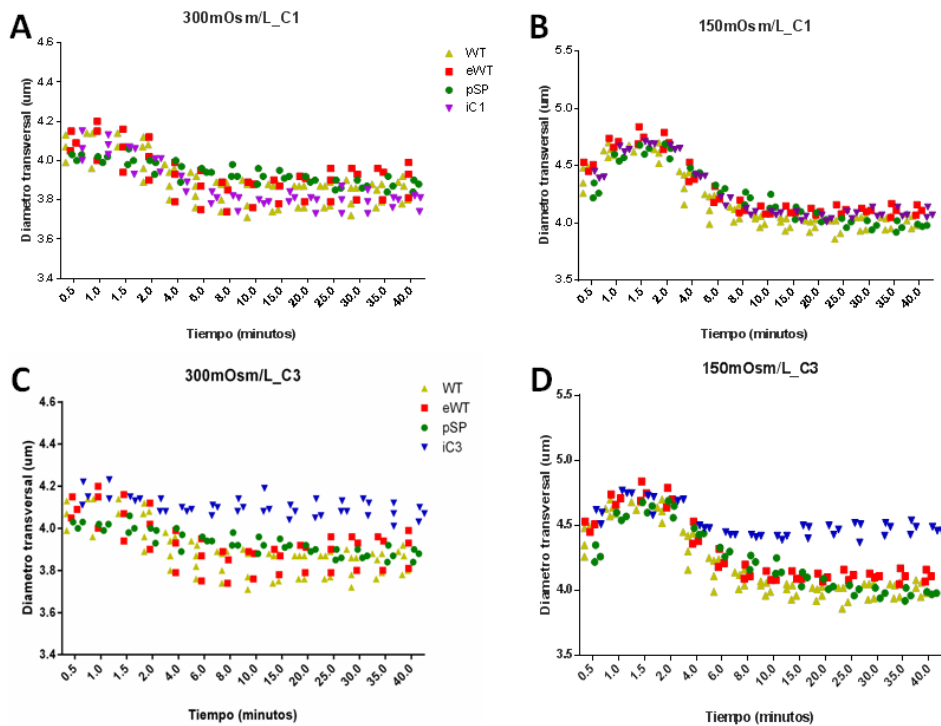
5.2.5 Promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con *iC3* tienen una respuesta alterada de decremento de volumen ante retos hipotónicos

Con los hallazgos de volumen de base mayor (Fig. 28), pérdida aparente de isoformas de α -tubulina en *iC1* e *iC3* (Fig. 30 B), y reducción del 13% en la expresión de LbCLC-B para

promastigotes transformados con *iC3* (Fig. 31 B) se determinó la respuesta de decremento regulado de volumen en estos parásitos ante un reto hipoosmolar. Por tanto promastigotes WT, eWT, *pSP*, *iC1* e *iC3* fueron expuestos a soluciones de 300 y 150mOsm/L (Fig. 32). Como se reportó previamente parásitos WT aumentan de tamaño y en los primeros minutos pierden el volumen ganado (Fig. 32A y B). A las osmolaridades estudiadas una respuesta similar se observó para eWT, *pSP* e *iC1* (Fig. 32A y B). En contraste, *iC3* a 300mOsm/L tienen un diámetro transversal significativamente mayor respecto a los demás grupos evaluados ($p = 0,016$), ganan volumen en respuesta a las soluciones hipotónicas, hacen un ajuste inicial en los primeros 6 minutos en la solución 150mOsm/L pero no logran retornar al volumen de base durante la ventana de tiempo observada ($p = 0,001$; Fig. 32C y D).

Figura 5-8: La disminución regulatoria de volumen está alterada en promastigotes transformados con *iC3*.

A y C) 300 mOsm/L; B y D) 150 mOsm/L; WT: WTele: silvestre + electroporación sin genética.

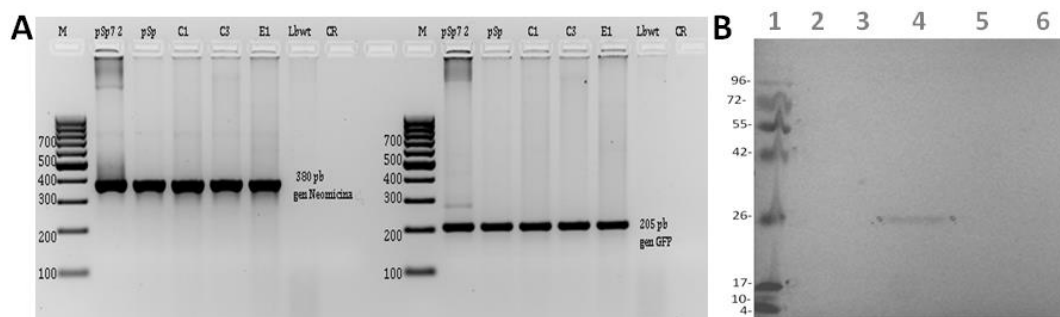


5.2.6 A partir de DNA total proveniente de promastigotes transformados con *iC1* e *iC3* se pueden amplificar los genes de resistencia a neomicina y de fluorescencia verde

Se determinó por PCR si había pérdida de los genes NEO y GFP que pudieran explicar la ausencia de fluorescencia en los promastigotes transformados con *iC1* e *iC3*. Usando DNA total de promastigotes WT, *pSP*, *iC1* e *iC3* se amplificó un producto de 380pb del gen neomicina fosfotransferasa y un producto de 205pb del gen GFP-S65T (Fig. 33A). Conforme a lo esperado, en el DNA de promastigotes WT no se detectaron bandas (Fig. 33A Lbwt). En los demás DNAs se observaron productos del peso esperado para los genes neo y GFP (Fig. 33A), sugiriendo la presencia de DNA plasmídico y descartando que la pérdida de fluorescencia se explique por ausencia del gen.

Figura 5-9: Los promastigotes transformados con *iC1* e *iC3* tienen los genes de resistencia a neomicina y GFP.

A) Gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones NEO y GFP obtenidos a partir de DNA total de promastigotes WT (Lbwt), *pSP*, *iC1*, *iC3* e *iE1*. Excepción: *pSP72* = plásmido purificado. CR= control negativo sin DNA. M: marcador de peso molecular; B) Membrana de nitrocelulosa expuesta a anti- α -GFP. 1) Marcador de peso molecular; 2) EPT de L.V. *braziliensis* WT; 3) EPT de L.L. *amazonensis* WT; 4-6) EPT de L.V. *braziliensis* transformados con *pSP*, *iC1* e *iC3* respectivamente.



Aceptando que la caída de 13,5% en la cantidad de LbCLC-B encontrada en *iC3* y los fenotipos observados en *iC1* y *iC3*, son resultado de interferencia diferencial de esta proteína, la ausencia de señal fluorescente de GFP podría ser resultado de fotoblanqueado a pH ácido (Tsien, 1998), o mutaciones adquiridas que comprometan su fluorescencia. Para corroborar esto se realizó *Western Blot* con un anticuerpo anti-GFP en WT, *pSP*, *iC1* e *iC3*. Se detectó banda del peso esperado (27kDa) para GFP sólo en

EPT *pSP*, coherente con el fenotipo observado (Fig. 33B carril 4). Este resultado explica la carencia de fluorescencia en *iC1* e *iC3*

6. Capítulo Discusión

Este trabajo buscó determinar cuál es la función de la proteína putativa LbCLC-B en *L. V. braziliensis*. Partiendo del *a priori* que la localización de una proteína se asocia con su función, se determinó la ubicación de LbCLC-B en promastigotes. Para esto se generó un anticuerpo específico que reconoce una banda única de menor peso al esperado sugestivo de procesamiento postraducciona (Fig. 5).

Estudios de inmunolocalización indican que LbCLC-B es intracelular, puntiformesicular (Fig. 7), y colocaliza parcialmente con el Complejo de Golgi. Gef 1, el único CLC de *S. cerevisiae*, se encuentra en el este compartimiento (Schwappach *et al.*, 1998). La levadura *knock out* Δ gef1, es incapaz de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables o en medios con glucosa, pobres en hierro (Greene *et al.*, 1993). Estos fenotipos se asocian con un defecto en el acoplamiento de Cu^{2+} a la enzima apoFet3p y puede darse por carencia de la bomba encargada de concentrar este catión (Gaxiola *et al.*, 1998).

S. cerevisiae presenta dos sistemas de transporte de Fe, uno de baja afinidad cuando hay suficiente cantidad de este metal en el medio y otro de alta afinidad. Este último se activa en medios pobres en hierro ya que es represor de los genes *fet3* y *ftr1*. Responsables de codificar apoFet3p (oxidasa de Cu^{2+} que convierte Fe^{2+} en Fe^{3+}), y Ftr1p (permeasa requerida para su transporte). El acoplamiento Cu^{2+} -Fet3p ocurre en el complejo de Golgi y la disponibilidad de Cu^{2+} está mediada por la ATPasa Ccc2p (Gaxiola *et al.*, 1998). Se postula que Gef1 es un intercambiador Cl^-/H^+ (Huang *et al.*, 1994), que serviría de *shunt* para la función de la ATPasa (Gaxiola *et al.*, 1998), favoreciendo así entrada de Cu^{2+} . El cobre al acoplarse a apoFet3p la activa y se transportada a la membrana. Junto con Ftr1p permiten entrada de Fe ante restricción de éste en el medio.

Se ha observado también que el acoplamiento Cu^{2+} -Fet3p depende de la concentración de Cl^- y por tanto este anión sería efector alostérico para la carga de Cu^{2+} , por lo que la entrada de Cl^- a cargo de Gef1 en este compartimiento es relevante (Davis-Kaplan *et al.*,

1998) . Más aún, Gef1 ha sido implicado en homeostasis de pH y glutatión en compartimentos intracelulares (Braun *et al.*, 2010), y de ubicarse en la membrana plasmática sería, al menos parcialmente, responsable de transportar Cl⁻ (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2007) . Un rol similar favoreciendo la maduración de transportadores en el Complejo de Golgi podría ser función de LbCLC-B. Igualmente, Sugerir menor supervivencia en medios pobres en Fe como es el caso de Gef 1 (Greene *et al.*, 1993), es permitido por la localización (Schwappach *et al.*, 1998), común de LbCLC-B y Gef 1 (Fig. 10-11).

Este trabajo mostró por primera vez que la distribución de LbCLC-B es diferencial con respecto a LbCLC-A que es membranal-perimembranal (Fig. 6), y a LbCLC-C que está segregado a pocas vesículas de mayor volumen (Fig. 8). Lo anterior indicaría funciones complementarias de los tres transportadores de Cl⁻ en la fisiología del promastigote de *Leishmania*. Igualmente, se encontró que el patrón de fluorescencia de LbCLC-B cambia en función del índice morfológico de los promastigotes de *L.V. braziliensis* (Fig. 9) sugestivo de estados morfológicos diferentes. Luego, dado que todos los CLC estudiados hasta el momento que tienen localización intracelular son intercambiadores (Jentsch, 2015) y estos transportan un catión a favor de su gradiente para concentrar un anión o viceversa la ubicación de LbCLC-B apoyaría este rol.

Experimentos posteriores para evaluar el mecanismo de transporte de LbCLC-A y LbCLC-B en ovocitos de *X. laevis* permitieron soportar la función de intercambiador. Por un lado, se encontró que LbCLC-A es una proteína que induce corrientes voltaje dependientes de baja amplitud al igual que LbCLC-B. Y que este último además, incrementa su conductancia a pH ácido. En vista de la localización nativa intracelular de LbCLC-B, es interesante que en estas células de anfibio se exprese en membrana plasmática. Sin embargo, dentro del repertorio de vesículas intracelulares, algunas de ellas se fusionan con la membrana plasmática, lo que explicaría la expresión transitoria de LbCLC-B allí. CLC-3, CLC-4 y CLC-5 se expresan en endosomas tempranos y se postula que recirculan entre estos compartimento y la membrana plasmática (Jentsch, 2015). Más específicamente, CLC-5 se localiza en endosomas tempranos de células epiteliales del túbulo contorneado proximal (Jentsch, 2015). Allí, se concentraría Cl⁻

disipando el gradiente de H^+ generado por una $V-H^+ATPasa$, lo que resultaría en regulación de la expresión de receptores y transportadores en la membrana plasmática (Novarino *et al.*, 2010). Sin embargo, Novarino y colaboradores no muestran datos específicos al respecto. Puede que LbCLC-A o LbCLC-B desempeñen un rol similar en promastigotes de *Leishmania*.

Estudios previos han documentado voltaje dependencia para los intercambiadores CLC-4 y CLC-5 (Picollo, Malvezzi, & Accardi, 2010; Friedrich, Breiderhoff, & Jentsch, 1999; Scheel, Zdebik, Lourdel, & Jentsch, 2005; Zdebik *et al.*, 2008; Picollo & Pusch, 2005; Steinmeyer, Schwappach, Bens, Vandewalle, & Jentsch, 1995) hacia los cuales se segrega LbCLC-A en los estudios filogenéticos (Lozano Jiménez, 2012). Steinmeyer y colaboradores por ejemplo mostraron corrientes con fuerte rectificación de salida y voltaje dependencia, luego de la inyección de *cRNA* de CLC-5 en ovocitos de *X. laevis* con amplitudes 10 veces mayores a las encontradas en sus controles y 3 veces las reportadas aquí en el Capítulo 3 (Steinmeyer *et al.*, 1995). Curiosamente la mayor amplitud de corriente la observaron en presencia de NO_3^- postulando una secuencia de conductividad $NO_3^- > Cl^- > Br^- > I^- \gg$ glutamato (Steinmeyer *et al.*, 1995).

Experimentos posteriores microinyectando CLC-4 y CLC-5 en ovocitos (Zdebik *et al.*, 2008) bajo condiciones similares a las de este trabajo mostraron corrientes macroscópicas de salida con fuerte rectificación, voltaje dependientes y con un E_{rev} de -25 mM. LbCLC-A presenta características similares, sin la rectificación marcada y estudios bioinformáticos del grupo sugieren al NO_3^- como el anión permeante predominante.

Un estudio piloto realizado por Parada en células CHO transfectadas con LbCLC-C encontró corrientes que aumentaron a pH 5 medidas mediante *patch clamp* (Parada, 2014). Si bien se ha mostrado sensibilidad a pH de las corrientes tanto de canales como intercambiadores CLC, el único CLC pH dependiente descrito a la fecha es EcCLC-1 (Accardi & Miller, 2004). En los estudios del grupo de Miller, las corrientes registradas en

esta proteína fueron estudiadas en bicapas en donde su comportamiento anómalo bajo el supuesto de electrodifusión mostró permeabilidad a otro ion y mejor ajuste a un modelo de intercambiador. Donde E_{rev} sería igual a: $E_{rev} = 1/1+r (E_{Cl^-}+rE_{H^+})$ (Accardi & Miller, 2004) siendo r el coeficiente estequiométrico.

Asumiendo que LbCLC-B es un intercambiador $2Cl^-/1 H^+$, entonces $r = 0,5$. Por tanto, a un pH_e : 5 y un pH_i : 7,2 (Webb & Nuccitelli, 1981), el E_{H^+} estimado sería +125,3 mV. Despejando los valores en la ecuación, se encuentra con un $E_{rev} = -41.3mV$, similar al potencial obtenido en los registros de las figuras 17 y 18. Apoyando la función de intercambiador Cl^-/H^+ para LbCLC-B.

Previamente, Picollo y Pusch, empleando el mismo modelo de *X. laevis* evaluaron el intercambiador CLC-5 $2Cl^-/H^+$ en distintas concentraciones de pH extracelular (i.e. 6 y 8), registrando corrientes de hasta 4 μ A (Picollo & Pusch, 2005). 3,5 veces por encima de las presentadas para LbCLC-A y LbCLC-B. En el contexto de *Leishmania* un intercambiador capaz de regular su tasa de transporte dependiendo del pH sería importante ante los cambios que enfrenta este parásito durante su ciclo de vida.

Adicionalmente, para complementar el entendimiento de LbCLC-B en la fisiología de *Leishmania* se evaluó la interferencia de esta proteína. En *L.V. braziliensis* horquillas de RNA relativamente largas son el mecanismo más eficiente para inducir interferencia (Atayde *et al.*, 2012). Por tanto, se diseñaron constructos que generaban esta estructura (Capítulo 5). Si bien la generación de parásitos modificados genéticamente ha sido muy útil en la comprensión de muchos de sus procesos fisiológicos (Laban *et al.*, 1990; Boucher *et al.*, 2002; Gourbal *et al.*, 2004; Ullu *et al.*, 2004; Inbar *et al.*, 2013; Atayde *et al.*, 2012), este trabajo mostró por primera vez que el plásmido *pSP72RaNeoaGFP* empleado como contenedor de los fragmentos de interferencia por sí sólo indujo cambios (Capítulo 4).

Se encontró disminución de los niveles de α -tubulina asociada a la expresión de GFP (Fig. 22). Hasta el conocimiento del autor, este sería el primer reporte de efectos deletéreos de GFP en *Leishmania*. Si bien hay reportes de estos eventos en otros modelos celulares (Liu, Jan, Chou, Chen, & Ke, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Mak, Wong, & Tsui, 2007).

Igualmente, se mostró en este trabajo la presencia de 5 bandas, luego de marcación con anticuerpo anti- α -tubulina en EPT de promastigotes de *Leishmania* (Fig.31). En 2013, Ramírez y colaboradores, describieron por bioinformática la estructura de los genes de α -tubulina en *L. V. braziliensis* cepa M2904 (la misma usada en este estudio), su organización genómica, y su expresión potencial en este parásito. A partir de sus análisis propusieron tres isoformas, a saber: prototípica (50kDa), α -tubulina-A (25kDa) y α -tubulina-B (29kDa) (Ramírez *et al.*, 2013). Se postula entonces que las bandas con pesos similares corresponden a estas isoformas, cuya transcripción había sido documentada (Rogers *et al.*, 2011) pero que aquí se confirmaría su expresión. La determinación de la identidad de las otras dos bandas se podría establecer purificándolas y realizándoles espectrometría de masas.

Los experimentos encaminados a reducir la expresión de LbCLC-B se llevaron a cabo con dos clones de promastigotes denominados *iC1* e *iC3*. Se encontró que eran resistentes a geneticina, pero perdían la fluorescencia al pasar 6 semanas. Asimismo, tenían una forma distinta (Fig. 28), tasas de crecimiento menores (Fig. 29), y bandaje de α -tubulina diferente a WT y *pSP* (Fig. 30B). Más aún para *iC3*, se detectó menor expresión de LbCLC-B y decremento regulatorio de volumen comprometido, apoyando interferencia exitosa pero diferencial de esta proteína (Fig. 31 C).

Vieira y colaboradores reportaron que la exposición de promastigotes *L. L.* mayor a un medio hipotónico pobre en cloruro (150 mOsm/L) causaba reducción en las reservas de aminoácidos intracelulares, particularmente prolina, alanina y treonina (Vieira & Cabantchik, 1995). Adicionalmente, Docampo y colaboradores han demostrado que los

aminoácidos están almacenados en *L. L. mexicana* en compartimentos específicos intracelulares denominados ácidocalcisomas, y que se movilizan dependiendo de las necesidades del promastigote (Docampo *et al.*, 2005). Los resultados presentados en la figura 12 corroborarían que el reto hipotónico induce la formación de puntiformesículas más grandes localizadas, marcadas con LbCLC-B y que se requieren para regular el volumen en el parásito. Por tanto, su función podría apoyar la concentración de aniones para el almacenamiento de aminoácidos, e indirectamente para regular el volumen. Los resultados de disminución en la expresión de LbCLC-B y pérdida de la respuesta de decremento regulatorio de volumen en promastigotes *iC3* (Fig. 32), corroborarían este rol.

¿Por qué pierden la fluorescencia *iC1* e *iC3*?

La presencia inicial de promastigotes resistentes a geneticina y fluorescentes sugiere interferencia exitosa de LbCLC-B. Sustentada en cambios morfológicos (Fig. 28), disminución de cantidad de proteína (Fig. 31C) patrón de movilidad alterado (video suplementario 7), alteraciones de α -tubulina (Fig. 30B) y pobre DRV para *iC3* (Fig. 32C-D), y descartaría alteración en el marco de lectura de GFP, para explicar la ausencia de señal. Como la pérdida de fluorescencia se dio antes de establecer *iC1* e *iC3*, no se cuenta con muestras de DNA o EPT previo a 6 semanas post-electroporación. Dado que el orden de transcripción del vector *pSP* es neomicina fosfotransferasa, F1R1-R1F1 y GFP (Fig. 19), y considerando que *iC1* e *iC3* son resistentes a geneticina pero perdieron su fluorescencia con el tiempo, se exploró el porqué de este evento.

En un primer escenario, el fenotipo observado en *iC1* e *iC3*, podría atribuirse a *pSP*. Se cuestionaría interferencia exitosa por la disminución marginal o nula de LbCLC-B (Fig. 31C) y se asumiría que en los parásitos en los que sí se logró, ésta fue letal, como se ha sugerido para genes indispensables (Atayde *et al.*, 2012). La pérdida de fluorescencia sería resultado de la expulsión del plásmido *iC1* e *iC3*, y la resistencia a geneticina se daría por incorporación en el DNA genómico del parásito, el casete neomicina fosfotransferasa flanqueado por una región intergénica del gen de tubulina de *L. enrietti*

(Laban *et al.*, 1990) ante la presión selectiva (geneticina 60µg/ml). De modo que la ausencia de amplificación de un fragmento del gen GFP a partir de DNA total de promastigotes transformados con *iC1* e *iC3* apoyaría esta explicación. Sin embargo, se encontró en ellos que el gen GFP está presente (Fig. 33A), pero su proteína no (Fig. 33B carriles 5 y 6).

Lo anterior podría explicarse porque no se traduce o se traduce pero es degradada rápidamente sin permitir su acumulación. Alteraciones de temperatura, pH y ambiente oxidoreductor pueden comprometer el plegamiento correcto de GFP (Tsien, 1998). Miembros de la superfamilia glutatión S-transferasa (GST) (Al *et al.*, 2015), contienen un sitio de unión a glutatión (GSH) dentro de su dominio tioredoxina conservado, conocido como sitio G (Al *et al.*, 2015). El sitio G de glutaredoxina puede ser monotiol, conteniendo un único residuo de cisteína (**Cys**-Gly-Phe-Ser) o ditiol (**Cys**-X-X-**Cys**) (Al *et al.*, 2015). Las proteínas miembros del último grupo actúan generalmente como oxidoreductasas tiol-disulfuro, mientras que los miembros monotiol, actúan como detoxificadores o proteínas de respuesta a estrés, formando mezclas de disulfuros entre glutatión y proteínas blanco, o tioles de bajo peso molecular (Al *et al.*, 2015). Considerando lo anterior y empleando la misma metodología de Al Khamici y colaboradores (Al *et al.*, 2015), se buscó identificar en la secuencia del gen *LbCLC-B* la presencia de un sitio-G, sugestivo de actividad oxidoreductasa (Fig. 34), encontrando en la posición 348 a 352 los aminoácidos **Cys**-Leu-Ser-**Cys**. Si bien no es claro por qué no se traduce GFP, o se traduce y degrada se podría especular que alteraciones en oxidoreducción asociadas con una probable función de *LbCLC-B* podrían explicar este evento, considerando que para *Gef1* se ha asociado este fenómeno (Braun *et al.*, 2010).

Figura 6-1: Sitio G oxidoreductor está presente en la secuencia LbCLC-B.

A) Sitio G conservado en miembros de la familia CLIC y LbCLC-B: Alineamiento de secuencias múltiples de proteínas humanas: CLIC 1-6; GST_Ω: glutatión-s-transferasa omega; Grx 1-3: glutararedoxinas 1-3. Se resalta en gris el sitio activo G glutararedoxina/tioredoxina. Números de acceso: CLIC1 (CAG46868), CLIC2 (CAG03948), CLIC3 (CAG46863.1), CLIC4 (CAG38532), CLIC5 (AAF66928), CLIC6 (NP_444507), GST-omega (AAF73376), Grx-1 (BAAO4769), Grx-2 (AAK83089), Grx-3(AAH0528289) y LbCLC-B: (gi:134065049). Alineamiento obtenido empleando ClustalW.

```

CLIC4      -----MALSMPLNGLKEEDKEPL-----IELFVKAGSDGESIGNCPFSQRLFMILW 46
CLIC5      -----MTDSATANG---DDSDPE-----IELFVKAGIDGESIGNCPFSQRLFMILW 43
CLIC6      GPAEGSGEAARVNGRREDGEASEPRALGQEHDIITLFVKAGYDGESIGNCPFSQRLFMILW 480
CLIC1      -----MAEQPQ-----VELFVKAGSDGAKIGNCPFSQRLFMVLW 35
CLIC2      -----MSGLRPGTQVDP-----EIELFVKAGSDGESIGNCPFCQRLFMILW 41
GST_Ω      -----MSGESARSLGKGSAPP-----GPVPEGSIRIYSMRFCPFAERTRVLK 43
Grx-1      -----MAQEFVNCKIQPGKVVVFIK-----PTCPYCRRAQEILS 34
Grx-2      E----SNTSSSLENLAT---APVNQIQETISDNCVVIFSK-----TSCSYCTMAKKLFH 88
Grx-3      DI IKELEASEELDTICPKAPKLEERLKVLTNKASVMLFMKGNKQE-AKCGFSKQILEILN 272
LbCLC-B    RDGRDFISAGAACGLTSAFSSPLGGMLFVMEEMATHFSVRLAWLVFLSCLSCMWIIQSCN 359

```

6.1 Implicaciones en un modelo biológico

En células animales el catión intracelular más abundante es K^+ . Su concentración extracelular es mucho menor, de modo que el principal determinante del V_m es este ion por su mayor permeabilidad basal. Tomando concentraciones de K^+ intracelular de 140 mEq/L y extracelular de 4 mEq/L, su potencial de equilibrio sería -94 mV. En otras palabras a ese voltaje se contrarresta la tendencia difusional del K^+ a salir de la célula por su gradiente químico. Dado que en *Leishmania spp.*, el V_m es más negativo (Vieira *et al.*, 1995; Glaser *et al.*, 1992) se postula un mecanismo activo que promueva esta hiperpolarización, la H^+ ATPasa (Zilberstein *et al.*, 1989). Ahora bien, considerando el gradiente de H^+ en el promastigote, más abundante a nivel intracelular que extracelular, este ion debería moverse hacia el medio externo en forma pasiva. Si teóricamente se asume el pH intracelular en 6,8 (Zilberstein & Shapira, 1994), la concentración de H^+ estará alrededor de 160 nanoEq/L, mientras el medio extracelular, tendría 16 nEq/L a pH 7,8 (Marchesini & Docampo, 2002). Luego, con estos valores y resolviendo la ecuación

de Nernst, el potencial de equilibrio del H^+ sería -58mV . Este valor difiere de los -110 mV , descritos para promastigotes (Vieira *et al.*, 1995). Esto implica que el gradiente eléctrico que promueve la entrada de protones es mayor al gradiente químico que favorece su salida. Y es por ello que la H^+ ATPasa expulsa en forma activa protones y genera un nuevo gradiente electroquímico de H^+ .

La evidencia previa sugiere que *Leishmania* disipa este gradiente de H^+ para la incorporación de glucosa y aminoácidos (Zilberstein, 1993). Igualmente, alteración de transportadores de Cl^- bloquea la incorporación de glucosa y aminoácidos (Vieira *et al.*, 1994; Vieira & Cabantchik, 1995), lo que implica su acople con la H^+ ATPasa. La localización en membrana plasmática y perimembranal de LbCLC-A, mostrada en este trabajo sugiere que si este CLC recicla entre membrana plasmática y endosomas tempranos podría ser la proteína transportadora responsable de las corrientes aniónicas (Lagos *et al.*, 2007) acopladas a la H^+ ATPasa (Vieira *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1994; Difranco *et al.*, 1995), apoyando salida de H^+ y concentrando Cl^- . Explicando así el potencial de membrana hiperpolarizado en este estadio del parásito (Vieira *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1994; Difranco *et al.*, 1995), o regular la expresión de transportadores, así como se ha sugerido para CLC-3 y CLC-5 (Novarino *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

A partir de la evidencia recolectada en este trabajo e integrada con los datos previos se postula el siguiente modelo de regulación del volumen. Un promastigote al que se le remueva Cl^- del medio extracelular presentará hiperpolarización y acidificación de su pH_i . De igual forma, aumentará su volumen celular. Esto provocará la apertura de transportadores de K^+ y Cl^- para remover osmolitos activos intracelulares. De no ser suficiente, también se movilizarán al medio extracelular prolina, alanina y otros aminoácidos. Al mismo tiempo, las puntiformesículas que contienen LbCLC-B se agruparán y compartimentalizarán (Fig. 12). Si analizamos una de esas vesículas y se considera que en el citoplasma hay gran cantidad de H^+ y cargas negativas. Se generará un gradiente electroquímico favorable para que el Cl^- ingrese al interior de la vesícula y los H^+ que allí se encuentren se intercambiarían hacia el citoplasma. Con un aumento en la cantidad de H^+ citoplasmáticos y en presencia de HCO_3^- se inducirá un aumento en la

cantidad de CO_2 y H_2O . Debido a que el CO_2 es osmóticamente inactivo, el agua migrará o hacia el medio extracelular o hacia las vesículas (ricas en Cl^-) contribuyendo a reducir el volumen citoplasmático del parásito.

Por el contrario, si se reduce la expresión de LbCLC-B, como fue el caso de *iC3*, en las puntiformesículas intracelulares no habría suficiente capacidad de intercambiar Cl^-/H^+ por lo que el osmolito activo (Cl^-) quedaría atrapado en el citoplasma y retendría junto con él agua en su interior. Explicando el mayor volumen visto en estos parásitos.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Los CLC de *L. V. braziliensis* evaluados tienen una distribución distinta en promastigotes. LbCLC-A está ubicado perimembranal y en membrana plasmática, mientras que LbCLC-B presenta una distribución de predominio intracelular puntiformesicular citoplasmático y LbCLC-C está confinada a tres o cuatro compartimentos intracelulares muy específicos de mayor volumen.

LbCLC-B tiene un tamaño menor al predicho por los análisis bioinformáticos, indicando modificaciones postraduccionales de esta proteína. Igualmente, el patrón de inmunofluorescencia de LbCLC-B cambia en función del estadio del parásito siendo puntiformesicular localizado perinuclear y perikinetoplástico en las fases más inmaduras, para tener una distribución puntiformesicular citoplasmática más general en los promastigotes maduros. LbCLC-B colocaliza parcialmente con Golgina 97 y parece ser reclutada ante retos osmóticos.

LbCLC-A es voltaje dependiente y su corriente pico no se altera con cambios de pH. En contraste, la voltaje dependencia de LbCLC-B, es óptima a pH ácido. Por los cambios de cinética observados en $[Cl^-]$ e, baja amplitud de las corrientes (comparadas con las obtenidas con el EAG) y pH diferentes se sugiere que estos dos CLC de *Leishmania* son intercambiadores.

Interferencia en la expresión del 13% de LbCLC-B provoca menor regulación del volumen en promastigotes ante retos hipoosmóticos.

pSP72RaneoaGFP_LbCLCB_F1R1-R1F1 causa interferencia de α -tubulina en *L. V. braziliensis*

7.2 Recomendaciones

En este trabajo se encontró que el sistema de *E. coli* para inducir proteínas recombinantes de *Leishmania* de tamaño mayor a 90 kDa no es exitoso, por lo que se requiere explorar otros modelos. Basile y Peticca han postulado el modelo de *Leishmania tarentolae* como organismo útil en la generación de proteínas recombinantes de protozoarios (Basile & Peticca, 2009) y que sería relevante para este caso.

La obtención de la proteína recombinante completa resultará indispensable para realizar estudios de estructura por cristalografía de rayos X (Dutzler *et al.*, 2002), y de reconstitución en bicapas lipídicas (White & Miller, 1979), en donde caracterizar LbCLC-B excluyendo la contribución otras proteínas de membrana distintas a la de interés. Asimismo, incorporación en liposomas de la proteína pura permitiría establecer el mecanismo de intercambiador (Accardi & Miller, 2004).

Se debe explorar el tipo de modificaciones postraduccionales a las que se expone LbCLC-B y que expliquen el peso menor al esperado. Identificar qué regiones son removidas y establecer cuáles son las mínimas necesarias para desempeñar su función.

Con el anticuerpo LbCLC-B será posible determinar en ovocitos su localización y determinar qué proporción se está expresando en membrana plasmática respecto a otras posibles localizaciones. Se requieren igualmente expandir los estudios de caracterización electrofisiológica en donde se determine selectividad iónica empleando distintos aniones, i.e. I^- , NO_3^- , Br^- , F^- .

Es necesario también determinar el impacto que tiene el silenciamiento de *iC3* sobre V_m y pH_i de los promastigotes. Así como establecer la expresión diferencial de los otros CLC que podría estar alterada.

Dado que se encontró que los patrones de fluorescencia de LbCLC-B varían en función del estadio del parásito, será interesante realizar el seguimiento detallado desde su síntesis y maduración a lo largo del ciclo de vida no solo del promastigote sino también del amastigote, y definir si desempeña algún rol en el proceso de interacción con su célula hospedera.

En este trabajo se encontró además que el pH ácido incrementa la actividad de LbCLC-B. Asimismo se reportó que los retos hipotónicos <70mOsm/L alteran la disminución regulatoria del volumen en el promastigote. Será necesario explorar el efecto en simultáneo de ambas variables sobre la fisiología del promastigote.

Hay que determinar el impacto que tendría la remoción de hierro del medio extracelular sobre los clones iC3 vs fenotipo WT para asociar su función al Golgi. Igualmente, hay que explorar su posible localización en retículo endoplásmico y sus implicaciones ante su reducción

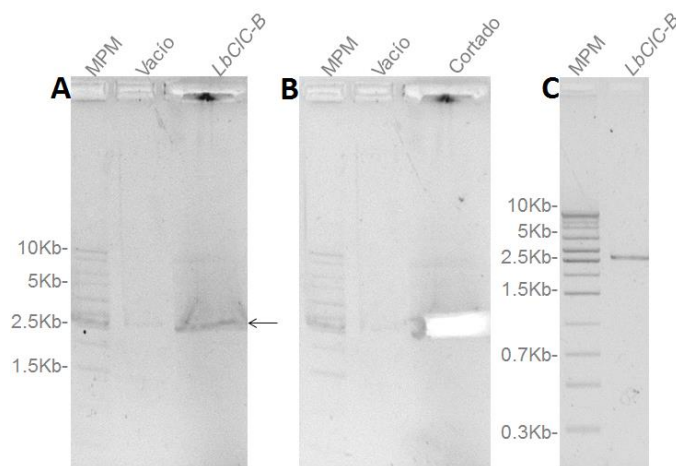
Será necesario realizar ensayos similares a los de Al Kazami para evaluar el papel oxidoreductor potencial que tendría LbCLC-B dado el dominio CXXC encontrado en su secuencia (Al et al., 2015)

A. Anexo: Producción de la proteína completa LbCLC-B y generación de anticuerpos policlonales contra ella.

Quintero previamente clonó el gen *LbCLC-B* en el vector pGEM-T-Easy(Quintero, 2014). Se amplificó el gen completo desde allí (2652 pb sin codón de parada), mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los siguientes cebadores, sentido: CACCATGAGTGCACGGTA; antisentido: CCTTCTCCACTCGGTGTCC (Fig. A.1.1). Una vez purificada la banda con peso esperado para *LbCLC-B*, esta se cuantificó, y se realizó ligación al vector pET-101 usando una relación molar 2:1 siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura A.1.1 Amplificación del gen *LbCLC-B*.

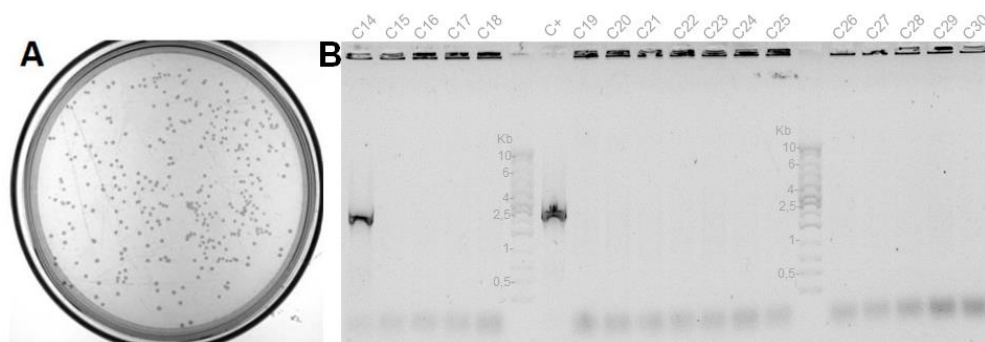
Gel de agarosa al 0,8% en donde se separó mediante electroforesis el *LbCLC-B* amplificado mediante PCR usando como plantilla pGEM-T-Easy+*LbCLC-B* y la enzima PFU; B) Corte de la banda amplificada. C) Banda del peso esperado luego de purificar el producto cortado. MPM: marcador de peso molecular.



Posteriormente, esta reacción se utilizó para transformar bacterias *E. coli* competentes Top10. Después de la transformación exitosa (Fig. A.1.2), se evaluaron múltiples colonias al azar mediante PCR de colonia, con el fin de establecer si *LbCLC-B* se encontraba en ellas (Fig. A.1.2B). Se logró amplificar la secuencia completa del gen en la colonia numerada "14".

Figura A.1.2 *E. coli* Top10 sometidas a transformación con pET101+*LbCLC-B*.

A) Placa de Petri con medio LB suplementado con ampicilina en donde se observa crecimiento de múltiples colonias bacterianas, indicativo de expresión del constructo esperado. B) Gel de agarosa al 0,8% en donde se separó por electroforesis los amplicones obtenidos luego de realizar PCR de colonia de varias colonias escogidas al azar. Se usó como plantilla el botón de bacterias visualizadas en A o pGEMT-Easy+*LbCLC-B* como control positivo (2652pb), (C+).



Posteriormente, se empleó el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep para la extracción del DNA plasmídico originario de la colonia 14, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se buscó una enzima que linearizara el constructo pET101+*LbCLC-B*, en una región del *LbCLC-B*. La figura A.1.3 muestra el mapa del constructo esperado (8405pb), y se observa que *Stu I* cumple con este requisito. La figura A.1.3B presenta el resultado luego de digerir pET101_Lb_CLC-B con *Stu I* en un carril y en otro el mismo plásmido no digerido. Se observa una única banda entre 8 y 10Kb, sugestivo del peso esperado. Adicionalmente, se empleó ese mismo plásmido para amplificar el gen completo y un

Figura A.1.4. Alineamiento parcial de la secuencia *LbCLC-B* obtenida del *pET101+LbCLC-B*.

En la parte superior se presenta la secuencia teórica que se esperaría encontrar si la inserción ocurriera en el sitio CACC. En la parte inferior la secuencia reportada por MacroGen, para el gen *LbCLC-B*. Se empleó el *pET101+LbCLC-B* aislado de colonia 14. Verde = secuencia del vector; Amarillo = inicio del gen *LbCLC-B*; Magenta = final del gen *LbCLC-B* sin el codón de parada; gris: secuencia de polihistidinas; rojo = codón de parada del vector.

```

pET101LbCLCBteorico      TCACCATGAGTGCACGGTACGGCACTGCTGGCTCTAGCGGGTACTTGAC 350
pet_101_Topo_Lb3670C14   TCACCATGAGTGCACGGTACGGCACTGCTGGCTCTAGCGGGTACTTGAC 350
*****

pET101LbCLCBteorico      ATGGAGAAGGTTGGTGCACGAGCCGCTGGCGACTTTGTGGACACCGAGTG 2950
pet_101_Topo_Lb3670C14   ATGGAGAAGGTTGGTGCACGAGCCGCTGGCGACTTTGTGGACACCGAGTG 2950
*****

pET101LbCLCBteorico      ACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCAC 3050
pet_101_Topo_Lb3670C14   ACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCAC 3050
*****

pET101LbCLCBteorico      CATTGAGTTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGG 3100
pet_101_Topo_Lb3670C14   CATTTGAGTTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGG 3100
*****

```

El reporte de secuenciación indicó que el gen *LbCLC-B* estaba completo y en marco de lectura respecto a la región de polihistidinas y el codón de parada del vector. Por tanto, se procedió a trabajar con este plásmido para realizar inducción de la proteína recombinante *LbCLC-B*.

Inducción de la proteína recombinante β galactosidasa en BL21 como control de expresión

Se indujo la expresión de la proteína control, β galactosidasa, provista por el fabricante. Esto con el objetivo de verificar la función de las *E. coli* BL21 Star™ (DE3) a utilizar, así como el anticuerpo primario anti-6Xhistidinas que se usaría para identificar la proteína de interés. La β galactosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de galactosidos a monosacáridos. Tiene una masa molecular estimada de 121kDa, sumando los 3 kDa que

otorga la región de polihistidinas del vector pET101 (Fig. A.1.5.A). Se usó el constructo pET101/D//lacZ para someter a transformación BL21 (Fig. A.1.5.B).

Después de la transformación exitosa, se tomaron al azar 2 colonias y se crecieron en medio LB líquido suplementado con ampicilina. Posteriormente se dividió el cultivo en 2, denominados: a) No inducido (NI) y b) inducido (I). A este último se adicionó isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG) para promover expresión de β galactosidasa. Se tomaron distintos tiempos luego de la inducción para determinar el momento de mayor expresión. A continuación se lisaron los botones de células recogidos para obtener extractos de proteína total (EPT), los cuales fueron corridos en geles SDS-poliacrilamida y teñidos con azul Coomassie (Fig. A.1.5.C-F). Los resultados observados en los geles teñidos con azul Coomassie tanto de colonia 1 como de la 2 mostraron una banda entre 110-160kDa presente en células inducidas y no observada en células no inducidas (NI) (flechas negras Fig. A.1.5.C-F), sugestivas de la expresión de β galactosidasa. Se realizó detección de β -galactosidasa por *Western Blot* empleando EPT de células NI e I, obtenidos a las 0, 3, 5 y 7 horas de inducción con IPTG. Se empleó el anticuerpo primario anti-6XHis (Fig. A.1.5.G). La membrana de nitrocelulosa reveló una banda entre 95 y 140 kDa en los carriles donde se había adicionado EPT proveniente de células inducidas luego de 3, 5 y 7 horas. Lo anterior indicó expresión de la proteína control del vector.

El siguiente paso fue determinar la funcionalidad de la β galactosidasa expresada. Para ello, se usó una caja de Petri con agar MacConkey, el cual resulta útil para identificar cepas que fermenten lactosa. Este agar actúa como un indicador de pH, ya que distingue aquellas bacterias Gram negativas que pueden fermentar lactosa (lac^+) de aquellas que no (lac^-). Las bacterias lac^+ , utilizan la lactosa disponible en el medio (la β galactosidasa hará hidrólisis de la lactosa), con lo cual cambia el pH por debajo de 6,8 y ocasiona aparición de colonias rojas/rosadas (Fig. A.1.5.H izquierda). Entre tanto, las bacterias lac^- (BL21 no sometidas a transformación con pET101/D//lacZ) no usan lactosa y en su defecto emplean peptona. Está vía genera amoníaco, elevando el pH del agar y conduciendo a la formación de colonias amarilllo-blanco/transparentes (Fig. A.1.5.H derecha).

Los resultados mostrados sugerían expresión funcional de β galactosidasa, validando las células empleadas y el anticuerpo primario utilizado.

Figura A.1.5. Expresión funcional de β galactosidasa.

A) mapa del constructo pET101+LacZ. B) Placa de petri con medio LB suplementado con ampicilina en donde se observa crecimiento de múltiples colonias bacterianas BL21, sometidas a transformación con pET101+LacZ. C-F) Extractos de proteína total (EPT) obtenidos de dos colonias al azar de BL21 sometida a transformación con pET101+LacZ corridos por SDS-PAGE al 10% y teñidos con azul Coomassie, en distintos tiempos de inducción (de 0 a 9 horas). La β galactosidasa es una proteína de 121kDa aproximadamente. En puntos negros se marca una banda del peso esperado. G) *Western Blot* (WB) a partir de extractos de proteína total (EPT) de BL 21 + pET101+LacZ transferidos a membrana de nitrocelulosa y revelada por método cromogénico (peroxidasa) para anti-6XHis. H) Agar McConkey con 100ul de BL21 inducidas con isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG) (I, izquierda) y 100ul de BL21 no transformadas (derecha).

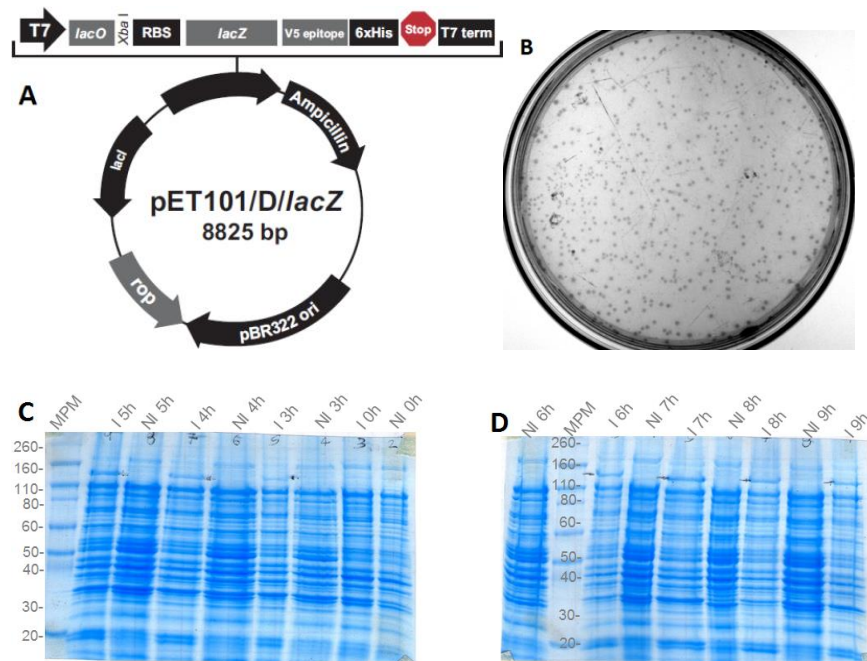
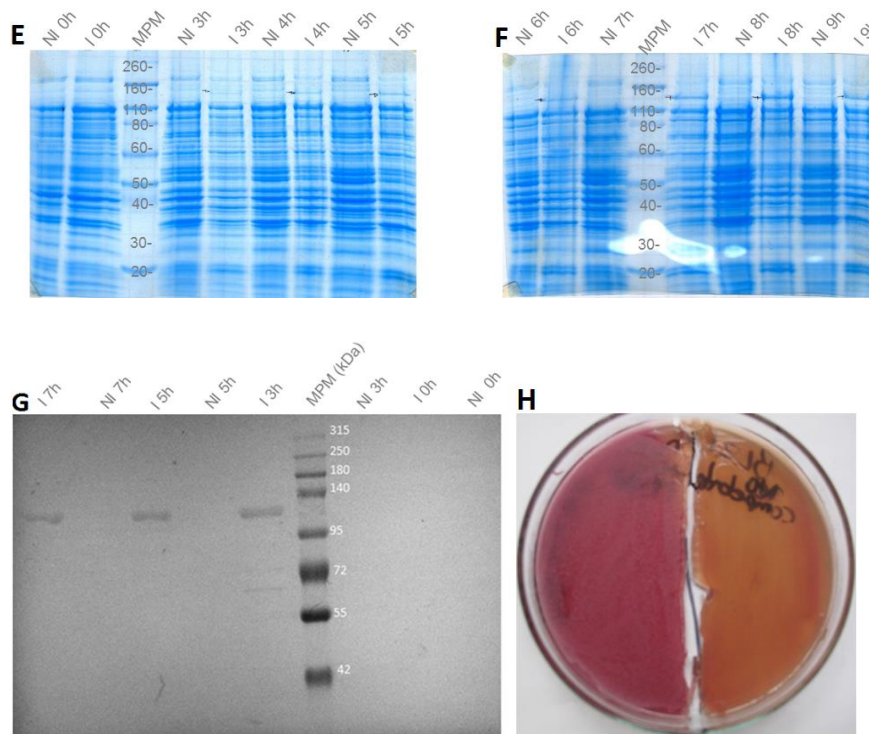


Figura A.1.5. continua

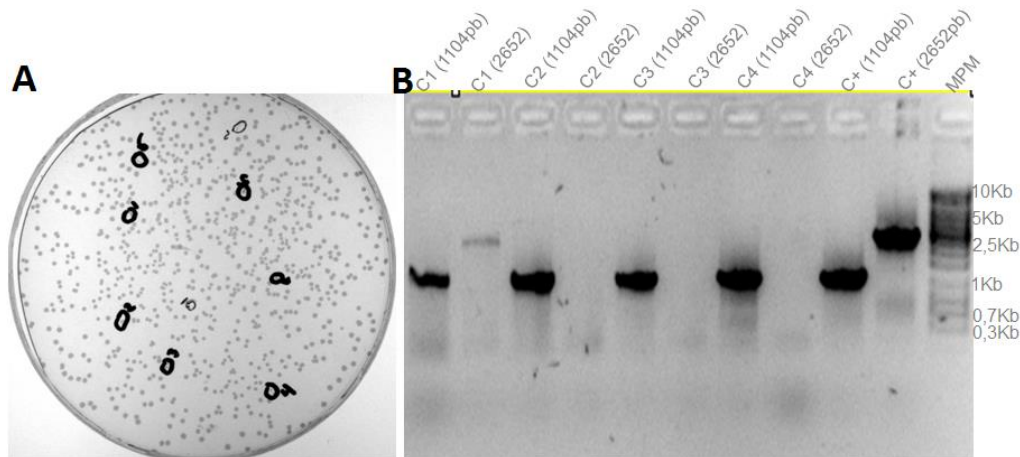


Inducción de la proteína recombinante LbCLC-B en BL21

Se transformaron BL21 con pET101+LbCLC-B aislado de la colonia 14 TOP10 (Fig. A.1.6.A). Luego de la transformación exitosa, se tomaron al azar 4 colonias y se realizó PCR de colonia, empleando los cebadores que amplificaban tanto el producto parcial (1104pb) como el completo (2652pb) (Fig. A.1.6.B).

Figura A.1.6 Transformación de BL21 con pET101+*LbCLC-B* y amplificación del gen *LbCLC-B*.

A) Placa de petri con medio LB suplementado con ampicilina donde se observa crecimiento de múltiples colonias bacterianas BL21, sometidas a transformación con pET101+*LbCLC-B* aislado de la colonia 14 TOP10. B) Gel de agarosa al 0,8% en donde se separaron por electroforesis los productos parcial (1104pbs) y total (2652pbs) obtenidos por PCR de colonia de 4 colonias BL21 tomadas al azar (Fig. A.1.6.A) C+: control positivo (se usó pGEM-Teasy+*LbCLC-B* como plantilla). Se emplearon los cebadores que amplificaban el gen completo (2652pb) así como el fragmento del gen (1104pb.)



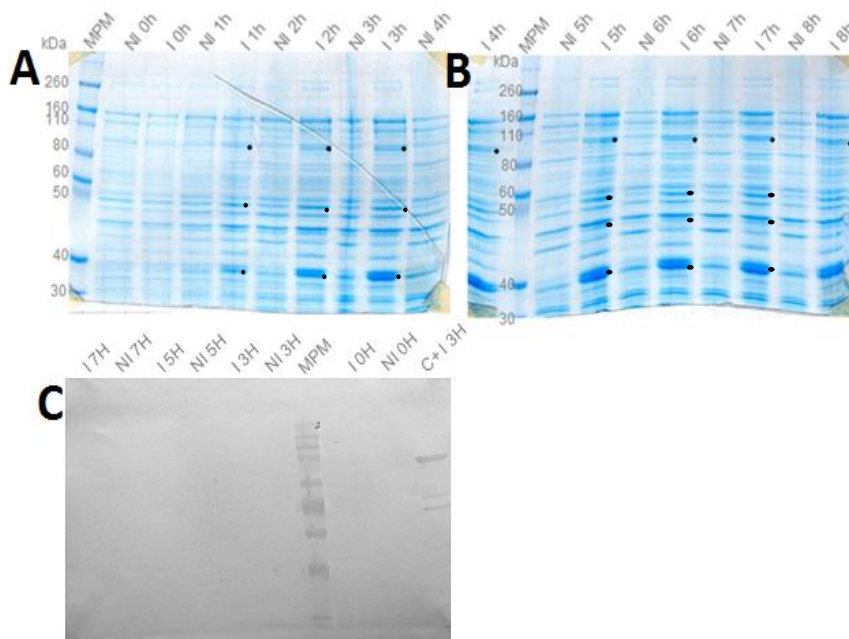
La figura A.1.6.B mostró amplificación de la secuencia parcial en todas las colonias BL21 transformadas con pET101+*LbCLC-B* y amplificación del gen completo (C1) en una de ellas. Se seleccionó la colonia C1 BL21 para inducción de *LbCLC-B* con IPTG, siguiendo la metodología empleada con β galactosidasa.

Luego de 1 hora de inducción con IPTG se identificaron una serie de bandas (Fig. A.1.7A-B) presentes en BL21 inducidas que no estaban presentes en las no inducidas, las cuales se hicieron más intensas conforme transcurría el tiempo de inducción. *LbCLC-B* tiene una masa molecular estimada de 97kDa. Adicionando los 3kDa de la región de

polihistidinas, debería esperarse una banda cercana a 100kDa. Los puntos marcados en los gels (Fig. A.1.7A-B) sugerían la presencia una proteína del peso esperado y otras proteínas de menor tamaño, 53, 47 y 40 kDa. Se realizó inmunodetección de la región de polihistidinas en estos EPT inducidos, empleando el mismo anticuerpo anti-6Xhis previamente evaluado (Fig. A.1.7C). Solo se identificaron bandas entre 65 y 140 kDa provenientes del EPT de BL21 inducidas luego de 3 horas para expresar la β galactosidasa (control positivo del experimento).

Figura A.1.7. Inducción de la proteína recombinante LbCIC-B.

A y B) Extractos de proteína total (EPT) obtenidos de la colonia 1 BL21 (figura A.1.6A y B) sometida a transformación con pET101+*LbCLC-B*, corridos por SDS-PAGE al 8% y teñidos con azul Coomassie, en distintos tiempos de inducción (de 0 a 9 horas). C) WB a partir de EPT de BL21 sometidas a transformación con pET101+*LbCLC-B* transferidos a membrana de nitrocelulosa y revelada por método cromogénico (peroxidasa) para anti-6XHis. NI: No inducidas. I: inducidas. C+: control positivo. En este caso se usó EPT 3h post inducción de BL21 transformadas con pET101+*LacZ* (figura A.1.5.G).



La presencia de múltiples bandas presentes en EPT de células tratadas con IPTG sugirió expresión de una o más proteínas, o la degradación transitoria de una gran proteína en varias fracciones. A favor de esto se encontraron bandas entre 40 y 55 kDa. Aunque, ninguna de ellas pudo ser identificada mediante inmunodetección (Fig.A.1.7.C).

Se realizó otro ensayo de inducción, esta vez extendiendo los tiempos de toma de muestra de 0 hasta 28 horas (Fig.1.8A y B). En esta ocasión, de nuevo se apreció un claro patrón de bandas distinto entre BL21 inducidas, respecto a las no inducidas. Fueron reproducibles las bandas cerca de 160, 90, 60 y 40kDa.

Adicionalmente, teniendo en cuenta que la proteína que se intenta expresar es proveniente de *L.V. braziliensis* y que el tratamiento durante la electroforesis de proteínas pudo haber afectado la configuración de esta, se usó como control positivo de inmunomarcación otra proteína de *L.V. braziliensis* (la nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa, NMNAT, donada por el LIBBIQ). La NMNAT tiene una masa molecular estimada de 37kDa. Los WB realizados con EPT provenientes de BL21 transformadas con pET101+*LbCLC-B* e inducidos con IPTG por 28 horas, no revelaron bandas, salvo NMNAT (Fig. A.1.8.C). Posteriormente se tomaron los EPT de 2 colonias evaluadas en la figura A.1.6A y B a las 20,5h post-inducción y se corrieron por electroforesis, en gel de poliacrilamida al 10%, usando como control negativo EPT proveniente de BL21 no transformadas (NT), y como control positivo la proteína purificada NMNAT (fig. A.1.8E). Los WB realizados en estos EPT y revelados con fosfatasa o peroxidasa (Fig. A.1.8F y G), no identificaron proteínas del peso esperado (i.e. 100 kDa).

Se examinó la secuencia de protéica *LbCLC-B*, porque la presencia de ciertos aminoácidos (i.e., Arg, Lys, Phe, Leu, Trp o Tyr) en la primera posición luego de la fMet, se relaciona con una vida media baja (menor a 2 minutos) de la proteína en bacterias (Tobias, Shrader, Rocap, & Varshavsky, 1991). En *LbCLC-B* el aminoácido luego de la fMet es serina (y éste, en *E. coli* se asocia con un tiempo de vida medio de la proteína mucho mayor, >600 min) (Varshavsky, 1996). Ahora bien, considerando que los

resultados previos sugieren expresión de una o varias proteínas, que carece(n) de la región de polihistidinas, se evaluó la hipótesis del sesgo en el uso de codones como posible explicación.

Estudios previos han mostrado que los antígenos de malaria, por ejemplo, se encuentran entre las proteínas más difíciles de expresar con métodos *in vitro*, debido a su uso de codones genéticos extremo (Peixoto, Fernandez, & Musto, 2004). El genoma de *P. falciparum* es uno de los más ricos en adeninas/timinas (80%)(Flick, Ahuja, Chene, Bejarano, & Chen, 2004). De forma que, el alto contenido de repeticiones A/T en la plantilla mRNA, es una de las razones para terminar tempranamente la traducción, y con ello generar heterogeneidad de las proteínas recombinantes (Flick *et al.*, 2004).

Figura A.1.8. Inducción de la proteína recombinante *LbCLC-B* luego de 28 horas.

A y B) Extractos de proteína total (EPT) obtenidos de 2 colonias (C1 y C2, figura 1.6A y B) BL21 sometidas a transformación con pET101+*LbCLC-B*, corridos por SDS-PAGE al 8% y teñidos con azul de Coomassie, en distintos tiempos de inducción (de 0 a 28 horas). C y D) WB a partir de EPT arriba descritos, transferidos a membrana de nitrocelulosa y revelada por método cromogénico (peroxidasa) para anti-6XHis. NI: No inducidas. I: inducidas. C+: control positivo, (flecha). En este caso se usó la proteína purificada NMNAT de *L. braziliensis*. E) EPT de C1 y C2 a las 20.5h post-inducción corridos por SDS-PAGE al 8% y teñidos con azul de Coomassie. NT: BL21 no transformadas. F y G) WB a partir de EPT de BL21 C1 y C2 arriba descritos, transferidos a membrana de nitrocelulosa y revelada por método cromogénico, fosfatasa, (F), peroxidasa (G) para anti-6XHis.

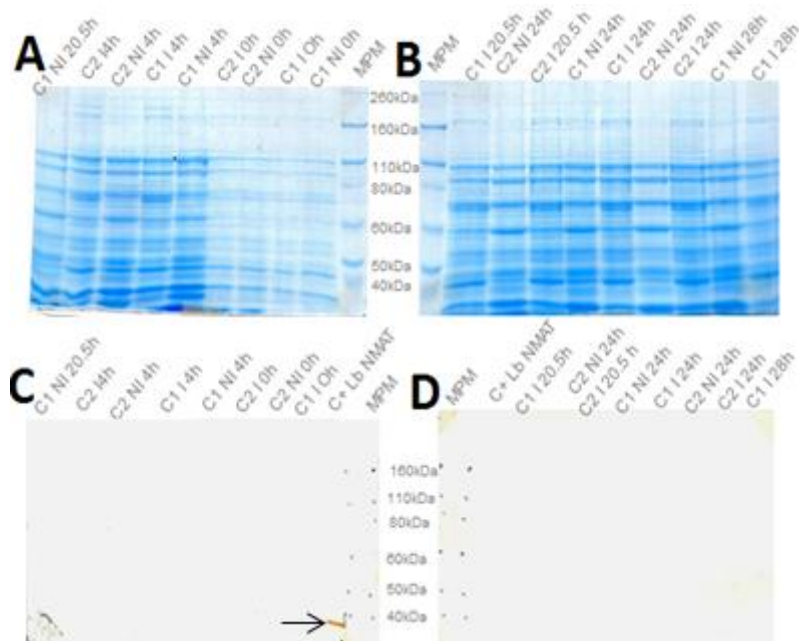
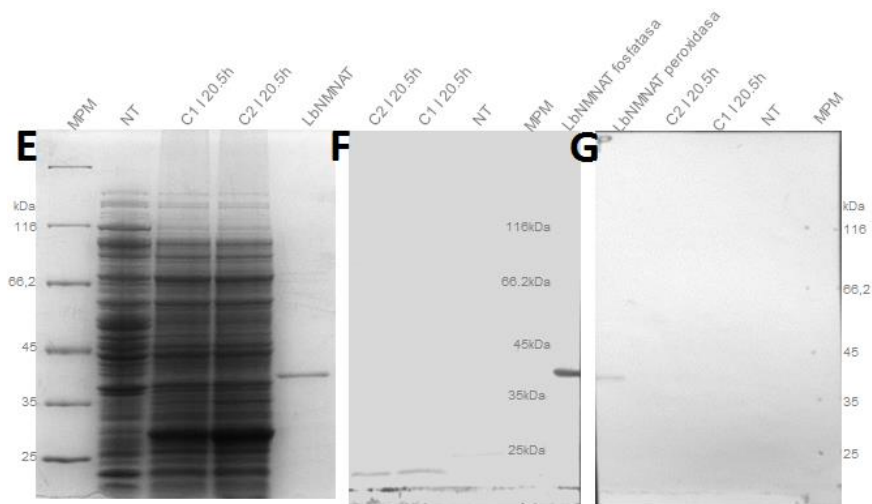


Figura A.1.8 continua



La expresión eficiente de proteínas heterólogas en *E. coli* se ve deteriorada por la rareza de ciertos tRNAs que son abundantes en los organismos de donde proviene la proteína heteróloga (Flick *et al.*, 2004). Por tanto, cuando el proceso de expresión alcanza niveles elevados, la cantidad limitada de tRNAs en las bacterias rápidamente se agotará. La falta de tRNAs resultará en reducción de la unidad ribosomal desde la plantilla mRNA y terminará el proceso de traducción antes de lo esperado, por agotamiento (Flick *et al.*, 2004).

Para sustentar que esta hipótesis se seleccionaron 2 genes con algún grado de identidad entre *L.V. braziliensis* y *E. coli*, así como el gen que codifica la NMNAT de *L. braziliensis* que se empleó como control positivo. Se determinó la proporción de Adeninas-Timinas (AT) vs Guaninas-Citocinas (GC) en los distintos aminoácidos que constituían estas proteínas. Los resultados se presentan en la tabla A.1.1:

Tabla A.1.1. Proporción de codones usados en los genes LbCLC-B de *L. braziliensis* vs *EcCLCa* de *E. coli*; treonina 3-deshidrogenasa de *L. braziliensis* vs el gen de *E. coli* y la NMNAT de *L. braziliensis*

OCbsOC1	Lbra		Ecoli		Enzima TDH	Lbra		Ecoli		NMNAT	Lbraziliensis	
	TA	GC	TA	GC		TA	GC	TA	GC		TA	GC
Ala	35%	65%	39%	61%	Ala	29%	71%	27%	73%	Ala	46%	54%
Cys	15%	85%	67%	33%	Cys	25%	75%	55%	45%	cys	30%	70%
Asp	31%	69%	73%	27%	Asp	18%	82%	65%	35%	asp	35%	65%
Glu	7%	97%	65%	35%	Glu	14%	86%	32%	68%	glu	22%	78%
Phe	48%	52%	70%	30%	Phe	18%	82%	50%	50%	phe	38%	62%
Gly	28%	72%	40%	60%	Gly	12%	88%	50%	50%	gly	33%	67%
His	29%	71%	50%	50%	His	0%	100%	64%	36%	his	29%	71%
Ile	45%	55%	81%	19%	Ile	30%	70%	51%	49%	ile	29%	71%
Lys	25%	75%	92%	8%	Lys	6%	94%	82%	18%	lys	29%	71%
Leu	33%	77%	30%	70%	Leu	8%	92%	21%	79%	Leu	41%	59%
Met	0%	100%	0%	100%	Met	0%	100%	0%	100%	Met	0%	100%
Asn	44%	56%	67%	33%	Asn	17%	83%	47%	53%	Asn	33%	67%
Pro	33%	67%	23%	77%	Pro	24%	76%	16%	84%	Pro	28%	72%
Gln	32%	68%	50%	50%	Gln	0%	100%	36%	64%	Gln	36%	64%
Arg	30%	70%	37%	63%	Arg	18%	82%	69%	31%	Arg	45%	55%
Ser	24%	76%	36%	64%	Ser	18%	82%	52%	48%	Ser	30%	70%
Thr	28%	72%	35%	65%	Thr	38%	62%	13%	87%	Thr	37%	63%
Val	28%	72%	36%	64%	Val	20%	80%	48%	52%	Val	33%	67%
Trp	0%	100%	0%	100%	Trp	0%	100%	0%	100%	Trp	0%	100%
Tyr	10%	90%	44%	56%	Tyr	11%	89%	70%	30%	Tyr	43%	57%
FINAL	26%	74%	47%	53%	FINAL	15%	85%	42%	58%	Final	31%	69%

Los datos mostraron que la proporción de codones que culminan en GC para *L. V. braziliensis* es mayor que en *E. coli*, en contraposición a lo que presenta *P. falciparum*. Esto, apoyaría la hipótesis de agotamiento descrita (Peixoto *et al.*, 2004). Así como también explicaría porque la proteína control del kit pET101, β galactosidasa, cuyo peso es de 121kDa si se expresa sin problemas (ya que es nativa de *E. coli*), y por qué la NMNAT también lo hace, ya que es de menor tamaño (37kDa).

Adicionalmente, se utilizó el índice de adaptación de codones (IAC), el cual mide el grado en que el uso de codones de una secuencia se adapta a las frecuencias de uso de codones calculadas previamente para un organismo, así como para predecir el nivel de expresión de un gen o comparar el uso de codones entre organismos (Universidad, 14 A.D.). El valor arrojado para *LbCLC-B* fue 0,547. El ideal es 1 (lo que indica que el uso de codones entre organismos es idéntico). De forma que, el problema de expresión de la proteína completa *LbCLC-B* pudo ser que la representación de las tripletas en las BL21 no era la ideal. Sin embargo, el IAC de la proteína que se usó como control positivo, la NMNAT de *L. braziliensis* fue 0,484, y esta si se expresó, lo que sugeriría que lo hace debido a que tiene un tamaño mucho menor al de la *LbCLC-B*.

En malaria se ha concluido que existen 4 grandes predictores de dificultad en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, ellos son: a) alto peso molecular (de 250 proteínas con peso superior a 47,2kDa que se intentaron expresar solo el 23,6% lo hizo con éxito), b) gran desorden proteico, c) punto isoeléctrico >8,4 (el de la LbCLC-B es 7,32, luego, este pareciera no ser el problema) y d) falta de homología con este organismo (Mehlin *et al.*, 2006). Tres de estas razones podrían servir para explicar la falta de expresión de la LbCLC-B. En conclusión, se pudo clonar en forma exitosa el producto total *LbCLC_B* de 2652pb sin el codón de parada, mas no fue posible inducir su expresión en *E. coli*.

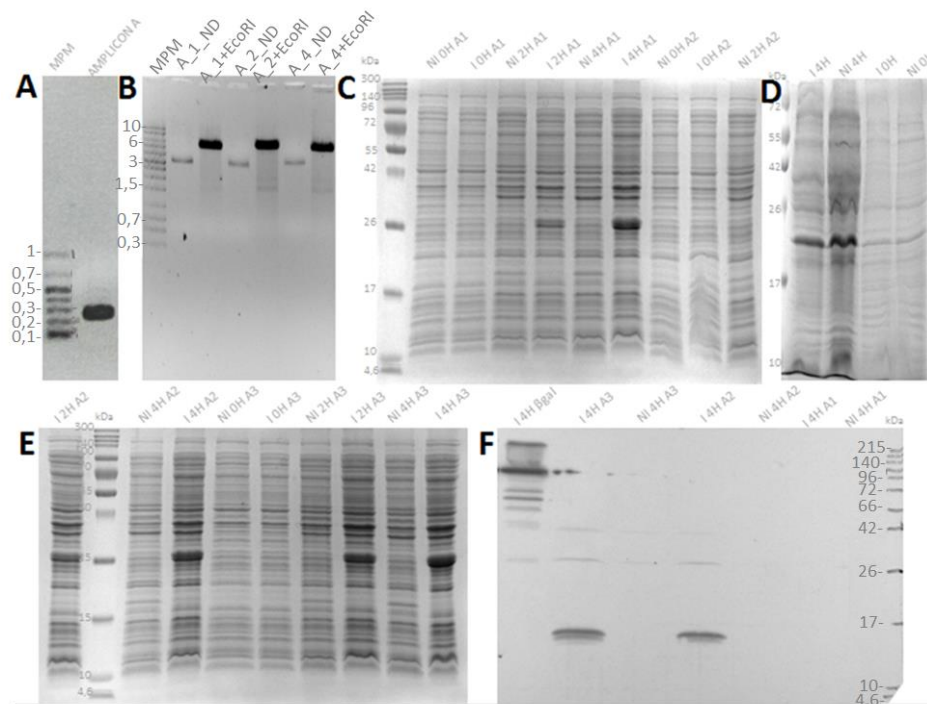
Generación de un fragmento amino terminal de 264 pares de bases de la proteína LbCLC-B e inducción de anticuerpos policlonales contra ella

Considerando la localización intracelular de los extremos amino y carboxi terminales de LbCLC-B y el perfil de antigenicidad favorable, se plantéo la posibilidad de expresar un fragmento de LbCLC-B. Se clonaron los fragmentos amino terminal de los genes *LbCLC-B* (264pb) y *LbCLC-A* (264pb). Se diseñaron los cebadores, sentido: 5' CACCATGAGTGCACGGTACGGCAC 3, y antisentido: 5' GAGGGATTGACCCTCGGCGTAATC3' para el gen *LbCLC-B* y los cebadores sentido: 5':CACCATGACGGAAGCAGGCGGCAG 3' y antisentido 5': GAGCGCGATTCCGCACGCCAAGGC 3' para el gen *LbCLC-A*. Se realizó PCR para amplificar los fragmentos de 264pb (Figura A.1.9A). Se ligaron a pET101, siguiendo la metodología descrita arriba. Se transformaron bacterias DH5 α y se obtuvieron siete colonias para el *LbCLC-A* y una colonia para *LbCLC-B*. Posteriormente, se realizó PCR de colonia para establecer si se encontraba el fragmento de interés, y luego se linearizaron los constructos con Eco R I (6021pb, figura A.1.9.B). Los plásmidos aislados pET101+N_264_ *LbCLC-B* y pET101+N_264_ *LbCLC-A* se enviaron a secuenciar, y se encontró que únicamente los pET101+N_264_ *LbCLC-A* tenían el fragmento de interés en marco de lectura con la cola de histidinas y el codón de parada (A1.4.1-5). Se emplearon los plásmidos secuenciados para transformar bacterias BL21 y realizar ensayos de inducción con IPTG, hasta por 4 horas. Los EPT recogidos fueron visualizados por tinción

con azul Coomassie (figuras A1.9.C-E) y se realizó detección de la región de polihistidinas empleando el anticuerpo anti-6X His (Figura A.1.9F).

Figura A.1.9 Generación de un péptido recombinante amino terminal LbCLC-A.

A) Gel de agarosa al 0.8% en donde se corrió por electroforesis el amplicon obtenido luego de emplear los cebadores para el fragmento de 264pb *LbCLC-A*. B) Gel de agarosa al 0.8% en donde se corrió por electroforesis 3 plásmidos aislados de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con pET101+N_264_LbCLC-A, no digeridos (ND) y digeridos con EcoR I (6021pb). C-E) SDS-PAGE al 16% teñidos con azul de Coomassie, en donde se corrieron los extractos de proteína total (EPT) de bacterias BL21, no sometidas a transformación (D) y sometidas a transformación (C y E) con los plásmidos pET101+N_264_LbCLC_A1/A2/A4, y que fueron no inducidas (ND) o inducidas (I) con IPTG por 0 2 y 4 horas. F) Detección de región de polihistidinas en los EPT provenientes de BL21+ pET101+N_264_LbCLC_A1/A2/A4, empleando un anticuerpo anti-6Xhis.



Los EPT provenientes de BL21 sometidas a transformación con pET101+N_264_LbCLC_A e inducidos con IPTG presentaron luego de 4 horas la presencia de varias proteínas ausentes en las NI, siendo la banda cercana a 25 kDa de mayor intensidad. Si bien se esperaba inducir un péptido recombinante de 13 kDa aproximadamente, cerca de ese nivel parecía haber una banda, solo que mucho menos intensa. Posteriormente, se identificó una banda del peso esperado (14 kDa) empleando el anticuerpo anti-6xHis en los EPT inducidos con IPTG luego de 4 horas, así como la detección de una banda más tenue cerca de 25 kDa. Resulta llamativo que la banda más intensa en los geles teñidos con azul Coomassie no corresponde a la banda más intensa en la membrana de nitrocelulosa. Lo anterior implicaría 2 posibilidades: a) la banda de 25 kDa representaría la forma dimérica del péptido recombinante, el cual sería más abundante, y por tanto más afín por el azul Coomassie, aunque no necesariamente daría acceso al epítipo de unión al anticuerpo anti-6xHis; b) la banda de 25 kDa corresponde a una proteína no relacionada con el péptido recombinante de interés, y que pudo haberse expresado gracias a la adición del agente inductor. Los resultados de la figura A.1.9.D muestran ausencia de esta banda de 25 kDa en las BL21 no transformadas, no inducidas e inducidas con pET101+N_264_LbCLC_A, indicando que su expresión es resultado del constructo incluido.

Mediante esta estrategia se pudo generar un péptido LbCLC-A, el cual debería ser purificado y posteriormente inoculado en conejos para la generación de anticuerpos policlonales anti-LbCLC-A. Este método no permitió obtención de péptido LbCLC-B.

Comparativo secuencia N_264_LbCLC-A_A1

Teórico	-----CAAGGAGATGGCGC 14
obtenido	TAGATAGAAGCCTTTGAGCACCGCCGCCGAAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGC 60

Teórico	CCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGA 74
obtenido	CCAACAGTCCCCG-CCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGA 119

Teórico GCCCGAAGTGGCGAGCCCG-ATCTTCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCA 133

obtenido GCCCGAAGTGGCGAGCCCGGATCTTCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCA 179

Teórico ACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATC 193

obtenido ACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATC 239

Teórico TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCC 253

obtenido TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCC 299

Teórico CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAATTCAGGAGCCCTTCACCATGACGGA 313

obtenido CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAATTCAGGAGCCCTTCACCATGACGGA 359

Teórico AGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCGCTT 373

obtenido AGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCACTT 419

Teórico AGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGA 433

obtenido AGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGAGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGA 479

Teórico GGCGGCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATACCATACCATCTACCACTCACTCGCC 493

obtenido GGCGGCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATACCATACCATCTACCACTCACTCGCC 539

Teórico ATACGGAGAGAAGCGTCCCGCGTACAGCTTCCAGGGGAGGCTTCTTAGCAGCCTTGGC 553

obtenido ATACGGAGAGAAGCGTCCCGCGTACAGCTTCCAGGGGAGGCTTCTTAGCAGCCTTGGC 599

Teórico GTGCGGAATCGCGCTCAAGGGCGAGCTCAATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAA 613

obtenido GTGCGGAATCGCGCTCAAGGGCGAGCTCAATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAA 659

Teórico CCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCACCATCACCATTGATTG 673

obtenido CCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCACCATCACCATTGATTG 719

Teórico ATCCGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAAT 733

obtenido ATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAA----- 747
 ***** *
 Teórico AACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGAAAGGAG 793
 obtenido -----
 Teórico GAACTATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCC 853
 obtenido -----
 Teórico TACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACA 913
 obtenido -----
 Teórico CGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGAT 973
 obtenido -----
 Teórico GATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTA 1033
 obtenido -----

Traducción del péptido teórico amino terminal LbCLC-A

Met TEAGGSCGGNGVGGDDEAITRLVVNVPEADWATIDCFSS
 YTEAAERAA **Met** RRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQGEAFLAA
 LACGIAL

traducción del obtenido N_264_LbCLC-A_A1

Met TEAGGSCGGNGVGGDDEAIT **H** LVVNVPEADW **E** TIDCFSS
 YTEAAERAA **Met** RRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQGEAFLAA
 LACGIALK**GELNSKLE**GPINPLLGLDSTR**TGHHHHHH** **Stop**

Coinciden en 86/88. Me falta volver a mirar en chromas los que no dieron.

A2

Teórico -----CAAGGAGATGGCGCCCAACAGT 22
 obtenido GCCCGTTGAGCACCGCCCGCAAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGT 240
 ***** *
 Teórico CCCCCGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAG 82
 obtenido CCCCCGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAG 300
 ***** *

Teórico TGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCT 142
 obtenido TGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCT 360

Teórico GTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCG 202
 obtenido GTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCG 420

Teórico CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAA 262
 obtenido CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAA 480

Teórico TAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAATTCAGGAGCCCTTACC**ATGACG**GAAGCAGGCGG 322
 obtenido TAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAATTCAGGAGCCCTTACC**ATGACG**GAAGCAGGCGG 540

Teórico CAGTTGCGGTGGCAACGGGGTTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCGCTTAGTGGTGAA 382
 obtenido CAGTTGCGGTGGCAACGGGGTTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCACTTAGTGGTGAA 600

Teórico CGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGGCGGCAGA 442
 obtenido CGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGGCGGCAGA 660

Teórico GCGGGCCGCGATGCGGGCGTCCCATACCATACCCTACTCCACTCGCCATACGGAGA 502
 obtenido GCGGGCCGCGATGCGGGCGTCCCATACCATACCCTACTCCACTCGCCATACGGAGA 720

Teórico GAAGCGTCCCGGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGTGCGGAAT 562
 obtenido GAAGCGTCCCGGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGTGCGGAAT 780

Teórico CG**CGCTC**AAGGGCGAGCTCAATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCT 622
 obtenido CGCGCTCAAGGGCGAGCTCAATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCT 840

Teórico CGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATACCATACCATTGAGTTTGATCCGGCTG 682
 obtenido CGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATACCATACCATTGAGTTTGATCCGGCTG 900

Teórico CTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT 742
 obtenido CTAACAAAGCCCGAAAG----- 917

traducción del obtenido N_264_LbCLC-A_A2

Met TEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSY
TEAERAAMet RRRHTIPSTTHSPYGEKRPAYSFQGEAFLAAL
A CGIALKGELNSKLEKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH Stop

A_4

Teórico -----CAAGGAGATGGCGCC 15
 obtenido TAGGTTGAGCCGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCC 180

Teórico CAACAGTCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAG 75
 obtenido CAACAGTCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAG 240

Teórico CCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAAC 135
 obtenido CCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAAC 300

Teórico CGCACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTC 195
 obtenido CGCACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTC 360

Teórico GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCT 255
 obtenido GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCT 420

Teórico CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAATTCAGGAGCCCTTACC**ATG**ACGGAAG 315
 obtenido CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAATTCAGGAGCCCTTACC**ATG**ACGGAAG 480

Teórico CAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCGCTTAG 375
 obtenido CAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTTCGGCGGTGACGACGAGGCCATCACGCACTTAG 540

Teórico TGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGG 435

```

obtenido   TGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCAGCTACACGGAGG 600
*****
Teórico   CGGCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATACCATACCATCTACCACTCACTCGCCAT 495
obtenido  CGGCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATACCATACCATCTACCACTCACTCGCCAT 660
*****
Teórico   ACGGAGAGAAGCGTCCCGCGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGT 555
obtenido  ACGGAGAGAAGCGTCCCGCGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAGCAGCCTTGGCGT 720
*****
Teórico   GCGGAATCGCGCTCAAGGGCGAGCTCAATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACC 615
obtenido  GCGGAATCGCGCTCAAGGGCGAGCTCAATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACC 780
*****
Teórico   CTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGTTGAT 675
obtenido  CTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTGAT 840
*****
Teórico   CCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA 735
obtenido  CCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGAAG----- 867
*****
    
```

Traducción del obtenido N_264_LbCLC-A_A4

```

Met TEAGGSCGGNGVGGDDEAITHLVVNVPEADWATIDCFSSY
TEAERAAMetRRRH TIPSTTHSPYGEKRPAYSFQGEAFLAAL
ACGIALKGELNSKLE GKPIPNPLLGLDSTR TGH HHHHHH Stop
    
```

B. Anexo: Documentación anticuerpos

Documentación anticuerpo anti-LbCLC-A



page 1 of 3
One Stop Solution for Biology Research

Certificate of Analysis

CONFIDENTIAL

SC1031 Complete Affinity-Purified
Peptide Polyclonal Antibody Package

Order ID: 486611-1

Report From:

GenScript USA Inc
860 Centennial Ave
Piscataway, NJ 08854
United States of America

For research use only



1. Project Information

Order ID: 486611-1
Antigen Name: LbClCa0210
Sequence: CSGAPP5YQQETKERE (Lot: 490284-1)
Immunogen: Peptide-KLH conjugate
Host Strain: New Zealand Rabbit

2. Product Information(s)

Product 1: Antigen 490284-1
Form: Lyophilized
Quantity: Total 5.00 mg in one vial

Product 2: Pre-immune serum
Form: Liquid
Preservative: 0.02% Sodium Azide
Volume: 1 ml/vial
Quantity: One vial

Product 3: Affinity-Purified antibody
Form: Liquid
Concentration: 1.190 mg/ml (by A280nm)
Quantity: Total 20.23 mg in one bottle
Buffer: Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) with 0.02% Sodium Azide

3. QC Results

Indirect ELISA:

Coating Antigen(s): Free PeptideCoating Concentration: 4 µg/ml, 100 µl/wellCoating Buffer: Phosphate Buffered Saline, pH7.4Secondary Antibody: Anti-RABBIT IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated

Table 1. Elisa results of Pre-immune serum and Purified antibody:

	Dilution	Anti-LbClCa0210 Antibody
NC	1:1,000	0.063
1	1:1,000	3.107
2	1:2,000	2.999
3	1:4,000	2.881
4	1:8,000	2.662
5	1:16,000	2.365
6	1:32,000	2.014
7	1:64,000	1.503
8	1:128,000	1.054
9	1:256,000	0.650
10	1:512,000	0.375
11	Blank	0.049
12	Blank	0.049
	Titer	1:512,000

Starting dilution: 1:1,000 (Equivalent to 1 µg/ml)

The titer is the highest dilution with S/B (Signal/Blank) >=2.1

NC is negative control (Pre-immune serum)

Approved by



David Chang

Director, Antibody Department

GenScript USA Inc



Certificate of Analysis

CONFIDENTIAL

SC1031 Complete Affinity-Purified
Peptide Polyclonal Antibody Package

Order ID: 486611-4

Report From:

GenScript USA Inc
860 Centennial Ave
Piscataway, NJ 08854
United States of America



1. Project Information

Order ID: 486611-4

Antigen Name: LbC/Cb3670

Sequence: CTDARSGSASEQASSE (Lot: 490285-1)

Immunogen: Peptide-KLH conjugate

Host Strain: New Zealand Rabbit

2. Product Information(s)

Product 1: Antigen 490285-1

Form: Lyophilized

Quantity: Total 5.00 mg in one vial

Product 2: Pre-immune serum

Form: Liquid

Preservative: 0.02% Sodium Azide

Volume: 1 ml/vial

Quantity: One vial

Product 3: Affinity-Purified antibody

Form: Liquid

Concentration: 0.447 mg/ml (by A280nm)

Quantity: Total 14.75 mg in one bottle

Buffer: Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) with 0.02% Sodium Azide

3. QC Results

Indirect ELISA:

Coating Antigen(s): Free Peptide

Coating Concentration: 4 µg/ml, 100 µl/well

Coating Buffer: Phosphate Buffered Saline, pH7.4

Secondary Antibody: Anti-RABBIT IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated

Table 1. Elisa results of Pre-immune serum and Purified antibody:

	Dilution	Anti-LbCICb3670 Antibody
NC	1:1,000	0.065
1	1:1,000	3.223
2	1:2,000	3.077
3	1:4,000	3.046
4	1:8,000	2.772
5	1:16,000	2.557
6	1:32,000	2.109
7	1:64,000	1.710
8	1:128,000	1.121
9	1:256,000	0.722
10	1:512,000	0.450
11	Blank	0.049
12	Blank	0.049
	Titer	1:512,000

Starting dilution: 1:1,000 (Equivalent to 1 µg/ml)

The titer is the highest dilution with S/B (Signal/Blank) >=2.1

NC is negative control (Pre-immune serum)

Approved by



David Chang

Director, Antibody Department

GenScript USA Inc



Certificate of Analysis

CONFIDENTIAL

SC1031 Complete Affinity-Purified
Peptide Polyclonal Antibody Package

Order ID: 509481-1

Report From:

GenScript USA Inc
860 Centennial Ave
Piscataway, NJ 08854
United States of America



1. Project Information

Order ID: 509481-1

Antigen Name: LbClc1260

Sequence: CSIDPTQRLRQERLHTDQV (Lot: 509601-1)

Immunogen: Peptide-KLH conjugate

Host Strain: New Zealand Rabbit

2. Product Information(s)

Product 1: Antigen 509601-1

Form: Lyophilized

Quantity: Total 5.00 mg in one vial

Product 2: Pre-immune serum

Form: Liquid

Preservative: 0.02% Sodium Azide

Volume: 1 ml/vial

Quantity: One vial

Product 3: Affinity-Purified antibody

Form: Liquid

Concentration: 1.606 mg/ml (by A280nm)

Quantity: Total 26.18 mg in one bottle

Buffer: Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) with 0.02% Sodium Azide

3. QC Results

Indirect ELISA:

Coating Antigen(s): Free Peptide

Coating Concentration: 4 µg/ml, 100 µl/well

Coating Buffer: Phosphate Buffered Saline, pH7.4

Secondary Antibody: Anti-RABBIT IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated

Table 1. Elisa results of Pre-immune serum and Purified antibody:

	Dilution	Anti-LbClCc1260 Antibody
NC	1:1,000	0.052
1	1:1,000	3.106
2	1:2,000	2.975
3	1:4,000	2.809
4	1:8,000	2.610
5	1:16,000	2.260
6	1:32,000	1.867
7	1:64,000	1.337
8	1:128,000	0.970
9	1:256,000	0.655
10	1:512,000	0.462
11	Blank	0.062
12	Blank	0.062
	Titer	1:512,000

Starting dilution: 1:1,000 (Equivalent to 1 µg/ml)

The titer is the highest dilution with S/B (Signal/Blank) >=2.1

NC is negative control (Pre-immune serum)

Approved by



David Chang

Director, Antibody Department

GenScript USA Inc

C. Anexo: Inmunofluorescencias de promastigotes de *Leishmania* con distintos anticuerpos

Figura C.3.1 Detección de proteínas CLC en promastigotes silvestres de *L.L.amazonensis* empleando un anticuerpo anti-CLC-6 de mamífero y el anti-LbCLC-A.

La primera y tercera fila corresponden a promastigotes fijados sin adición de anticuerpos primarios, pero con exposición a anticuerpos secundarios anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Con ellos se definieron los tiempos de exposición, a saber: DIC: 12 mseg; DAPI: 22 mseg; CLC-6: 120 mseg; CLC-A: 98 mseg; α -tubulina: 70 mseg. La segunda fila presenta promastigotes expuestos a anti-CLC-6 de mamífero más anti- α -tubulina. Se emplearon como anticuerpos secundarios anti-cabra (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). La cuarta fila presenta promastigotes expuestos a anti-LbCLC-A y anti- α -tubulina. Se emplearon los anticuerpos anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Las líneas denotan 10 μ m.

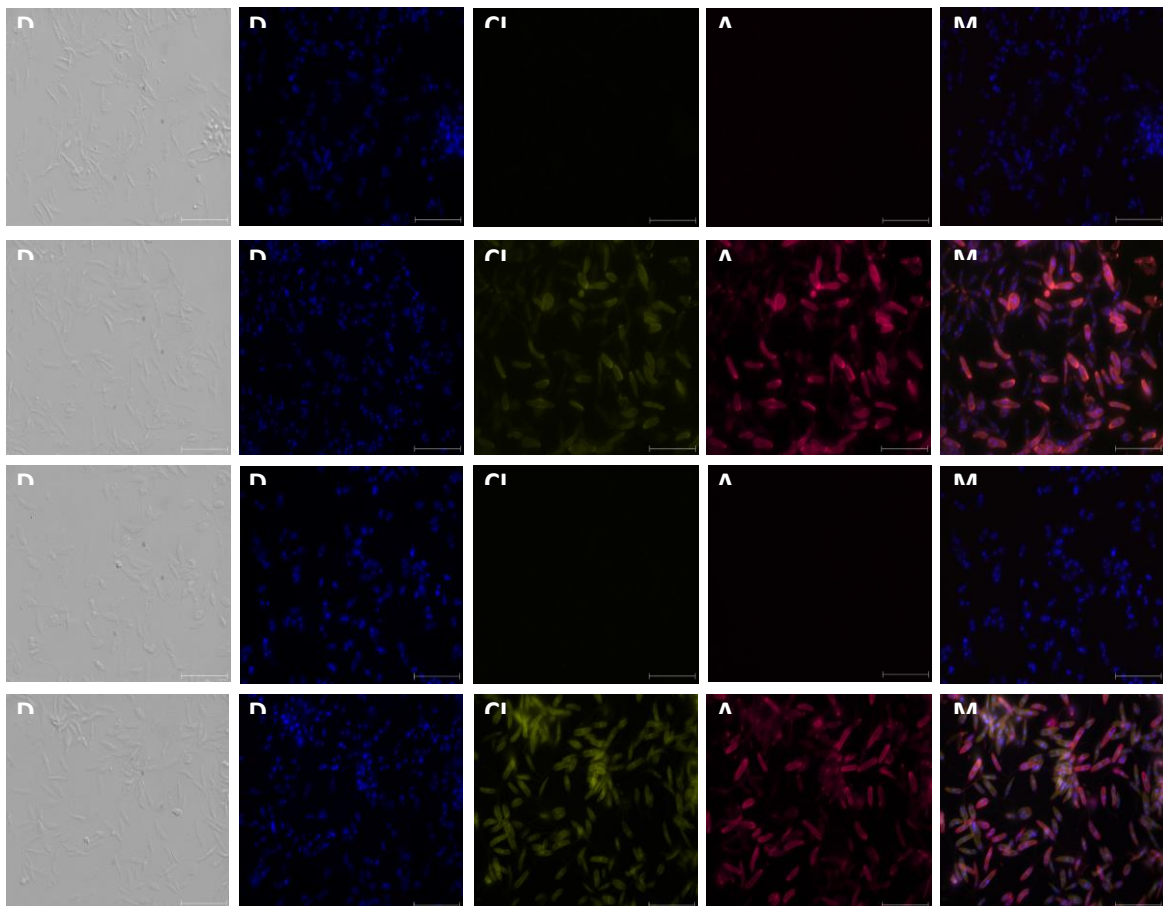


Figura A.3.2 Detección de proteínas CLC en células embrionarias de riñón 293 silvestres (HEK293 WT) empleando un anticuerpo anti-CLC-6 de mamífero y el anti-LbCLC-A.

La primera y tercera fila corresponden a HEK293 WT fijadas sin adición de anticuerpos primarios, pero con exposición a anticuerpos secundarios anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Con ellos se definieron los tiempos de exposición, a saber: DIC: 12 msec; DAPI: 22 msec; CLC-6: 120 msec; CLC-A: 98 msec; α -tubulina: 70 msec. La segunda fila presenta promastigotes expuestos a anti-CLC-6 de mamífero más anti- α -tubulina. Se emplearon como anticuerpos secundarios anti-cabra (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). La cuarta fila presenta promastigotes expuestos a anti-LbCLC-A y anti- α -tubulina. Se emplearon los anticuerpos anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Las líneas denotan 10 μ m.

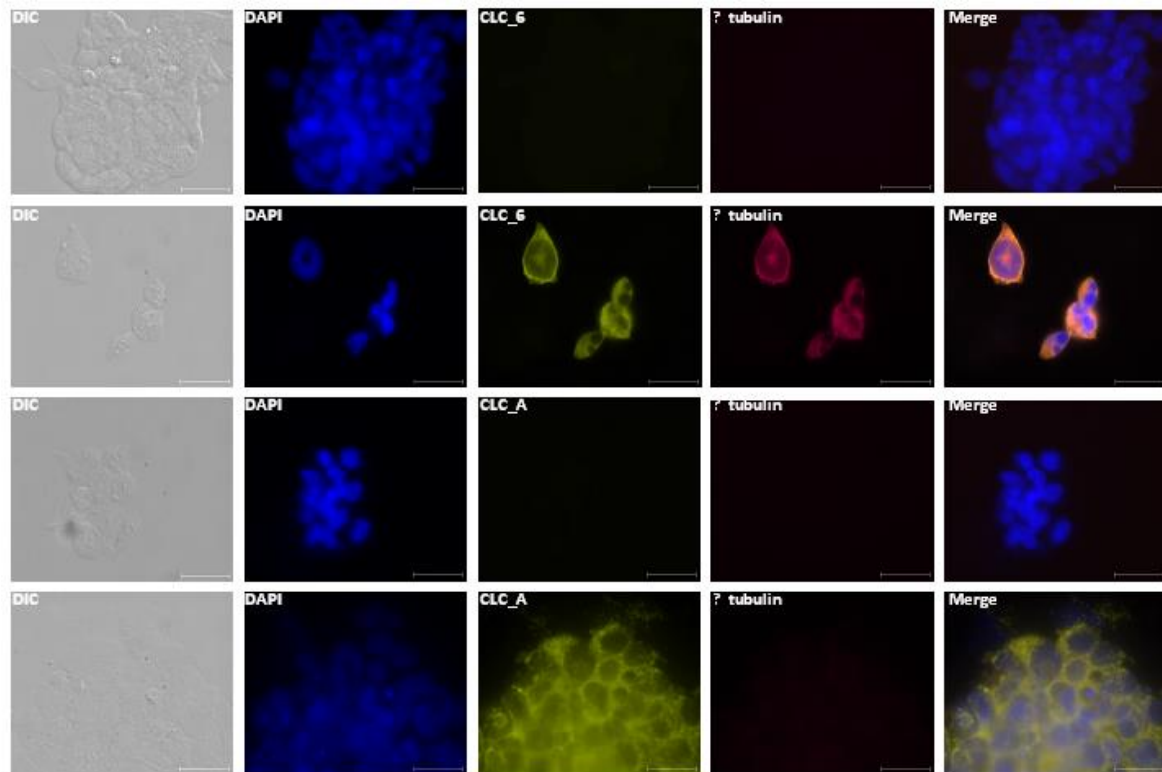


Figura A.3.3 Detección de proteínas CLC en promastigotes silvestres de *L.L.amazonensis* empleando el anticuerpo anti-LbCLC-B y el anti-LbCLC-C.

La primera y tercera fila corresponden a promastigotes fijados sin adición de anticuerpos primarios, pero con exposición a anticuerpos secundarios anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Con ellos se definieron los tiempos de exposición, a saber: DIC: 9 msec; DAPI: 18 msec; CLC-B: 150 msec; CLC-C: 120 msec; α -tubulina: 60 msec. La segunda fila presenta promastigotes expuestos a anti-CLC-B más anti- α -tubulina. Se emplearon como anticuerpos secundarios anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). La cuarta fila presenta promastigotes expuestos a anti-LbCLC-C y anti- α -tubulina. Se emplearon los anticuerpos anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Las líneas denotan 10 μ m.

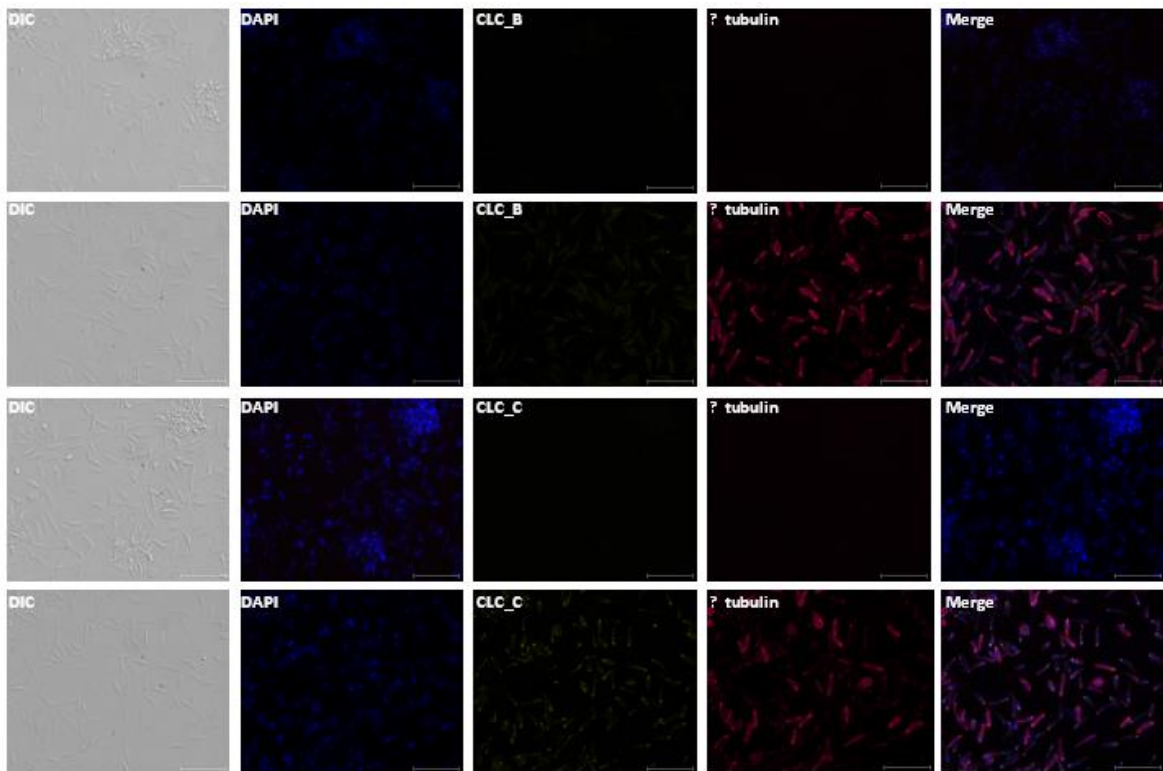


Figura A.3.4 Detección de una proteína CLC en promastigotes silvestres de *L.V.braziliensis* empleando un anticuerpo anti-CLC-6 de mamífero.

De izquierda a derecha se presentan imágenes de promastigotes vistos por DIC, ácidos nucleicos con DAPI y una proteína CLC. Notar que la marcación con el anti-CLC-6 es netamente intracelular puntiforme bien definida, similar a la observada empleando el anti-LbCLC-B. Las líneas denotan 10um.

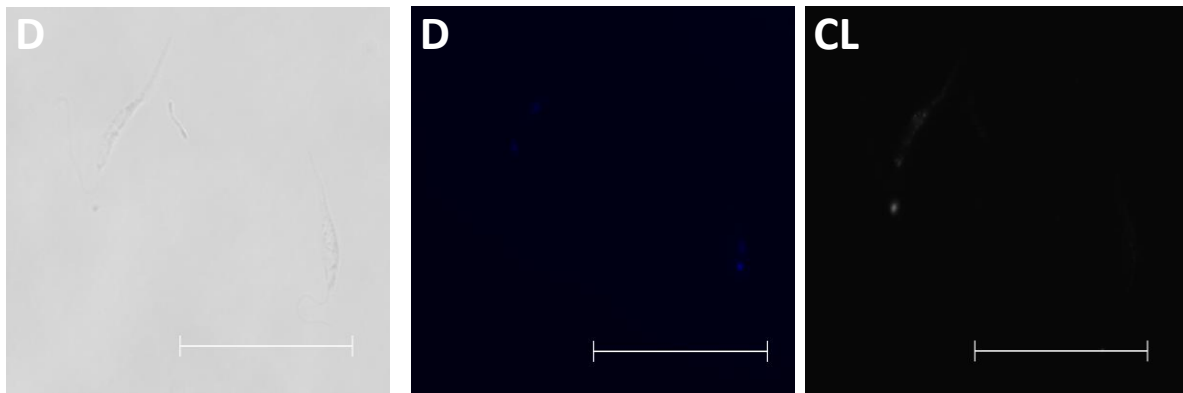


Figura A.3.5 Detección de proteínas CLC en células embrionarias de riñón 293 silvestres (HEK293 WT) empleando el anticuerpo anti-LbCLC-B y el anti-LbCLC-C.

La primera y tercera fila corresponden a HEK293 WT fijadas sin adición de anticuerpos primarios, pero con exposición a anticuerpos secundarios anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Con ellos se definieron los tiempos de exposición, a saber: DIC: 9 mseg; DAPI: 18 mseg; CLC-B: 150 mseg; CLC-C: 120 mseg; α -tubulina: 60 mseg. La segunda fila presenta promastigotes expuestos a anti-CLC-B más anti- α -tubulina. Se emplearon como anticuerpos secundarios: anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). La cuarta fila presenta promastigotes expuestos a anti-LbCLC-C y anti- α -tubulina. Se emplearon los anticuerpos secundarios: anti-conejo (AlexaFluor546[®]) y anti-ratón (AlexaFluor647[®]). Las líneas denotan 10 μ m.

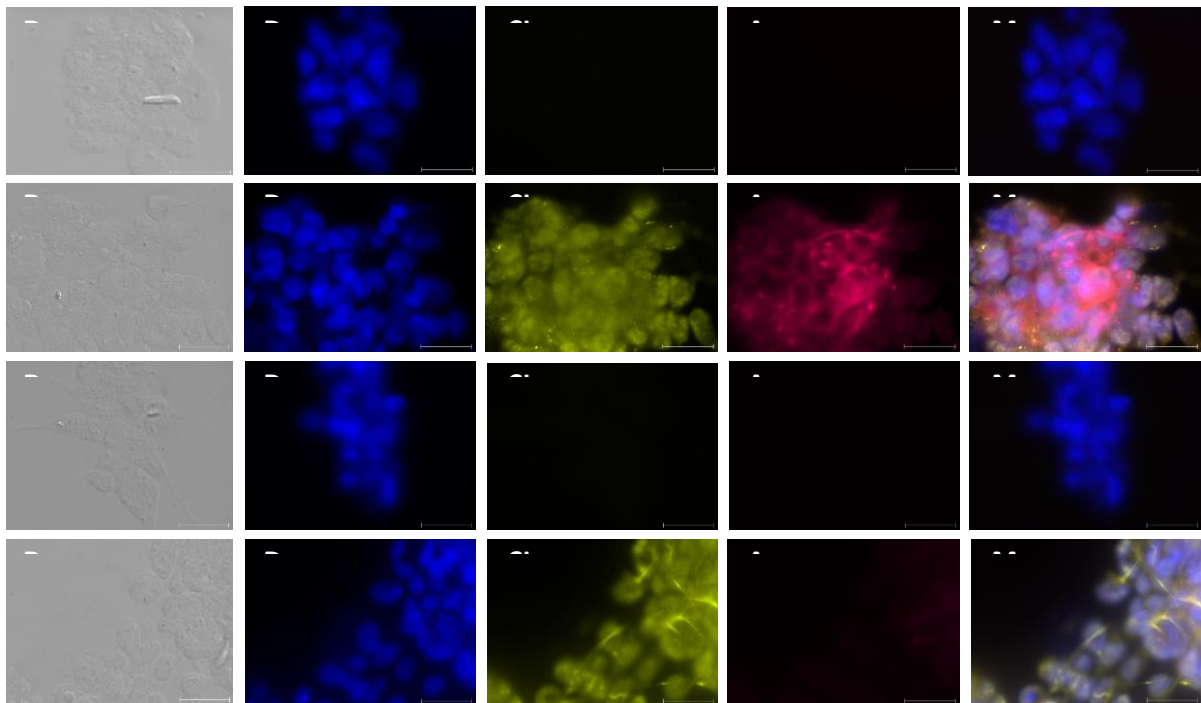


Figura A.3.6 Detección de la proteína Lamp-1 en promastigotes silvestres de *L.V.braziliensis*.

A-D: control negativo: promastigotes no inmunomarcados contra Lamp-1 o LbCLC-B. A) DIC; B) DAPI; C) Epifluorescencia en filtro para detectar AlexaFluor[®]488. D) Epifluorescencia en filtro para detectar AlexaFluor[®]647; E-L: promastigotes inmunomarcados contra LbCLC-B (AlexaFluor[®]488) y Lamp-1 (AlexaFluor[®]647). E) DIC; F) DAPI; G) LbCLC-B; H) Lamp-1; I) Superposición G-H; J) superposición F y H; K) superposición F y G; L) superposición F-H. En este experimento se pudo observar el mismo patrón previamente descrito para LbCLC-B. Sin embargo, la inmunodetección de Lamp-1 fue muy tenue, por lo que no fue posible definir si hay o no colocalización entre ambas. Adicionalmente hubo demasiado material particulado fluorescente en 488 que alteró también la fluorescencia en 647nm y limitó aún más la interpretación. La falta de intensidad en la fluorescencia observada en Lamp-1 podría deberse a que se usó un anticuerpo policlonal anti-Lamp-1 de cabra. De forma que al no tener los epítopes especie específicos, tampoco habrá una marcación muy clara. Para las epifluorescencias se empleó la intensidad II/VI del haz de luz UV y los siguientes tiempos de exposición: DIC: 17 mseg; DAPI: 140 mseg; AlexaFluor[®]488: 900 mseg; AlexaFluor[®]647: 250 mseg.

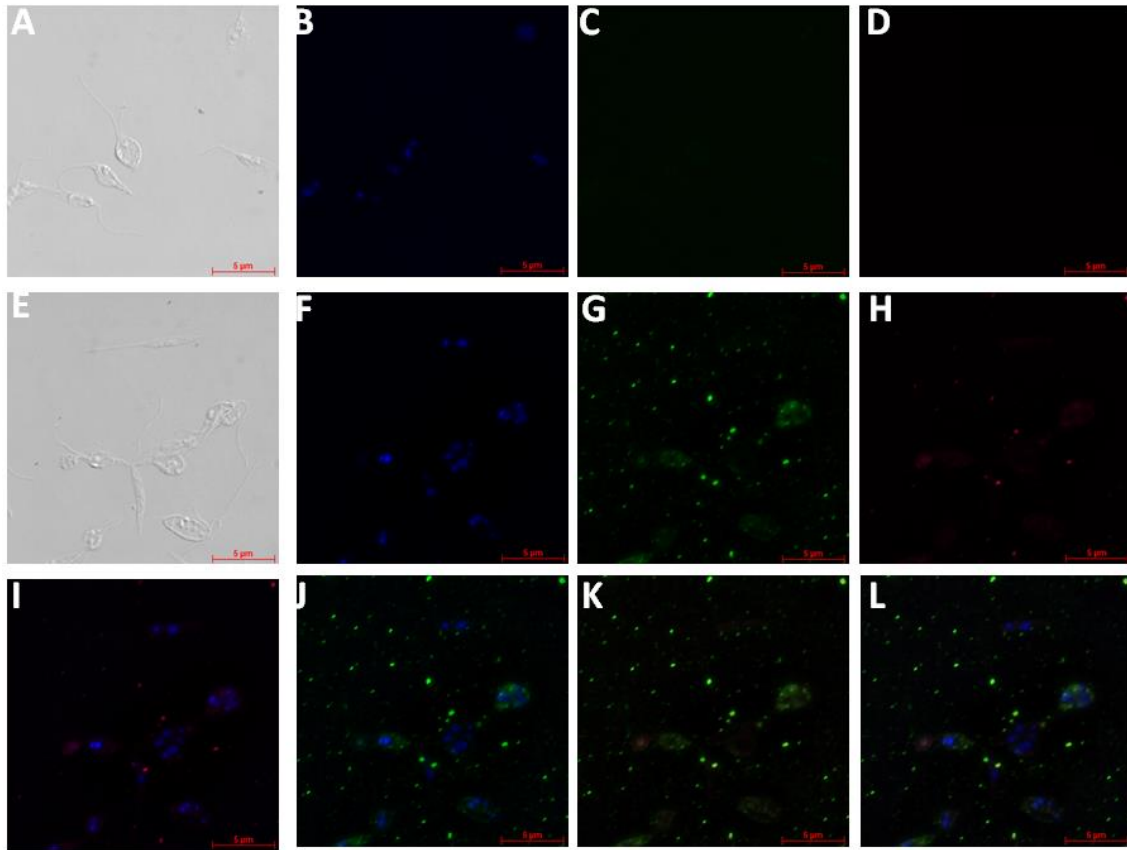


Figura A.3.7 Detección de la proteína Lamp-2 en promastigotes silvestres de *L.V. braziliensis*.

A-D: Control negativo: promastigotes no inmunomarcados contra Lamp-2 o LbCLC-B. A) DIC; B) DAPI; C) Epifluorescencia en filtro para detectar AlexaFluor®488. D) Epifluorescencia en filtro para detectar AlexaFluor®647; E-L: promastigotes inmunomarcados contra LbCLC-B (AlexaFluor®488) y Lamp-2 (AlexaFluor®647). E) DIC; F) DAPI; G) LbCLC-B; H) Lamp-2; I) Superposición G-H; J) superposición F y H; K) superposición F y G; L) superposición F-H. En este experimento se pudo observar el mismo patrón previamente descrito para LbCLC-B. Sin embargo, la inmunodetección de Lamp-2 fue muy tenue, por lo que no fue posible definir si hay o no colocalización entre ambas. La falta de intensidad en la fluorescencia observada en Lamp-2 podría deberse a que se usó un anticuerpo policlonal anti-Lamp-2 de cabra. De forma que al no tener los epítopes especie específicos, tampoco habrá una marcación muy clara. Para las epifluorescencias se empleó la intensidad II/VI del haz de luz UV y los siguientes tiempos de exposición: DIC: 8 msec; DAPI: 161mseg; AlexaFluor®488: 1500 msec; AlexaFluor®647: 84 msec.

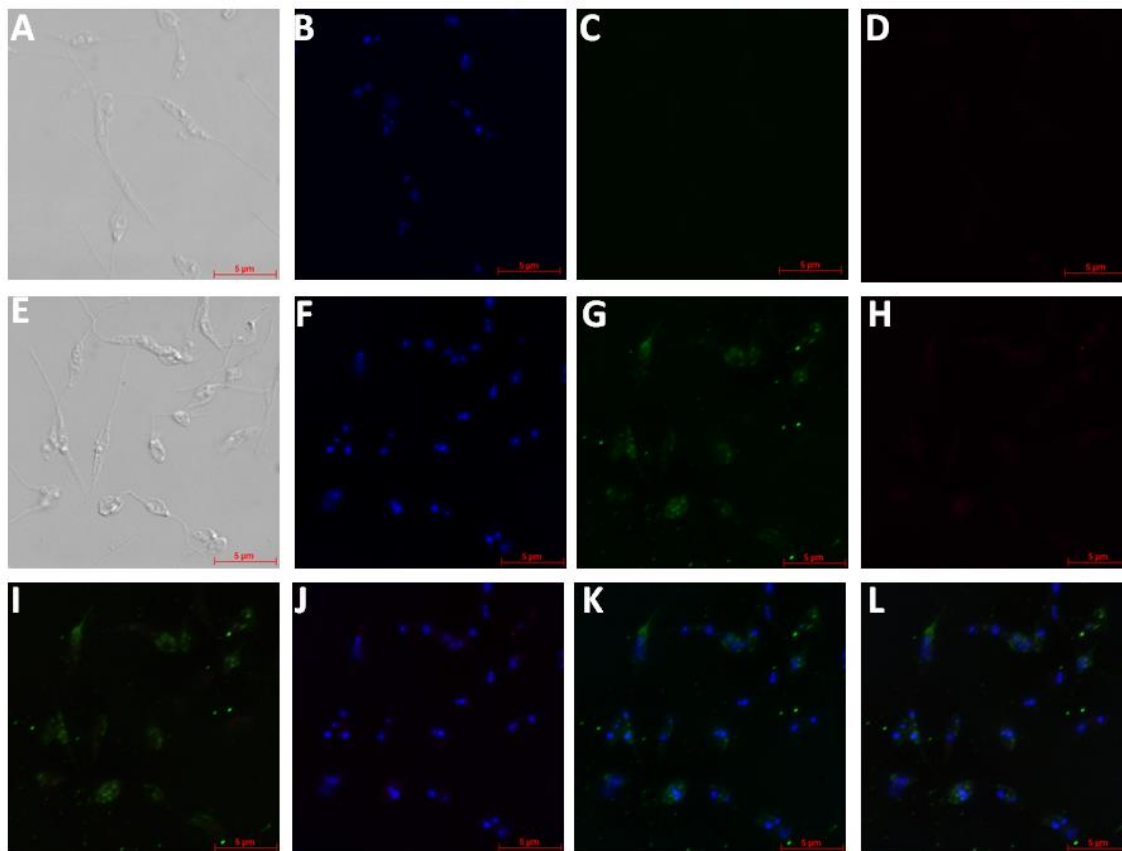
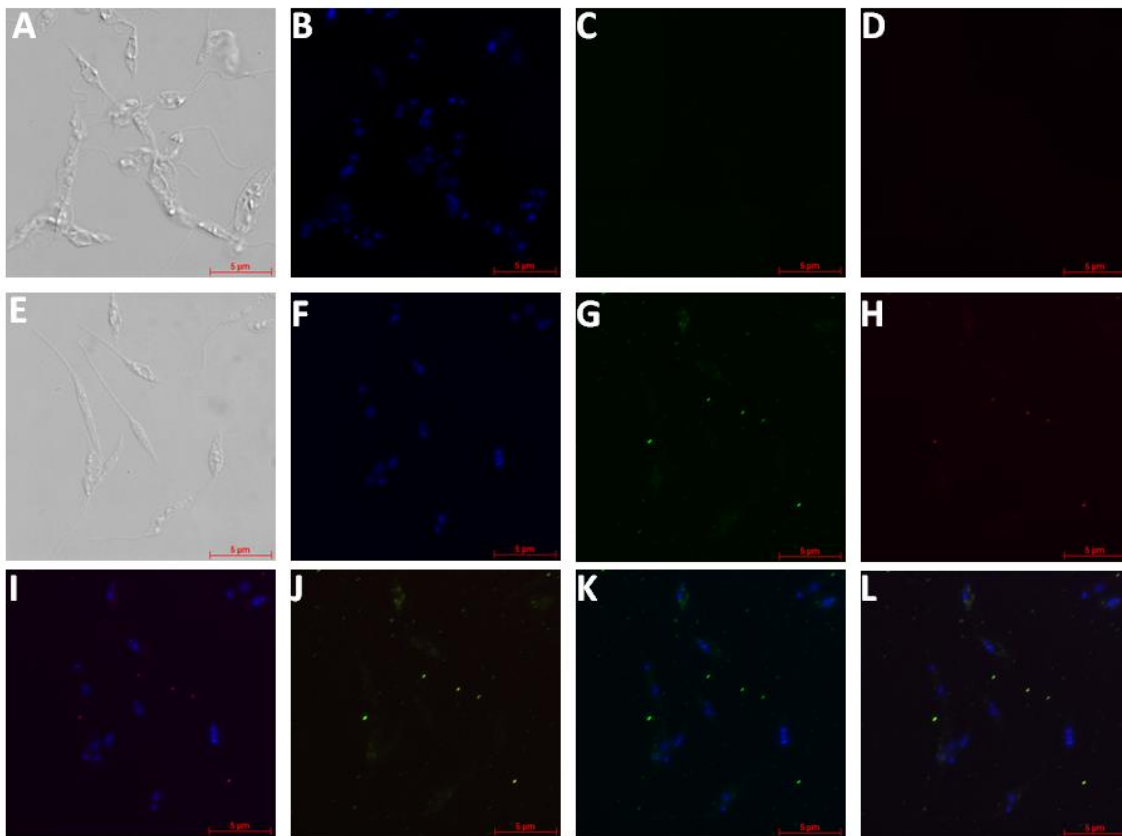


Figura A.3.8 Detección de la proteína V-ATPasa en promastigotes silvestres de *L. V. braziliensis*.

A-D: Control negativo: promastigotes no inmunomarcados contra V-ATPasa o LbCLC-B. A) DIC; B) DAPI; C) Epifluorescencia en filtro para detectar AlexaFluor®488. D) Epifluorescencia en filtro para detectar AlexaFluor®647; E-L: promastigotes inmunomarcados contra LbCLC-B (AlexaFluor®488) y V-ATPasa (AlexaFluor®647). E) DIC; F) DAPI; G) LbCLC-B; H) V-ATPasa; I) Superposición G-H; J) superposición F y H; K) superposición F y G; L) superposición F-H. En este experimento se pudo observar el mismo patrón previamente descrito para LbCLC-B. Sin embargo, la inmunodetección de Lamp-2 fue muy tenue, por lo que no fue posible definir si hay o no colocalización entre ambas. La falta de intensidad en la fluorescencia observada en V-ATPasa podría deberse a que se usó un anticuerpo policlonal anti- V-ATPasa de cabra. De forma que al no tener los epítopes especie específicos, tampoco habrá una marcación muy clara. Para las epifluorescencias se empleó la intensidad II/VI del haz de luz UV y los siguientes tiempos de exposición: DIC: 14 msec; DAPI: 140 msec; AlexaFluor®488: 900 msec; AlexaFluor®647: 250 msec.



D. Secuencias desde el promotor T7 de los plásmidos pSGEM LbCLC-A y pSGEM-LbCLC-B

pSGEM_LbCLC-A

Verde: sitio de reconocimiento Xba I

Amarillo: Inicio del gen *LbCLC-A* clon 1

Azul: *X.laevis* beta-globin mRNA, 5' UTR

```

pSGEM+CLCAteo  -----GGGCGAATTAATTCGAGCTCGGTACCCAGCTTGCTTGTCTTTTTGCAGAAGC
pSGEM+CLCAseq  NNNNNNNNNGGNNNANTNNTCGAGCTCGGTACCCAGCTTGCTTGTCTTTTTGCAGAAGC
*  ..  *****

pSGEM+CLCAteo  TCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCAATTCC-CCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTA
pSGEM+CLCAseq  TCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCAATTCACCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTA
*****

pSGEM+CLCAteo  GAATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGACGAGGCCA
pSGEM+CLCAseq  GATGACGGAAGCAGGCGGCAGTTGCGGTGGCAACGGGGTCGGCGGTGACGACGAGGCCA
*****

pSGEM+CLCAteo  TCACGCACTTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCA
pSGEM+CLCAseq  TCACGCACTTAGTGGTGAACGTTCCAGAGGCCGATTGGGCGACGATCGACTGCTTCAGCA
*****

pSGEM+CLCAteo  GCTACACGGAGGCGGCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATACCATACCATCTACCA
pSGEM+CLCAseq  GCTACACGGAGGCGGCAGAGCGGGCCGCGATGCGGCGTCGCCATACCATACCATCTACCA
*****

pSGEM+CLCAteo  CTCACTCGCCATACGGAGAGAAGCGTCCCGGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAG
pSGEM+CLCAseq  CTCACTCGCCATACGGAGAGAAGCGTCCCGGTACAGCTTCCAGGGGGAGGCTTTCTTAG
*****

pSGEM+CLCAteo  CAGCCTTGCGTGC GGAATCGCGCTCGGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGC
pSGEM+CLCAseq  CAGCCTTGCGTGC GGAATCGCGCTCGGCTGCCTCGGCGTCATCAGCGACGCGTGTGCGC
*****

pSGEM+CLCAteo  GTTGGGTGAGCGCCTCCGCAGTGGGATTTGCGGAACTTTTTCTGGCTGGATCGCAGCC

```

pSGEM+CLCAseq GTTGGGTGAGCGCCTTCCGAGTGGGATTTGCGCGAACTTTTTCTGGCTGGATCGCAGCC

pSGEM+CLCAteo TGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCATGAGTACTACTCCTGGGGCGAATTCTTTCTCG

pSGEM+CLCAseq TGTGTTGCGTCGACAGCAACGAGTGCATGAGTACTACTCCTGGGGCGAATTCTTTCTCG

pSGEM+CLCAteo GCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTGTGACTTCGTCATGTATGTCGGCTTCTCCACCC

pSGEM+CLCAseq GCCGCGACAACCACGTCGTCGCGTTTGTGACTTCGTCATGTATGTCGGCTTCTCCACCC

pSGEM+CLCAteo TGGCGGCAGTCACGGCGGCGTACCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCCTCTGGCGGTG

pSGEM+CLCAseq TGGCGGCAGTCACGGCGGCGTACCTGTGCAAGACCTACGCCCCCTATGCCTCTGGCGGTG

pSGEM+CLCAteo GCATTGCGGAGGTGAAGACGATCGTGTGCGGGCTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGTGGCT

pSGEM+CLCAseq GCATTGCGGAGGTGAAGACGATCGTGTGCGGGCTACCACGTCAAGCGGTACCTTGGTGGCT

pSGEM+CLCAteo GGAACTCATCACGAAGGTGCGGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTTGACGGTGG

pSGEM+CLCAseq GGAACTCATCACGAAGGTGCGGCCATGTGCTTTTCTACAGGGTCCGGCTTGACGGTGG

pSGEM+CLCAteo GGAAGGAGGGCCCCCTTTGTCCACATCGGCGCCTGCGTCGGCGGCATCATCTCCGGAGCCT

pSGEM+CLCAseq GGAAGGAGGGCCCCCTTTGTCCACATCGGCGCCTGCGTCGGCGGCATCATCTCCGGAGCCT

pSGEM+CLCAteo TTCCGAGCTATCAGCAGGAGACCAAAGAGCGCGAACTCATTACCGCCGGCGGGCGGGTGG

pSGEM+CLCAseq TTCCGAGCTATCAGCAGGAGACCAAAGAGCGCGAACTCATTACCGCCGGCGGGCGGGTGG

pSGEM+CLCAteo GCATGGCCGTCGCCTTTGGTGCCCCGTCGGCGGCGTCATTTTCGCCTTGAGGATGTCT

pSGEM+CLCAseq GCATGGCCGTCGCCTTTGGTGCCCCGTCGGCGGCGTCATTTTCGCCTTGAGGATGTCT

pSGEM-LbCLC-B

Azul: sitio de reconocimiento BamHI

Amarillo: inicio del gen *LbCLC-B*

```

pSGEM+LbCLC-Bteo  -----GGGCGAATTAATTCGAGCTCGGTACCCAGCTTGCTTGTCTTTTTGCAGAAGCT
pSGEM+LbCLC-Bsec  NNNNNNNNNNNNNANTNNTCGAGCTCGGTACCCAGCTTGCTTGTCTTTTTGCAGAAGCT
                ... *****
pSGEM+3670        CAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCAATCCCCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
pSGEM+3670clon1   CAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCAATCCCCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
                *****
pSGEM+3670        AACTAGTGGATCCGGTATGAGTGCACGGTACGGCACTGCTGGCTCTAGCGGGTACTTGA
pSGEM+3670clon1   AACTAGTGGATCCGGTATGAGTGCACGGTACGGCACTGCTGGCTCTAGCGGGTACTTGA
                *****
pSGEM+3670        CACGCCGTCCGCTACCTGCCGCAGGCGAGAGGCGGACGCAGCGACGGCTGCCTGTTCTA
pSGEM+3670clon1   CACGCCGTCCGCTACCTGCCGCAGGCGAGAGGCGGACGCAGCGACGGCTGCCTGTTCTA
                *****
pSGEM+3670        CGAGCTTAGGAGGGAAGTGGAGGAAGCCGGGGACGCCGCGGTAATCGTTCTCGAGCGCC
pSGEM+3670clon1   CGAGCTTAGGAGGGAAGTGGAGGAAGCCGGGGACGCCGCGGTAATCGTTCTCGAGCGCC
                *****
pSGEM+3670        ACTGTTTGAGAAGGCCACCGCCCGCACGTGTTTACCGCAGAGGAGCGACGGCGCATGGA
pSGEM+3670clon1   ACTGTTTGAGAAGGCCACCGCCCGCACGTGTTTACCGCAGAGGAGCGACGGCGCATGGA
                *****
pSGEM+3670        TTGCTATGAGAGCATTGATTACGCCGAGGGTCAATCCCTCGTTCACCGCGTCAGTACTAC
pSGEM+3670clon1   TTGCTATGAGAGCATTGATTACGCCGAGGGTCAATCCCTCGTTCACCGCGTCAGTACTAC
                *****
pSGEM+3670        TCGCCAAAGTCAGACGGACACGCAAGGGTGGCTGCGTCTGGCGATGTTTATCTTGATCGG
pSGEM+3670clon1   TCGCCAAAGTCAGACGGACACGCAAGGGTGGCTGCGTCTGGCGATGTTTATCTTGATCGG
                *****
pSGEM+3670        CCTCGCCGTTGGCGGCTGGTCCCTTCTGCTGCTTCAGACACTAGACTACCTTGCGGAGGT
pSGEM+3670clon1   CCTCGCCGTTGGCGGCTGGTCCCTTCTGCTGCTTCAGACACTAGACTACCTTGCGGAGGT
                *****
pSGEM+3670        GAAGCTGAATGCGGTGCAGGGGGTGGTGCAGCCGCAACAGTACTTATTCGCTGTTTAA
pSGEM+3670clon1   GAAGCTGAATGCGGTGCAGGGGGTGGTGCAGCCGCAACAGTACTTATTCGCTGTTTAA
                *****

```


pSGEM+3670 CGAGTCTAGCTTCTACATGTCGTCGCTGCGGAGCTCTGAAACAAGAGCGGTGACGACGG
 pSGEM+3670clon1 CGAGTCTAGCTTCTACATGTCGTCGCTGCGGAGCTCTGAAACAAGAGCGGTGACGACGG

pSGEM+3670 CAGCACTGCGATAGTGCTGCGCACGATATCGTGGTCAGCGCTGCTACGCGGATGGATGCT
 pSGEM+3670clon1 CAGCACTGCGATAGTGCTGCGCACGATATCGTGGTCAGCGCTGCTACGCGGATGGATGCT

pSGEM+3670 GCACACGATGTGGGGCATGCTGATGGCGCTTCTGTCGTCTCTGCTGCCTTGTCTATGCC
 pSGEM+3670clon1 GCACACGATGTGGGGCATGCTGATGGCGCTTCTGTCGTCTCTGCTGCCTTGTCTATGCC

pSGEM+3670 GAGCGCCGCTGGCAGCGGTATCCCGGATGTTATGGCGTACCTCAACGGCGTCATGTTCCC
 pSGEM+3670clon1 GAGCGCCGCTGGCAGCGGTATCCCGGATGTTATGGCGTACCTCAACGGCGTCATGTTCCC

pSGEM+3670 GCGCATCTTCAACGTTCCGAATCTGGTGATCAAGTCGCTCTCGTGCATCCTCGCAGTGAG
 pSGEM+3670clon1 GCGCATCTTCAACGTTCCGAATCTGGTGATCAAGTCGCTCTCGTGCATCCTCGCAGTGAG

pSGEM+3670 TGCCGGTTTGCCAGTGGGAATAGAGGGGCCTATGATTCACATGGGGTCGCTTATTGGAGC
 pSGEM+3670clon1 TGCCGGTTTGCCAGTGGGAATAGAGGGGCCTATGATTCACATGGGGTCGCTTATTGGAGC

E. Secuencia pSP72RaNeoGFP

TTGTAGTTTTTTTTTCGTATGTTGGATTGGATTGGTGTATATTATGTGGCGTTATCGTATGCTGAGGTTTTTTTT
 AGTAGTCTGTAATACATGGGAGTGAGGAAAGGAAAGGTGTTACTTGTAGTGTACCGTCCGTGATCTTTACTCCTGTGT
 CCGACACCGAAGCATACTGCCATTGTGTTAGTTGTGTAATGTGTCTGGGCAACCACTGAATTGAGAAGGGAAGTCGA
 AACGGTGCGTGGATGCTATGTTTGTGCTACATACAAGCAGAGGCAACAACAAGCGCATCGAGCGAGACGAACCAACC
 CTATATTCACACAACGTGACGTGCCCCGCCACTCCCTCTTGAAGAGAGGCGATGTGTGCCGTGTACCACCACGTA

GCGGCGTTTGTGTGTGTGTGTGCGCGTGTGGGGTCCCTGgTGTGGACTcGAACGGCCACGCCCTGCCCTCCCCG
CCTGCGACGTTTTCTGCGCACCCGTTCTCTCCTTCTCGTGTGTGTGCGCGCATGCACACGCGCGTGTGCCGCA
GCGCTGTATTTTTGTGGAGGGGCAGAGCCCTGCCTCCCCGCCTCTCTGCCGTTGGCAGGTGAACGCAAACGAAGCGAG
AGGGCAGTGTGCATGTGTGTGCGAGGGCATGCGGAGCCCCCTCCCCCGCCCCCTGCCGTGTGCACCGCTATTGTGG
CGTCTTCTCTCGTTGTGCGCAAGTGTGGCTGCACCACGGCCGCTCATGTGCGTGTGTGCGCATGTACACACACACACA
CACACACACACACACGGGCAGGGCAGCGCTCTCTCTTTCAGGGAGCGCCGCCCGCTGGTGTGATTGGACGAGCA
TCCGCCGCGCATCTTTCACCCCTCACCCCTCATCCCTCTCCCCTCTCCCCGCACACACACGAGTCCTTCGCTTTAC
TCTTCGAACAAACACCTCAAACCATCTTATCACCTTTCTCTTCTCCTTGTGCGGGGATCCTCTAGAATGGTGAAGCAAG
GCGAGGAGCTTTCACCGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCGTGCC
TGCCCCACCCCTCGTACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACT
TCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCTGGGGACAAGCTGGAGTAACTACAACAGCCACAAGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACCCCCAT
CGGCGACGGCCCCGTGTGTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAGC
TTCAGCTGCTCGAGTTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCGT
TCTAACGACAATATGTCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACCC
CGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
GAGTGCATGTGTGAGGTTTTTACCCTCATACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTTTA
TAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT
GTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGT
CACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
CGCGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAG
TACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTG
ATAACTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGA
TCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
GTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTAATACTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC
ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT

AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAA
GATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG
ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGG
TGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATC
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGAC
TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTT
CCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCC
TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC
CAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATGCAGGTTAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGAC
TCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGCTGTGCACTTGTGGGATTTGT

Secuencia fragmento F1_R1

>F1R1

CCCCGNGACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAATGAGTGACCGTACGGCACTGCTGGCTCTAGCGGGGTAC
TTGACACGCCGTCCGCTACCTGCCGAGGCGAGAGGCGGACGCAGCGACGGCTGCCTGTTCTACGAGCTTAGGAGGGA
AGTGGAGGAAGCCGGGGACGCCGCGTAAATCGTTCTCGAGCGCCACTGTTTGAGAAGGCCACCGCCCGCACGTGTTT
ACCGCAGAGGAGCGACGGCGCATGGATTGCTATGAGAGCATTGATTACGCCGAGGGTCAATCCCTCGTTCACCGCGTCA
GTACTACTCTACGTTTACGACCATATCTCTGTTCAACAGACGTCCGGGGCCGGTTACCGTGCCTACAGGAATTANNNT
NNNCNNNNGNNNNTNANNNNNTAAGANGGTATCCGGGNTGCGNGCNTAGAAGGTCAGTAGTACTGACGCGGTGAACGAG
GGATTGACCCTCGNGTAATCAATGCTNTCATAGCAATCCATGCCCGTCTCCTCTGCGGTAAACACGTGCGGGCGG
TGGCCTTCTCAAACAGTGGCGCTCGAGAAGATTACCAGCGCGTCCCGGCTTCTCCACTTCCCTCCTAAGCTCGT
AGAACCAGGCAGCCGTGCTGCGTCCGCCTCTCGCTGCGGCAGGTAGCGGACGGCGTGTCAAGTACCCCGCTAGAGCC
AGCAGTGCCGTACCGTGCACCTATTCTAGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCA

TCTCTGCCGTTGGCAGGTGAACGCAAAACGAAGCGAGAGGGCAGTGTGCATGTGTGTGCGAGGGCATGCGGAGCCCCC
TCCCCCGCCCCCTGCCGTGCTGCACCGCTATTGTGGCGTCTTCTCTCGTTGTGCGCAAGTGTGGCTGCACCACGGCCG
CCTcATGTGCGTGTGTGCGCATGTACACAcACACACACACACACAcACACACAGGGCAGGGCAGCTCCTCTCTTT
CAGGGAGCGCCGCCCGCTGGTGTATTGGACGAGCATCCGCCGCGCATCTTTCACCCCTCACCCCTCATCCCTCTCC
CCTCTCCCCGCACACACACGAGTCTTCGCTTTCACTCTTGAACAAACACCTCAAACCATCTTATCACCTTTCTCTC
TTCCGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG
GCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGCCG
CCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGG
CCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGT
GCCGGGGCAGGATCTCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGCGGCTG
CATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAG
CCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGC
GCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCG
TTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTG
CTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGC
CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGC
CATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGAT
GATCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCCATCGAATTCCTGCAGCGGAGCCGCTGCTGCCGC
CGTGAATGTATGCGCGTGTGTGTGACGGCCGGCTCGAGGGAGGAGGAGGAGGGCGCGTGCCTGCGTGGGTTATGTG
TGCGTGCGTGTGTGTGCGGTGCGCCTTCTCTTTTTTTTCTCCCTCTCGTGGTTTTTTTTTCTGAGGAGACGGG
GCGAAGACGCGAGCGGGCGGGCGGCTTGTGTGTGTGTGCGCGTGTGCGGGGACGCGGTGTTGGCGAACGGCCACG
CCCTGCCCCCTCCCCGCCCTGCGACGTTTCTGCGCACCCGTTCTCTCCTTCCCTCGTGCCTGTCTGCCGCGCATGCACAC
GCGCGCGTGTGCCGACGCGCTGATTTTTGTGGAGGGGAGAGCCCTGCCCTCCCCGCTCTGCGGTTGGCAGGTGA
ACGCAAAACGAAGCGAGAGGGCAGTGTGCATGTGTGTGCGAGGGCATGCGGAGCCCCCTCCCCCGCCCCCTGCCGTG
CTGCACCGCTATTGTGGCGTCTTCTCTCGTTGTGCGCAAGTGTGGCTGCACCACGGCCGCTCATGTGCGTGTGTGCGC
ATGTACACACACACACACACACACACACACACAGGGCAGGGCAGCTCCTCTCTTTCAGGGAGCGCGCCCCGCTG
GTGTCATTGGACGAGCATCCGCCGCGCATCTTTCACCCCTCACCCCTCATCCCTCTCCCTCICCCCGCACACACAG
CAGTCTTTCGCTTTCACTCTTGAACAAACACCTCAAACCATCTTATCACCTTTCTCTCTTCTTGTGCGGGGATCCTC
TAGAATGAGTGCACGGTACGGCACTGCTGGCTCTAGCGGGTACTTGACACGCCGTCCGCTACCTGCCGACGGCAGAG
GCGGACGACGACGGCTGCCTGGTTCTACGAGCTTAGGAGGAAGTGGAGGAAGCCGGGACGCCGCGGTAATCGTT
CTCGAGCGCCACTGTTTGAGAAGGCCACCGCCGACGCTGTTACCAGAGGAGCGACGGCGCATGGATTGCTATGA
GAGCATTGATTACGCCGAGGGTCAATCCCTCGTTACCCGCTCAGTACTACTCTACGTTTACGACCATATCTCTGTTCA
ACAGACGTCGGGGCGGTTACCGTGCCTACAGGAATTANNNTNNCNNNNNNTNANNNTAAGANGGTATCCG
GGNTGCGNGCNTAGAAGGTCAGTAGTACTGACGCGGTGAACGAGGATTGACCCTCGGNGTAAATCAATGCTNTCATAGC

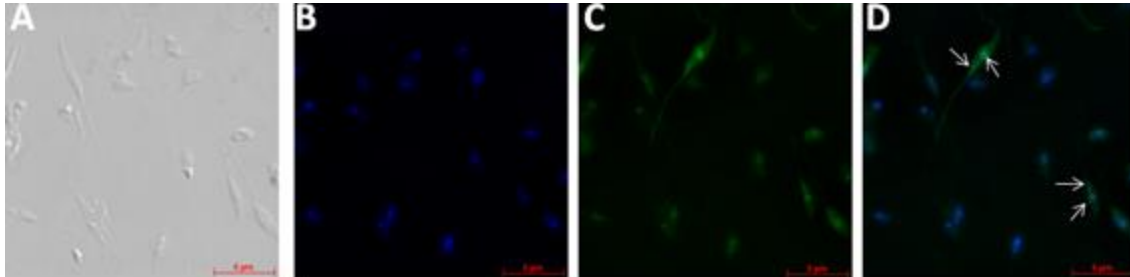
AATCCATGCGCCGTCGCTCCTCTGCGGTA AACACGTGCGGGCGGTGGGCCCTTCTCAAACAGTGGCGCTCGAGAACGATT
TACCGCGGGCGTCCCCGGCTTCTCCACTTCCCTCCTAAGCTCGTAGAACAGGCAGCCGTCGCTGCGTCCGCCTCTCGC
CTGCGGCAGGTAGCGGACGGCGTGTCAAGTACCCCGCTAGAGCCAGCAGTGCCGTACCGTGCACTCATTCTAGAATGGT
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGCCACAAGTTC
AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC
CCGTGCCCTGGCCACCTCTGTGACCACCTTACCTACGGCGTGACGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCA
GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC
AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA
CGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA
GTAAAAGCTTCAGCTGCTCGAGTCTATAGTGCACCTAAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGT
AGCCGCGTTCTAACGACAATATGTCCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCC
CCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACC
GTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCAACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCC
TATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
CCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAA
TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTCCTTCTG
TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACT
TGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAAC
CATGAGTGATAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA
CGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT
AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGAT
AAATCTGGAGCCGGTGGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
TTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAA
GCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATC
TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCG
TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAAAAAACCACCGCT
ACCAGCGGTGGTTTGTTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGCGCAGATA
CCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTC

TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
GGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
AGATACCTACAGCGTGAGCWWTGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCA
GGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA
CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTT
TTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGA
AGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGGTTAACCTGGCTTATCGAAATT
AATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCT

F. Distribución intracelular de la proteína verde fluorescente en promastigotes de *L. V. braziliensis* transformados con *pSP*

Figura A.6 Localización de la proteína verde fluorescente (GFP) en promastigotes de *L. V. braziliensis*.

A) DIC; B) marcación de ácidos nucleicos con DAPI; C) GFP. D) Superposición de imágenes B y C. Notar que la GFP tiene una distribución por todo el soma y flagelo del promastigote, con especial acumulación en núcleo y kinetoplasto (Flechas).



Bibliografía

Accardi, A. & Miller, C. (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl⁻ channels. *Nature*, *427*, 803-807.

Accardi, A., Walden, M., Nguitragool, W., Jayaram, H., Williams, C., & Miller, C. (2005). Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen.Physiol*, *126*, 563-570.

Al, K. H., Brown, L. J., Hossain, K. R., Hudson, A. L., Sinclair-Burton, A. A., Ng, J. P. *et al.* (2015). Members of the chloride intracellular ion channel protein family demonstrate glutaredoxin-like enzymatic activity. *PLoS One.*, *10*, e115699.

Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., & Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect.Immun.*, *58*, 779-787.

Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., & Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, *6*, 392-401.

Arellano, R. O. & Miledi, R. (1995). Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl⁻ currents in *Xenopus* follicles. *J Physiol*, *488* (Pt 2), 351-357.

Atayde, V. D., Ullu, E., & Kolev, N. G. (2012). A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem-loop RNA. *Mol.Biochem.Parasitol.*, *184*, 55-58.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. *et al.* (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.

Baker, J. L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R. B., & Breaker, R. R. (2012). Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science*, *335*, 233-235.

Barnes, R. L., Shi, H., Kolev, N. G., Tschudi, C., & Ullu, E. (2012). Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in *Trypanosoma brucei* and provides insight into the core machinery. *PLoS Pathog.*, *8*, e1002678.

- Basile, G. & Peticca, M. (2009). Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol.Biotechnol.*, *43*, 273-278.
- Bera, T., Lakshman, K., Ghanteswari, D., Pal, S., Sudhakar, D., Islam, M. N. *et al.* (2005). Characterization of the redox components of transplasma membrane electron transport system from *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim.Biophys.Acta*, *1725*, 314-326.
- Blum, J. J. (1992). Effect of osmolality on 86Rb^+ uptake and release by *Leishmania donovani*. *J Cell Physiol*, *152*, 111-117.
- Blum, J. J., Cabantchik, Z. I., & Vieira, L. (1999). Kinetics of release of amino acids by *Leishmania major*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, *103*, 101-104.
- Bosl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K. *et al.* (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CLC-2 Cl⁻ channel disruption. *EMBO J*, *20*, 1289-1299.
- Boucher, N., McNicoll, F., Dumas, C., & Papadopoulou, B. (2002). RNA polymerase I-mediated transcription of a reporter gene integrated into different loci of *Leishmania*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, *119*, 153-158.
- Boulin, T., Gielen, M., Richmond, J. E., Williams, D. C., Paoletti, P., & Bessereau, J. L. (2008). Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *105*, 18590-18595.
- Braun, N. A., Morgan, B., Dick, T. P., & Schwappach, B. (2010). The yeast CLC protein counteracts vesicular acidification during iron starvation. *J.Cell Sci.*, *123*, 2342-2350.
- Camacho, M. & Lozano, Y. (2016) ¿Están los CLC de *Leishmania* asociados con la adaptación del parásito a cambios de pH y/o de osmolaridad? *Acta Biológica Colombiana*, *21*(1)Supl:S265-277. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1sup.50591>
- Carreño, M. E. (2014). *El CLC Lb_1260 de Leishmania braziliensis disminuye su expresión génica en la progresión del ciclo de vida de promastigotes a amastigotes*. Universidad Nacional de Colombia_Presentación_Poster.
- Carreño, M. (2015). *Cuantificación de la expresión del canal de cloruro Lbrm01_v2.0120 y de los canales CLC putativos Lbrm32_v2.3670, Lbrm33_v2.1260 y Lbrm04_v2.1010 en promastigotes y amastigotes de L. braziliensis*. Universidad Nacional de Colombia_Tesis_Maestría_Química.
- Chen, T. Y. (2005). Structure and function of clc channels. *Annu.Rev.Physiol*, *67*, 809-839.

Darlyuk, I., Goldman, A., Roberts, S. C., Ullman, B., Rentsch, D., & Zilberstein, D. (2009). Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J.Biol.Chem.*, *284*, 19800-19807.

Davis-Kaplan, S. R., Askwith, C. C., Bengtzen, A. C., Radisky, D., & Kaplan, J. (1998). Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *95*, 13641-13645.

De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomine, S., Gambale, F. *et al.* (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, *442*, 939-942.

Difranco, M., Villarroel, A., Ponte-Sucre, A., Quinonez, M., Drujan, D., & Dagger, F. (1995). Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *Leishmania mexicana* into planar bilayers. *Acta Cient.Venez.*, *46*, 206-207.

Docampo, R., de, S. W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat.Rev.Microbiol.*, *3*, 251-261.

Duan, D., Zhong, J., Hermoso, M., Satterwhite, C. M., Rossow, C. F., Hatton, W. J. *et al.* (2001). Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus* oocytes by anti-CIC-3 antibody. *J.Physiol*, *531*, 437-444.

Dutzler, R. (2006). The CIC family of chloride channels and transporters. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, *16*, 439-446.

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, *415*, 287-294.

Echeverri, A. M. (2014). *Generación de mutantes puntuales en el canal LbCLCA que permitan establecer características funcionales del canal mediante estudios electrofisiológicos*. Universidad Nacional de Colombia_Tesis_Maestría_Química.

Fahlke, C. (2001). Ion permeation and selectivity in CIC-type chloride channels. *Am.J Physiol Renal Physiol*, *280*, F748-F757.

Feng, L., Campbell, E., & Mackinnon, R. (2012). Molecular mechanism of proton transport in CLC Cl⁻/H⁺ exchange transporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *109*, 11699-11704.

- Feng, L., Campbell, E. B., Hsiung, Y., & MacKinnon, R. (2010). Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science*, 330, 635-641.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Flick, K., Ahuja, S., Chene, A., Bejarano, M. T., & Chen, Q. (2004). Optimized expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains in *Escherichia coli*. *Malar.J*, 3, 50.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T., & Jentsch, T. J. (1999). Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem*, 274, 896-902.
- Garzón, C., Stühmer, W., & Camacho, M. (2009). Corrientes aniónicas de *Leishmania* expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* luego de la inyección de mRNA. *Biomédica*, 29, 177-178.
- Gaxiola, R. A., Yuan, D. S., Klausner, R. D., & Fink, G. R. (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 4046-4050.
- Glaser, T. A., Utz, G. L., & Mukkada, A. J. (1992). The plasma membrane electrical gradient (membrane potential) in *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 51, 9-15.
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M. *et al.* (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J.Biol.Chem.*, 279, 31010-31017.
- Greene, J. R., Brown, N. H., DiDomenico, B. J., Kaplan, J., & Eide, D. J. (1993). The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol.Gen.Genet.*, 241, 542-553.
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.*, 89, 193-277.
- Huang, M. E., Chuat, J. C., & Galibert, F. (1994). A voltage-gated chloride channel in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol.Biol*, 242, 595-598.
- Inbar, E., Canepa, G. E., Carrillo, C., Glaser, F., Suter, G. M., Rentsch, D. *et al.* (2012). Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino.Acids*, 42, 347-360.

- Inbar, E., Schlisselberg, D., Suter, G. M., Rentsch, D., & Zilberstein, D. (2013). A versatile proline-alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *Biochem.J.*, 555-566.
- Instituto Nacional de Salud, I. (2010). Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis. *Guía de vigilancia entomológica y control de leishmaniasis*.
- Jentsch, T. J. (2007). Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J.Physiol*, 578, 633-640.
- Jentsch, T. J. (2008). CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.*, 43, 3-36.
- Jentsch, T. J. (2015). Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology. *J Physiol*, *Accepted article*.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.*, 82, 503-568.
- Kaye, P. & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat.Rev.Microbiol.*, 9, 604-615.
- Kida, Y., Uchida, S., Miyazaki, H., Sasaki, S., & Marumo, F. (2001). Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Histochem.Cell Biol*, 115, 189-194.
- Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M. *et al.* (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, 257, 797-800.
- Kowdley, G. C., Ackerman, S. J., John, J. E., III, Jones, L. R., & Moorman, J. R. (1994). Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J Gen.Physiol*, 103, 217-230.
- Laban, A., Tobin, J. F., Curotto de Lafaille, M. A., & Wirth, D. F. (1990). Stable expression of the bacterial *neor* gene in *Leishmania enriettii*. *Nature*, 343, 572-574.
- Lagos, M. L., Moran, O., & Camacho, M. (2007). *Leishmania amazonensis*: Anionic currents expressed in oocytes upon microinjection of mRNA from the parasite. *Exp.Parasitol.*, 116, 163-170.
- Lamb, F. S., Moreland, J. G., & Miller, F. J., Jr. (2009). Electrophysiology of reactive oxygen production in signaling endosomes. *Antioxid.Redox.Signal.*, 11, 1335-1347.

- Lefurgey, A., Gannon, M., Blum, J., & Ingram, P. (2005). Leishmania donovani amastigotes mobilize organic and inorganic osmolytes during regulatory volume decrease. *J Eukaryot.Microbiol.*, *52*, 277-289.
- Leisle, L., Ludwig, C. F., Wagner, F. A., Jentsch, T. J., & Stauber, T. (2011). CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl(-)/1H(+)-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J.*, *30*, 2140-2152.
- Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H., & Ke, N. J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *260*, 712-717.
- Lopez-Rodriguez, A., Trejo, A. C., Coyne, L., Halliwell, R. F., Miledi, R., & Martinez-Torres, A. (2007). The product of the gene GEF1 of Saccharomyces cerevisiae transports Cl- across the plasma membrane. *FEMS Yeast Res.*, *7*, 1218-1229.
- Lorinczi, E., Napp, J., Contreras-Jurado, C., Pardo, L. A., & Stuhmer, W. (2009). The voltage dependence of hEag currents is not determined solely by membrane-spanning domains. *Eur.Biophys.J*, *38*, 279-284.
- Lozano Jiménez, Y. (2012). *Estudio de un canal de cloruro de Leishmania y su importancia en la fisiología del parásito*. Ph.D Universidad Nacional de Colombia_Tesis_Doctorado_Ciencias_Farmacéuticas.
- Lye, L. F., Owens, K., Shi, H., Murta, S. M., Vieira, A. C., Turco, S. J. *et al.* (2010). Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog.*, *6*, e1001161.
- Maduke, M., Pheasant, D. J., & Miller, C. (1999). High-level expression, functional reconstitution, and quaternary structure of a prokaryotic CIC-type chloride channel. *J Gen.Physiol*, *114*, 713-722.
- Mak, G. W., Wong, C. H., & Tsui, S. K. (2007). Green fluorescent protein induces the secretion of inflammatory cytokine interleukin-6 in muscle cells. *Anal.Biochem.*, *362*, 296-298.
- Marchesini, N. & Docampo, R. (2002). A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in Leishmania mexicana amazonensis. *Mol.Biochem.Parasitol.*, *119*, 225-236.
- Matsuda, J. J., Filali, M. S., Volk, K. A., Collins, M. M., Moreland, J. G., & Lamb, F. S. (2008). Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, *294*, C251-C262.
- Mazareb, S., Fu, Z. Y., & Zilberstein, D. (1999). Developmental regulation of proline transport in Leishmania donovani. *Exp.Parasitol.*, *91*, 341-348.

McConville, M. J., de, S. D., Saunders, E., Likic, V. A., & Naderer, T. (2007). Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. *Trends Parasitol.*, 23, 368-375.

Mehlin, C., Boni, E., Buckner, F. S., Engel, L., Feist, T., Gelb, M. H. *et al.* (2006). Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 148, 144-160.

Miller, C. (2006). CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature*, 440, 484-489.

Neagoe, I., Stauber, T., Fidzinski, P., Bergsdorf, E. Y., & Jentsch, T. J. (2010). The late endosomal CIC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J Biol Chem*, 285, 21689-21697.

Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G., & Jentsch, T. J. (2010). Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science*, 328, 1398-1401.

Oddon, D. M., Diatloff, E., & Roberts, S. K. (2007). A CLC chloride channel plays an essential role in copper homeostasis in *Aspergillus nidulans* at increased extracellular copper concentrations. *Biochim.Biophys.Acta*, 1768, 2466-2477.

Parada, O. J. (2014). *Comportamiento electrofisiológico en un sistema heterólogo de la proteína putativa codificada por el gen LbrM.33.1260 de Leishmania mediante la técnica de patch clamp*. Universidad Nacional de Colombia_Tesis_Maestría_Química.

Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A. *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat.Genet.*, 39, 839-847.

Pearson, R., Jeronimo, S., & de Sousa, A. (2001). Leishmaniasis. In S.Gillespie & R. Pearson (Eds.), *Principles and practice of Clinical Parasitology* (pp. 299-326). Wiley.

Peinado, G. (2013). *Estudio electrofisiológico de selectividad aniónica y voltaje dependencia en el canal iónico LbCLC-A en Leishmania braziliensis*. Departamento de Biología, Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia_Tesis_Pregrado_Biología.

Peixoto, L., Fernandez, V., & Musto, H. (2004). The effect of expression levels on codon usage in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 128, 245-251.

Piccolo, A., Malvezzi, M., & Accardi, A. (2010). Proton block of the CLC-5 Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen.Physiol*, 135, 653-659.

- Piccolo, A. & Pusch, M. (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature*, 436, 420-423.
- Poet, M., Kornak, U., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Scheel, O., Hoelter, S. *et al.* (2006). Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103, 13854-13859.
- Ponte-Sucre, A., Campos, Y., Fernandez, M., Moll, H., & Mendoza-Leon, A. (1998). Leishmania sp.: growth and survival are impaired by ion channel blockers. *Exp.Parasitol.*, 88, 11-19.
- Quintero, N. (2014). *Estudio funcional de un canal de cloruro de Leishmania, caracterización electrofisiológica y molecular*. Tesis de Maestría. Programa de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- Ramirez, C. A., Requena, J. M., & Puerta, C. J. (2013). Alpha tubulin genes from Leishmania braziliensis: genomic organization, gene structure and insights on their expression. *BMC.Genomics*, 14, 454.
- Salas-Casas, A., Ponce-Balderas, A., Garcia-Perez, R. M., Cortes-Reynosa, P., Gamba, G., Orozco, E. *et al.* (2006). Identification and functional characterization of EhCIC-A, an Entamoeba histolytica CIC chloride channel located at plasma membrane. *Mol.Microbiol.*, 59, 1249-1261.
- Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S., & Jentsch, T. J. (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature*, 436, 424-427.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K., & Jentsch, T. J. (1998). Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem*, 273, 15110-15118.
- Singh, B. & Sundar, S. (2012). Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, 30, 3834-3842.
- Stauber, T. & Jentsch, T. J. (2010). Sorting motifs of the endosomal/lysosomal CLC chloride transporters. *J Biol Chem*, 285, 34537-34548.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A., & Jentsch, T. J. (1995). Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem*, 270, 31172-31177.
- Stockbridge, R., Lim, H., Otten, R., Williams, C., Shane, T., Weinberg, Z. *et al.* (2012). Fluoride resistance and transport by riboswitch-controlled CLC antiporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 109, 15289-15294.

- Stuhmer, W. (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.*, 207, 319-339.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G., & Varshavsky, A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science*, 254, 1374-1377.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu.Rev.Biochem.*, 67, 509-544.
- Ullu, E., Tschudi, C., & Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.*, 6, 509-519.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 12142-12149.
- Vieira, L., Lavan, A., Dagger, F., & Cabantchik, Z. I. (1994). The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *J.Biol.Chem.*, 269, 16254-16259.
- Vieira, L., Slotki, I., & Cabantchik, Z. I. (1995). Chloride conductive pathways which support electrogenic H⁺ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J.Biol.Chem.*, 270, 5299-5304.
- Vieira, L. L. & Cabantchik, Z. I. (1995). Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H⁽⁺⁾-pump generated membrane potential. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 75, 15-23.
- Vieira, L. L., Lafuente, E., Gamarro, F., & Cabantchik, Z. (1996). An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem.J.*, 319 (Pt 3), 691-697.
- Viviescas, M. A. (2014). *Estudio fisiológico de un transportador aniónico de Leishmania mediante complementación de una línea knock out de Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional de Colombia_Tesis_Maestria_Biología.
- White, M. M. & Miller, C. (1979). A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J.Biol.Chem.*, 254, 10161-10166.
- Yang, J. & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.*, 43, W174-W181.
- Zdebik, A. A., Zifarelli, G., Jentsch, T. J., & Pusch, M. (2008). Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J Biol Chem*, 283, 4219-4227.
- Zhang, F., Hackett, N. R., Lam, G., Cheng, J., Pergolizzi, R., Luo, L. *et al.* (2003). Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood*, 102, 2115-2121.

Zhang H, Wang C, Yue H, Hu WW, Gu JM, He JW, *et al.* (2014). Identification of a novel mutation in the CLCN5 gene in a Chinese family with Dent-1 disease. *Nephrology (Carlton)*. Feb;19(2):80-3. doi: 10.1111/nep.12179.

Zilberstein, D. (1993). Transport of nutrients and ions across membranes of trypanosomatid parasites. *Adv.Parasitol.*, 32, 261-291.

Zilberstein, D. & Dwyer, D. M. (1985). Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 82, 1716-1720.

Zilberstein, D. & Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu.Rev.Microbiol.*, 48, 449-470.