

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Clonaje y caracterización de la ADN polimerasa θ de *Leishmania infantum*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Abel Fernández Orgiler

Madrid, 2014

Clonaje y caracterización de la ADN polimerasa θ de
Leishmania infantum

Tesis doctoral
Abel Fernández Orgiler
Madrid 2013

Abreviaturas.....	I
--------------------------	----------

Summary.....	IV
---------------------	-----------

Introducción.....	1
--------------------------	----------

1. Leishmaniasis.....	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	2
1.3 Biología molecular y bioquímica de <i>Leishmania</i>	3
1.4 Ciclo biológico.....	6
1.5 Epidemiología.....	8
1.6 Manifestaciones clínicas.....	9
1.7 Respuesta inmune en la infección por especies del género <i>Leishmania</i>	11
1.8 Mecanismos de evasión frente a la respuesta inmune del hospedador mamífero.....	13
1.9 Control de la enfermedad.....	15
1.9.1 Actuaciones sobre el reservorio y el vector.....	15
1.9.2 Vacunas.....	15
1.9.3 Tratamiento.....	16
2. Mantenimiento y reparación de la información génica.....	18
2.1 El genoma de <i>Leishmania</i> spp.....	18
2.2 ADN polimerasas.....	19
2.2.1 ADN polimerasas en tripanosomátidos.....	22
2.3 Lesiones en el ADN.....	24
2.4 Mecanismos de reparación del ADN.....	25
2.5 Mecanismo de tolerancia al daño: síntesis a través de lesión (TLS).....	31
2.6 Reparación de lesiones complejas: acción coordinada de mecanismos de reparación y TLS.....	33
2.7 Mecanismo de reparación del ADN y tolerancia al daño en tripanosomátidos.....	33
2.8 ADN polimerasa theta.....	35

Objetivos.....	38
-----------------------	-----------

Materiales y métodos.....	40
----------------------------------	-----------

1. Cultivo de células.....	41
1.1 Parásitos.....	41
1.2 Bacterias.....	41
1.3 Levaduras.....	41
1.4 Línea macrofágica de ratón.....	42
2. Generación y transformación de bacterias competentes.....	42
2.1 Generación y transformación de bacterias electrocompetentes.....	42
2.2 Generación y transformación de bacterias quimiocompetentes.....	42

3. Clonaje del gen de la ADN polimerasa θ de <i>L. infantum</i>	43
3.1 Purificación de ácidos nucleicos de <i>Leishmania</i>	43
3.2. Amplificación y clonaje del gen de la ADN polimerasa θ de <i>L. infantum</i>	44
3.2.1 Clonaje del gen <i>L</i> θ Pol en el vector pRSET C.....	44
3.2.2 Clonaje del gen <i>L</i> θ Pol en el vector pPIC9.....	44
3.2.3 Clonaje del gen completo <i>L</i> θ Pol y tres formas truncadas en el vector pMAL-c2.....	45
3.2.4 Clonaje del gen <i>L</i> θ Pol en el vector pTEX.....	45
3.3 Generación de un mutante nulo del fragmento 358 de <i>L</i> θ Pol (Mutagénesis dirigida).....	46
4. Expresión y purificación de <i>L</i> θ Pol.....	47
4.1. Expresión y purificación de <i>L</i> θ Pol en <i>E. coli</i>	47
4.1.1 Expresión y purificación de 6xHis- <i>L</i> θ Pol.....	47
4.1.2 Expresión y purificación de MBP- <i>L</i> θ Pol y formas truncadas.....	47
4.2 Expresión de 6xHis- <i>L</i> θ Pol en sistema libre de células.....	48
4.3 Expresión de <i>L</i> θ Pol-10x en <i>Pichia pastoris</i>	48
4.3.1 Generación de colonias con fenotipo Mut ⁺ y Mut ^s	48
4.3.2 Comprobación de los transformantes Mut ⁺ y Mut ^s obtenidos.....	49
4.3.3 Expresión de <i>L</i> θ Pol en colonias Mut ⁺ y Mut ^s	49
5. Purificación de proteínas desde geles de poliacrilamida (Electroelución).....	50
6. Obtención de un anticuerpo policlonal anti- <i>L</i> θ Pol.....	51
7. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (<i>Western blot</i>).....	51
8. Determinación de los niveles de expresión y localización subcelular de la proteína <i>L</i> θ Pol.....	52
8.1 Aislamiento de células.....	52
8.1.1 Generación de <i>amastigotes-like</i>	52
8.1.2 Obtención de promastigotes procíclicos y metacíclicos.....	52
8.1.2.1 Purificación de lectina de cacahuete (PNA).....	52
8.1.2.2 Aislamiento de promastigotes procíclicos (PNA ⁺) y metacíclicos (PNA ⁻) de <i>L. infantum</i>	53
8.2 Preparación de extractos proteicos totales de <i>Leishmania</i>	54
8.3 Detección de los niveles de expresión de <i>L</i> θ Pol en <i>Leishmania</i>	54
8.4 Localización subcelular de <i>L</i> θ Pol mediante inmunofluorescencia indirecta.....	55
9. Ensayos <i>in vitro</i> de actividad ADN polimerasa.....	55
9.1 Marcaje de cebadores.....	55
9.2 Hibridación de cebadores y oligonucleótidos molde.....	56
9.3 Análisis de los ensayos de actividad ADN polimerasa.....	56
9.4 Actividad polimerasa de <i>L</i> θ Pol expresada en sistema libre de células.....	56
9.5 Estudio de la actividad polimerasa de los fragmentos 358, 640, 970 y la proteína completa <i>L</i> θ Pol.....	56
9.6 Estudio de la actividad polimerasa de MBP- <i>L</i> θ Pol en presencia de Mg ²⁺ y Mn ²⁺	57
9.7 Estudio de la actividad polimerasa de MBP- <i>L</i> θ Pol a diferentes valores de pH y temperatura.....	57
9.8 Ensayo de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal).....	58

9.9 Estudio de la discriminación por parte de MBP- <i>LiPol</i> θ del grupo 3' OH del nucleótido entrante.....	58
9.10 Estudio de la fidelidad de MBP- <i>LiPol</i> θ en presencia de Mg ²⁺ y Mn ²⁺	58
9.11 Ensayo de actividad deoxirribosafosfato liasa (dRP-liasa).....	59
9.12 Ensayo de actividad polimerasa en moléculas tipo <i>gap</i> de 1 y 5 nucleótidos.....	60
9.13 Ensayo de extensión de extremos desapareados.....	60
9.14 Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión 8oxodG.....	61
9.14.1. Síntesis frente a 8oxodG.....	61
9.14.2 Extensión de un par 8oxodG.....	61
9.14.3 Inserción de 8oxodGTP.....	61
9.14.4 Inserción de ribonucleótidos frente a 8oxodG.....	62
9.15. Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión timina glicol.....	62
9.15.1 Síntesis frente a timina glicol.....	62
9.15.2 Extensión de un par timina glicol.....	63
9.16 Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión O6-metildesoxiguanina (6mdG).....	63
9.17 Ensayos de actividad ADN polimerasa en sitios abásicos.....	63
9.18 Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión CPD.....	64
9.18.1 Síntesis a través de lesión e inserción frente a T3' de un CPD.....	64
9.18.2 Síntesis frente a T5' de un CPD.....	64
9.18.3 Extensión de un daño CPD.....	65
10. Ensayos <i>in vivo</i> de resistencia frente a agentes genotóxicos.	65
10.1 Generación de transfectantes estables de <i>L. infantum</i> y <i>L. major</i> que sobre-expresan el gen <i>LiPol</i> θ	65
10.2 Determinación del nivel de expresión de <i>LiPol</i> θ en promastigotes de <i>Leishmania</i> silvestres y transfectados.....	66
10.3 Ensayos de proliferación celular de promastigotes de <i>L. major</i> silvestres y transfectados en presencia de diferentes agentes genotóxicos.....	67
11. Infección de macrófagos RAW con promastigotes de <i>L. major</i> silvestres y transfectados.....	68
12. Análisis informático.....	69

Resultados.....70

1. Análisis de los niveles de expresión y localización subcelular de la ADN polimerasa <i>LiPol</i> θ	71
1.1 Comparación de la secuencia aminoacídica de la ADN polimerasa theta de tripanosomátidos.....	71
1.2 Clonaje y expresión del gen <i>LiPol</i> θ	76
1.3 Purificación de la proteína recombinante 6xHis- <i>LiPol</i> θ y obtención de un anticuerpo policlonal anti- <i>LiPol</i> θ	77
1.4 Análisis de los niveles de expresión de <i>LiPol</i> θ a lo largo del ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	79
1.5 Localización subcelular de <i>LiPol</i> θ	82

2. Características generales de la actividad <i>in vitro</i> de <i>L</i> Polθ.....	85
2.1 Determinación de la actividad ADN polimerasa intrínseca de <i>L</i> Polθ.....	85
2.1.1 Expresión de <i>L</i> Polθ en sistema libre de células.....	85
2.1.2 Actividad ADN polimerasa de 6xHis- <i>L</i> Polθ expresada en sistema libre de células.....	85
2.2 Expresión de <i>L</i> Polθ en condiciones nativas.....	87
2.2.1 Expresión de <i>L</i> Polθ en <i>Pichia pastoris</i>	87
2.2.1.1 Obtención de transformantes Mut ⁺ y Mut ^s	88
2.2.1.2 Expresión de <i>L</i> Polθ-10xHis.....	89
2.2.2 Expresión de la proteína MBP- <i>L</i> Polθ y sus formas truncadas MBP-970, MBP-640 y MBP-358 en <i>E. coli</i>	90
2.2.2.1 Purificación y evaluación de la actividad polimerasa de la proteína MBP- <i>L</i> Polθ y sus formas truncadas.....	91
2.3 Caracterización bioquímica de MBP- <i>L</i> Polθ.....	94
2.3.1 Actividad de MBP- <i>L</i> Polθ en presencia de Mg ²⁺ y Mn ²⁺	94
2.3.2 Actividad de <i>L</i> Polθ a diferentes valores de pH y temperatura.....	96
2.3.3 Actividad desoxinucleotidil transferasa terminal.....	97
2.3.4 Discriminación del grupo 3' OH del nucleótido entrante.....	98
2.3.5 Fidelidad de síntesis de <i>L</i> Polθ en presencia de Mg ²⁺ y Mn ²⁺	98
2.3.6 Actividad dRP-liasa.....	100
2.3.7 Actividad polimerasa en moléculas tipo gap de 1 y 5 nucleótidos.....	102
2.3.8 Extensión de extremos desapareados.....	104
3. Análisis de la actividad <i>in-vitro</i> de <i>L</i> Polθ: Síntesis a través de lesiones.....	107
3.1. Lesión 8oxodG.....	107
3.1.1. Actividad ADN polimerasa de <i>L</i> Polθ en lesión 8oxodG.....	107
3.1.2. Síntesis frente a 8oxodG.....	108
3.1.3. Extensión de un par 8oxodG.....	110
3.1.4. Inserción de 8oxodGTP.....	112
3.1.5. Inserción de ribonucleótidos frente a 8oxodG.....	112
3.2 Lesión timina glicol (Tg).....	113
3.2.1 Actividad ADN polimerasa de <i>L</i> Polθ en lesión Tg.....	114
3.2.2 Síntesis frente a Tg.....	115
3.2.3 Extensión de un par Tg.....	116
3.3 Lesión O ⁶ -metildesoxiguanina (6mdG).....	117
3.3.1 Actividad ADN polimerasa de <i>L</i> Polθ en lesión 6mdG.....	117
3.3.2 Síntesis frente a 6mdG.....	118
3.4 Sitios abásicos.....	119
3.4.1 Actividad ADN polimerasa de <i>L</i> Polθ en sitios abásicos.....	120
3.4.2 Síntesis frente a un sitio abásico.....	122
3.5 Dímeros de timina (CDP).....	124
3.5.1 Actividad ADN polimerasa de <i>L</i> Polθ en CPD.....	125
3.5.2 Síntesis frente a CPD.....	126
3.5.3 Extensión de un daño CPD.....	128

3.6 Actividad de <i>L</i> Pol θ en TLS.....	129
4. Análisis de la actividad <i>in-vivo</i> de <i>L</i> Pol θ	130
4.1. Implicación de <i>L</i> Pol θ en la tolerancia frente a agentes genotóxicos.....	130
4.1.1 Obtención de una línea de transfectantes estables de <i>Leishmania</i> con capacidad de sobre-expresión de la proteína <i>L</i> Pol θ	130
4.1.2 Estudio del patrón de crecimiento de los transfectantes estables de <i>L. major</i>	131
4.1.3 Participación de <i>L</i> Pol θ en la resistencia al daño oxidativo.....	132
4.1.4 Participación de <i>L</i> Pol θ en la resistencia a uniones intercatenarias.....	133
4.1.5 Participación de <i>L</i> Pol θ en la resistencia a radiación UV.....	135
4.1.6 Participación de <i>L</i> Pol θ en la resistencia al daño alquilante.....	136
4.2. Participación de <i>L</i> Pol θ en el proceso de infección.....	138
Discusión.....	140
1. Relación estructural entre las ADN polimerasa θ de diferentes organismos.....	141
2. Niveles de expresión endógena y localización subcelular de <i>L</i> Pol θ	145
3. Caracterización bioquímica de <i>L</i> Pol θ	146
4. <i>L</i> Pol θ y los mecanismos de tolerancia al daño.....	148
4.1 Daño oxidativo.....	148
4.2 Daño alquilante.....	149
4.3 Rotura del enlace glicosídico (Sitios abásicos).....	150
4.4 Daño por radiación ultravioleta.....	151
4.5 Uniones intercatenarias.....	151
5. Actividad de <i>L</i> Pol θ durante la infección de <i>Leishmania</i>	152
Conclusiones.....	155
Bibliografía.....	158

Abreviaturas

aa: aminoácido.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNk: ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto.

AP:apurínico/apirimidínico.

ARN: ácido ribonucleico.

ATP: adenosina 5' trifosfato.

BCA: ácido bicinconínico.

BER: reparación por escisión de base.

BRCT: dominio BRCA1 C-terminal.

BSA: albúmina de suero bovino.

C-terminal: carboxilo terminal.

CAM: complejo de ataque a la membrana.

CTP: citosina 5' trifosfato.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato.

dAMP: 2' desoxiadenosina 5' monofosfato.

dATP: 2' desoxiadenosina 5' trifosfato.

dCMP: 2' desoxicitidina 5' monofosfato.

dCTP: 2' desoxicitidina 5' trifosfato.

ddGTP: 2'-3' didesoxiguanosina 5' trifosfato.

ddNTPs: 2'-3' didesoxinucleótidos.

dGMP: 2' desoxiguanosina 5' monofosfato.

dGTP: 2' desoxiguanosina 5' trifosfato.

DmPolθ: ADN polimerasa θ de *Drosophila melanogaster*.

dNTPs: desoxinucleótidos.

DO₆₀₀: densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.

dRP: desoxirribosa-fosfato.

DSB: rotura de doble hebra.

dTMP: 2' desoxitimidina 5' monofosfato.

dTTP: 2' desoxitimidina 5' trifosfato.

EMS: etil metanosulfonato.

ENU: etil nitrosourea.

GSH: glutatión.

hPol μ : ADN polimerasa μ humana.

hPol λ : ADN polimerasa λ humana.

hPol θ : ADN polimerasa θ humana.

HR: recombinación homóloga.

ICL: unión intercatenaria.

IDA: ácido iminodiacético.

IFN- γ : Interferón gamma.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido.

kDa: kilodalton.

LiPol θ : ADN polimerasa θ de *L. infantum*.

LB: Luria Bertani.

LP-BER: reparación por escisión de base de trecho largo.

LPG: lipofosfoglicano.

LPS: lipopolisacárido.

MBP: proteína de unión a maltosa.

6mdG: O6-metildesoxiguanina.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

min: minuto.

MMC: mitomicina C.

MMR: reparación de desapareamientos.

MMS: metil metanosulfonato.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

NER: reparación por escisión de nucleótido.

NHEJ: unión de extremos no homólogos.

nt: nucleótido.

N-terminal: amino terminal.

NO: óxido nítrico.

OMS: organización mundial de la salud.

8oxodG: 8 oxo-desoxiguanina.

8oxodGTP: 8 oxo-desoxiguanosina 5' trifosfato

pdb: pares de bases.

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PNA: aglutinina de cacahuete.

PNK: polinucleótido quinasa.

RFC: factor de replicación C.

RPA: proteína de replicación A.

rNTPs: ribonucleótidos.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

SHM: hipermutación somática.

SN-BER: reparación por escisión de base de trecho corto.

TLS: síntesis a través de lesiones.

TNF: factor de necrosis tumoral.

T(SH₂): tripanotión.

UDG: uracil ADN glicosilasa.

Glosario de términos no castellanos

Downstream: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de ADN que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 5' de un *gap*.

Gap: hueco de longitud variable en el ADN, que supone una región de cadena sencilla embebida en un ADN de doble cadena.

Nick: rotura de un enlace fosfodiéster de una de las cadenas de la doble hélice de ADN.

Summary

Leishmaniasis is a wide spectrum of vector borne diseases with great epidemiological and clinical diversity. It is caused by more than 20 species of the protozoan parasite that belongs to the genus *Leishmania* (Singh, Kumar et al. 2012).

Leishmaniasis affects 88 countries: 72 are developing countries and 13 of them are among the least developed. It is estimated that annual incidence is 1-1,5 million cases of cutaneous leishmaniasis and 0,5 million cases of visceral leishmaniasis. Overall, prevalence is 12 million people and the population at risk is 350 million. Nevertheless, there is probably an even greater difference between the number of cases actually occurring and the number of reported ones because leishmaniasis is not always a notifiable disease (only in 33 of the 88 countries endemic) (Desjeux 2004).

The form and severity of the disease greatly depends on the infecting *Leishmania* species and the immune status of the host. Leishmaniasis has traditionally been classified into three major clinical forms: visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, which differ in immunopathologies and degree of morbidity and mortality. Cutaneous leishmaniasis, a clinical form consisting of cutaneous ulcers usually localized to the initial site of the sand fly bite, will heal spontaneously in uncomplicated cases within 2 months to a year. In the case of mucocutaneous leishmaniasis, the primary lesion occurs at the initial site of the bite on the skin but the infection also involves the mucosal system of the nasal and buccal cavity, causing degeneration of the cartilaginous and soft tissues. These ulcerations are often quite disfiguring to the lips, nose, hard and soft palates and vocal cords. Death is often due to secondary bacterial infections or malnutrition. Finally, in the case of visceral leishmaniasis, parasites reside within the reticuloendothelial cells of the viscera, including the spleen, lymph nodes, liver and intestine and is usually fatal when untreated (Cunningham 2002).

Leishmania spp. are heteroxenous, digenetic protozoan parasites and as such they live successively in two hosts, the insect vector (the female sandfly of the genus *Lutzomyia* in the New World and of the genus *Phlebotomus* in the Old World) and a vertebrate playing the role of reservoir. In female sand flies, *Leishmania* spp. exist extracellularly in the lumen of the digestive tract where they adopt a flagellated, elongated promastigote form and undergo several differentiation stages. *Leishmania* spp. are obligate intracellular parasites in the vertebrate host. Indeed, after the bite of an infected sand fly, at least some of the promastigotes injected are rapidly engulfed by

resident dermal phagocytic cells or cells rapidly recruited from the epidermis or the blood. During the early stages of infection, a large part of the cells internalizing parasites appears to be macrophages, inside which promastigotes differentiate into amastigotes devoid of the external flagellum. This process takes several days and occurs within organelles named parasitophorous vacuoles. The life cycle is completed when a sand fly takes a blood meal on a parasitized vertebrate. During this process, the vector can be infected by free amastigotes or by infected cells. In the gut of the insect, the amastigotes differentiate rapidly into promastigotes being the cycle closed (Antoine, Prina et al. 2004). To survive successfully and multiply within these two hosts, the parasites must confront and overcome different challenges as the hostile digestive conditions found within the sand fly vector or the oxidative burst of the vertebrate host macrophages (Cunningham 2002).

In the last years, the genomes of three *Leishmania* species (*L. major*, *L. infantum* and *L. braziliensis*) have been sequenced. However it has been possible to assign putative biological function only to 35% of the protein-coding genes based on experimental characterization (3,7%) or sequence similarity to proteins with known function in other organisms (31,5%) (Myler and Fasel 2008).

One of these genes whose function has been inferred from data obtained in other organisms is the gene Linj24.0910 (www.genedb.org) which encodes DNA polymerase theta (Pol θ), a nuclear A-family DNA polymerase (Pang, McConnell et al. 2005). In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, first organism where it was described, Pol θ (*DmPol* θ) is characterized by an N-terminal helicase-like domain, a C-terminal DNA polymerase domain, and a large central domain that spans between the two and its function has been related to resistance to DNA interstrand crosslinking agents (Boyd, Sakaguchi et al. 1990; Harris, Mazina et al. 1996). Genes encoding proteins with similarity to Pol θ are present in plants, protists, and multicellular eukaryotes, but not in yeast or other fungi. However it remains to be determined whether these proteins are true orthologs, as it appears that there are structural and functional differences between species. The main structural differences observed are: the presence or absence of the helicase domain at the N-terminus (absent in some lower eukaryotes), the length of the central region (between 800 and 1600 amino acids depending on species) and the presence or length of three insert regions within the polymerase domain (the inserts are much shorter in the non-vertebrate family members). Similarly, at the functional level, depending on the organism tested, different activities have been attributed to Pol θ

such as repair of interstrand crosslinks, translesion synthesis, base excision repair or double strand breaks repair (Yousefzadeh and Wood 2013).

The DNA polymerase θ of *Leishmania infantum* (*LiPol* θ) is a protein of 1171 amino acids in length and a molecular weight of 125 kDa. *LiPol* θ lacks helicase domain and the N-terminal part of the protein has not similarity with any other protein different to DNA polymerases theta of trypanosomatids. The C-terminal part of the protein is a DNA polymerase domain where all six conserved motifs of A-family polymerases are present in the primary protein sequence. Among some of these conserved motifs there are also the three characteristic inserts of the DNA polymerases θ . However, the length of these inserts differ from that of higher eukaryotes. Furthermore *LiPol* θ has two additional inserts exclusively shared with DNA polymerases θ of trypanosomatids.

In order to determine the role played by *LiPol* θ in *Leishmania infantum* parasite, three specific objectives were developed:

- Determination of the subcellular localization of *LiPol* θ and its expression levels along the parasite cycle.
- Biochemical characterization of *LiPol* θ and study of its potential role in translesion synthesis.
- Determination of the physiological role of *LiPol* θ .

To achieve the earliest goal, firstly we obtained a polyclonal antibody anti-*LiPol* θ . For this purpose, the LinJ24.0910 gene was cloned into the pRSET-C vector, which allows the expression of the protein of interest fused with a 6 histidine tag at its N-terminal end. *LiPol* θ expressed in non-soluble form in *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain was purified by affinity chromatography and subsequently inoculated in form of 4 doses of 100 μ g each in a New Zealand White rabbit. The specificity of the polyclonal antibody obtained was evaluated by Western blot. The polyclonal antibody did not present any cross reactivity with *E. coli* proteins and in total extracts from *Leishmania infantum* recognized a single band of 125 kDa (molecular weight expected for *LiPol* θ).

Once the specificity of the polyclonal antibody anti-*LiPol* θ was verified, we proceeded to the assessment of the *LiPol* θ expression levels by Western blot in promastigote and amastigote stages of the parasite. The results showed that *LiPol* θ is expressed at both

stages. At the promastigote form, *LiPol* θ expression levels are similar along the growth curve of the parasite and no differences between procyclic and metacyclic promastigotes were observed. At the amastigote stage, *LiPol* θ is expressed at lower levels regarding to the promastigote stage.

Subcellular localization of *LiPol* θ was evaluated by indirect immunofluorescence using polyclonal antibody anti-*LiPol* θ and Alexa 488 labeled secondary antibody. *LiPol* θ has mainly a nuclear localization, although a small fraction of the protein is also found in the mitochondria of the parasite.

Next, the biochemical characterization of the protein was performed. As a preliminary step, we verified that *LiPol* θ has an intrinsic DNA polymerase activity. To do this the protein was expressed by a cell-free system (*TnT*[®] *Quick Coupled Transcription/Translation System*) and subsequently tested in a DNA polymerase activity assay with “open” template/primer molecules.

After verifying that *LiPol* θ has an intrinsic DNA polymerase activity, we proceeded to the production of the protein under native conditions on a large scale for further purification and study of its activity. To do this we used two different strategies. On one hand *LiPol* θ expression fused to a 10 histidine tag at its C-terminus was conducted, in *Pichia pastoris* yeast. However, although the protein could be expressed in soluble form, the levels obtained were too low. On the other hand we performed the expression of *LiPol* θ and three truncated forms of the protein (all corresponding to the polymerase domain) fused to the MBP protein at the N-terminus in *E. coli*. The protein MBP-*LiPol* θ and the truncated forms (MBP-970, MBP-640 and MBP-358) were expressed in native form and purified by affinity chromatography on amylose resin. Of the 4 protein forms only MBP-970 and MBP-*LiPol* θ were active, implying that in addition to the polymerase domain part of the central region is required for activity. This result has also been observed for *hPol* θ where the presence of at least 300 amino acids of the central region of the enzyme appears to be required for its functionality (Prasad, Longley et al. 2009; Hogg, Seki et al. 2011). Of the MBP-*LiPol* θ and MBP-970 forms, the first one was that showing greater activity, so it was selected to perform the biochemical characterization.

LiPol θ is a template-dependent DNA polymerase that incorporates nucleotides with low processivity, so it should be required for the synthesis of short DNA fragments and not for genome replication. Like most of the DNA polymerases, *LiPol* θ preferably inserts the nucleotide complementary to the template base following the rules of Watson-Crick base pairing. *LiPol* θ can carry out the polymerization reaction using both magnesium and manganese cofactors though in the presence of the latter shows an increase in its activity. Under optimum conditions *LiPol* θ is able to incorporate a nucleotide at blunt ends in a similar way to other A-family DNA polymerases, including *hPol* θ (Seki, Masutani et al. 2004).

LiPol θ possesses a high strand displacement activity in the absence of factors which is independent of the group present at the 5' end of a gap or the metal used as cofactor. This ability to insert nucleotides coupled to strand displacement is important in the repair of interstrand cross-links and long patch base excision repair (LP-BER). In this regard it is noteworthy that the absence of *Pol* θ in *D. melanogaster* is associated with hypersensitivity to agents that cause DNA interstrand cross-links (Boyd, Sakaguchi et al. 1990), whereas it is associated with decreased levels of base excision repair, especially of the LP-BER, in chicken DT40 cells (Yoshimura, Kohzaki et al. 2006). Therefore *LiPol* θ may participate in both pathways.

Human DNA polymerase θ (*hPol* θ) has intrinsic 5'-deoxyribose phosphate lyase activity and it was suggested that it could participate in short nucleotide base excision repair (Prasad, Longley et al. 2009). However this activity was not observed in *LiPol* θ . Moreover *LiPol* θ has a high strand displacement activity and consequently it does not seem likely to be involved in that mechanism.

Another feature of *LiPol* θ is its ability to extend mismatched primer termini either directly or via misalignment mechanism. According to the data obtained in different experiments, in the presence of a mismatch, *LiPol* θ at first tries to generate a correct base pair by dislocation of one of the two DNA strands from which performs the extension, thereby causing the appearance of insertions or deletions. In case that the sequence context does not allow the formation of a correct base pair, *LiPol* θ performs direct extension, setting the mutation.

Currently, the only *Pol* θ that has been purified and tested *in vitro* is *hPol* θ , which has been related to translesion synthesis activity (Seki, Marini et al. 2003; Seki, Masutani et al. 2004). To determine if *LiPol* θ could have the same function, DNA polymerase assays

were performed with open template/primer molecules containing modified bases simulating different lesions. The lesions studied were: 8oxodG, Tg, 6mdG, abasic sites and CPD.

The major product of oxidative base damage is 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine (8oxodG) (Batra, Beard et al. 2010). This lesion can be generated by the direct oxidation of deoxyguanosine in DNA or by the incorporation of oxidized dGTP (8oxodGTP) into DNA by DNA polymerases (Katafuchi and Nohmi 2010). 8oxodG is a promutagenic lesion due to its ability to form base pairs with dA in addition to dC (Shibutani, Takeshita et al. 1991). We demonstrated the ability of *LiPol* θ to bypass the oxidative lesion 8oxodG in the template. *LiPol* θ "copied" the lesion, as it preferentially inserted a correct dCTP opposite 8oxodG with either manganese or magnesium as metal cofactor. In the presence of manganese *LiPol* θ activity rose and the protein was also able to elongate the 8oxodG:dCMP pair, thus performing an error-free tolerance of this lesion. *LiPol* θ extends the "correct" 8oxodG:dCMP and the mutagenic 8oxodG:dAMP base pairs with similar efficiency which means that fidelity of the 8oxodG bypass lies primarily at the insertion step. Regarding fidelity at 8oxodGTP incorporation, *LiPol* θ prefers to insert the oxidized nucleotide opposite template dA rather than template dC at a ratio of 34:1. *LiPol* θ incorporates 8oxodGTP opposite dAMP with a 20% efficiency compared to normal dTTP incorporation. This value is more related to a Y-family DNA polymerase involved in translesion synthesis than to an A-family replicative DNA polymerase (Katafuchi and Nohmi 2010).

Oxidative damage can affect pyrimidines also, being thymine glycol one of the major DNA lesions formed (Aller, Rould et al. 2007). *LiPol* θ is able to insert a nucleotide opposite to thymine glycol, but direct extension is not possible beyond the lesion. *LiPol* θ just can extend a thymine glycol base pair via dNTP-stabilized misalignment mechanism, generating single-base deletions.

In vivo experiments with human cells have suggested a combined role of *hPol* κ and *hPol* ζ in translesion synthesis opposite thymine glycol. According to this hypothesis *hPol* κ could act primarily at the insertion step with the subsequent extension step being performed by *hPol* ζ (Yoon, Bhatia et al. 2010). However, Polk is localized to the mitochondria in trypanosomatids (Rajão, Passos-Silva et al. 2009) so it is possible that *LiPol* θ replaces Polk incorporating a nucleotide opposite thymine glycol.

O6-methylguanine, a mutagenic and cytotoxic DNA adduct that can be formed *in vivo* by alkylating agents, was also studied. *LiPolθ* can incorporate a residue opposite the lesion and extend from the incorporated nucleotide. However, in a similar way to other DNA polymerases, *LiPolθ* incorporates dTTP opposite 6mdG more often than dCTP, giving rise to dG to dA transition mutations.

Abasic (apurinic/apyrimidinic) sites are noncoding lesions in DNA that arise by hydrolysis of the glycosidic bond connecting purine or pyrimidine base to deoxyribose sugar. Abasic sites are one of the most common DNA lesions. These noncoding lesions can occur because of specific DNA glycosylases removing altered bases or by labilization of the glycosidic bond resulting from chemical modifications of bases (Randall, Eritja et al. 1987). When an abasic lesion is copied, dATP is predominantly incorporated by DNA polymerases opposite the lesion. Preferential incorporation of dATP opposite abasic lesions is referred to as the “A-rule” (Strauss 2002). *LiPolθ* like *hPolθ* inserts dATP and dGTP primarily opposite an abasic site, independently of the next template base. *LiPolθ* is able to perform direct extension of nucleotide incorporated. However, *LiPolθ* shows much lower efficiency compared to *hPolθ* which has been reported to insert dATP against an abasic site with 22% of the efficiency of a normal template and continuing extension as avidly as with a normally paired base (Seki, Masutani et al. 2004).

It has been suggested that inserts 2 and 3 may be relevant for overcoming abasic sites by *hPolθ* (Hogg, Seki et al. 2011). These inserts are present in *LiPolθ*, however the length of the insert 3 is much shorter than in the case of *hPolθ*, which could explain the different behavior between the two DNA polymerases in the synthesis opposite an abasic site.

LiPolθ activity, like that of *hPolθ*, will be error free as long as the abasic site has been generated as a result of an intermediate step in the base excision repair of dUTP incorporated. Conversely, if the abasic site arose from spontaneous hydrolysis, insertion of dATP will be mutagenic.

Finally the cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) lesion was also evaluated. CPD are the most prevalent form of the lesion induced by UV radiation, and if not removed, lead to mutations (Gonzalez-Púmariega, Vernhes et al. 2009). *LiPolθ* shows a low efficiency at

the incorporation step opposite thymines of a CPD in a similar way to other A-family polymerases like *hPolθ* (Seki, Masutani et al. 2004), *hPolv* (Takata, Shimizu et al. 2006) or T7 DNA polymerase (Li, Dutta et al. 2004). This is in contrast with the high efficiency showed by *Polη*, a DNA polymerase specialized in CPD bypass (Kusumoto, Masutani et al. 2002). After incorporation opposite the dimer, the extension step is performed by *LiPolθ* with similar efficiency to that on non-damaged template.

To achieve the third objective (the determination of the physiological role of *LiPolθ*) we generated a cell line of *Leishmania* that overproduced the protein by transfecting the parasites with the plasmid vector pTEX containing the gene encoding *LiPolθ*. Overexpression of *LiPolθ* did not alter the growth curve of the parasite. Transfected parasites overexpressing *LiPolθ* were used to evaluate *in vivo* the impact of this enzyme in damage tolerance through a comparative study of resistance to different genotoxic agents among wild-type and transfected parasites. The resistance of each of the cell lines was evaluated measuring the percentage of viable promastigotes (determined by MTT assay) after 72 hours of incubation in the presence of different concentrations of the genotoxic agents. The transfected cell line showed greater resistance to the oxidative agent H_2O_2 , as well as to mitomycin C and cisplatin compounds which generate interstrand cross-links. Increased resistance to H_2O_2 is consistent with previous *in vitro* results where it was found that *LiPolθ* can perform translesion synthesis through 8oxodG (main product of oxidative damage) in an error-free mode. Similarly the increased resistance to cisplatin and mitomycin C, is consistent with the results obtained in other organisms such as *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* or *Mus musculus*, where the absence of *Polθ* is related to an increased sensitivity to agents that cause interstrand cross-links (Boyd, Sakaguchi et al. 1990; Muzzini, Plevani et al. 2008; Li, Gao et al. 2011). By contrast, the transfected parasites showed a lower tolerance to ultraviolet radiation. Based on the low efficiency exhibited by *LiPolθ* in translesion synthesis through CPD (main product of UV radiation) a possible explanation is that *LiPolθ* as its over-expressed, competes with *LiPolη* for DNA, thus preventing repair of the lesion and causing the lower survival rate observed. Finally, in the presence of the alkylating agents tested (MMS, EMS and ENU), wild-type and transfected parasites showed no difference in survival rate. The similar response observed against MMS, is in agreement with previous studies conducted with chicken DT40 cells and larvae of *D. melanogaster* where knock out for *Polθ* showed no differences in sensitivity to this compound (Boyd, Sakaguchi et al.

1990; Yoshimura, Kohzaki et al. 2006). In the same way, the absence of a differential response against ENU is consistent with the low fidelity of *LiPolθ* observed in *in vitro* assays in which *LiPolθ* shows a preference for dTTP misincorporation opposite 6mdG. Because 6mdG bypass by *LiPolθ* would imply the emergence of mutations, it seems unlikely to be one of the roles played by *LiPolθ* *in vivo*.

Due to the ability of *LiPolθ* to perform translesion synthesis through 8oxodG in an error-free mode as well as the increased resistance to hydrogen peroxide showed by transfected parasites overexpressing *LiPolθ* we assessed whether *LiPolθ* could have a role during the first steps of *Leishmania* infection where oxidative stress is the main defense mechanism that phagocytic cells use to kill the parasites. To test this, *in vitro* infections of macrophages were carried out with metacyclic promastigotes of wild-type and transfected cell lines. Transfected promastigotes showed an infection rate three times higher than wild-type promastigotes (33% vs. 11% respectively).

In summary, according to the results obtained in this study, *LiPolθ* is involved in resistance to oxidative damage, which is relevant in the infective process of the mononuclear phagocytic system cells.

Bibliography

- Aller, P., M. Rould, et al. (2007). "A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol." PNAS **104**: 814-818.
- Antoine, J., E. Prina, et al. (2004). "Leishmania spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts." Advances in Parasitology **58**: 1-68.
- Batra, V., W. Beard, et al. (2010). "Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site." Nature Structural and Molecular Biology **17**: 889-890.
- Boyd, J., K. Sakaguchi, et al. (1990). "mus308 mutants of Drosophila exhibit hypersensitivity to DNA cross-linking agents and are defective in a deoxyribonuclease." Genetics **125**: 813-819.
- Cunningham, A. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." Experimental and Molecular Pathology **72**: 132-141.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases **27**: 305-318.
- Gonzalez-Púmariega, M., M. Vernhes, et al. (2009). "La radiación ultravioleta su efecto dañino y consecuencias para la salud humana." Theoria **18**: 69-80.
- Harris, P., O. Mazina, et al. (1996). "Molecular cloning of Drosophila mus308, a gene involved in DNA cross-link repair with homology to prokaryotic DNA polymerase I genes." Molecular and Cellular Biology **16**: 5764-5771.
- Hogg, M., M. Seki, et al. (2011). "Lesion bypass activity of DNA polymerase θ (POLQ) is an intrinsic property of the pol domain and depends on unique sequence inserts." Journal of Molecular Biology **405**: 642-652.
- Katafuchi, A. and T. Nohmi (2010). "DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: Their efficiency and template base preference." Mutation Research **703**: 24-31.
- Kusumoto, R., C. Masutani, et al. (2002). "Translesion synthesis by human DNA polymerase η across thymine glycol lesions." Biochemistry **41**: 6090-6099.
- Li, Y., S. Dutta, et al. (2004). "Nucleotide insertion opposite a cis-syn thymine dimer by a replicative DNA polymerase from bacteriophage T7." Nature Structural and Molecular Biology **11**: 784-790.
- Li, Y., X. Gao, et al. (2011). "Comparison of two PolQ mutants reveals that a polymerase-inactive PolQ retains significant function in tolerance to etoposide and γ -irradiation in mouse B cells." Genes to Cells **16**: 973-983.
- Muzzini, D., P. Plevani, et al. (2008). "Caenorhabditis elegans POLQ-1 and HEL-308 function in two distinct DNA interstrand cross-link repair pathways." DNA Repair **7**: 941-950.
- Myler, P. and N. Fasel (2008). Leishmania: After the Genome.
- Pang, M., M. McConnell, et al. (2005). "The Drosophila mus 308 gene product, implicated in tolerance of DNA interstrand crosslinks, is a nuclear protein found in both ovaries and embryos." DNA Repair **4**: 971-982.
- Prasad, R., M. Longley, et al. (2009). "Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair in vitro." Nucleic Acids Research **37**: 1868-1877.
- Rajão, M., D. Passos-Silva, et al. (2009). "DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate." Molecular Microbiology **71**: 185-197.
- Randall, S., R. Eritja, et al. (1987). "Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesions in DNA." The Journal of Biological Chemistry **262**: 6864-6870.

- Seki, M., F. Marini, et al. (2003). "POLQ (Pol θ), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells." Nucleic Acids Research **31**: 6117-6126.
- Seki, M., C. Masutani, et al. (2004). "High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q." The EMBO Journal **23**: 4484-4494.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." Nature **349**: 431-434.
- Singh, N., M. Kumar, et al. (2012). "Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets." Asian Pacific Journal of Tropical Medicine **5**: 485-497.
- Strauss, B. (2002). "The "A" rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity." DNA Repair **28**: 125-135.
- Takata, K., T. Shimizu, et al. (2006). "Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol." The Journal of Biological Chemistry **281**: 28445-28455.
- Yoon, J., G. Bhatia, et al. (2010). "Error-free replicative bypass of thymine glycol by the combined action of DNA polymerases kappa and zeta in human cells." PNAS **107**: 14116-14121.
- Yoshimura, M., M. Kohzaki, et al. (2006). "Vertebrate POLQ and POL β cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage." Molecular Cell **24**: 115-125.
- Yousefzadeh, M. J. and R. D. Wood (2013). "DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage." DNA Repair **12**: 1-9.



Introducción

1. Leishmaniasis.

1.1 Introducción.

Se denomina leishmaniasis al conjunto de enfermedades causadas por protozoos parásitos del género *Leishmania* que afectan a vertebrados mamíferos, entre ellos el hombre. Desde el punto de vista clínico, la leishmaniasis presenta tres manifestaciones principalmente, dependiendo de la especie que la produzca y del estado inmune del hospedador: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. El ciclo biológico de *Leishmania* spp. es diheteroxeno y dimórfico puesto que se desarrolla en dos hospedadores diferentes con alternancia de dos estadios fundamentales: promastigote y amastigote. El promastigote (forma extracelular del parásito) se desarrolla en el interior del tubo digestivo del vector, un flebotomino perteneciente al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo o al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, mientras que el amastigote (forma intracelular del parásito) se multiplica en células del sistema fagocítico-mononuclear del hospedador mamífero. Algunas leishmaniasis como la causada por *L. donovani*, son antroponosis ya que el reservorio es el ser humano. Sin embargo, la mayoría de las leishmaniasis son zoonosis, por la presencia de mamíferos reservorios en el entorno natural o doméstico, que son contraídas eventualmente por el hombre. En España el principal reservorio es el perro, por lo que la leishmaniasis constituye un problema de salud pública tanto humana como veterinaria.

1.2 Clasificación taxonómica del género *Leishmania*.

Los protozoos responsables de la leishmaniasis pertenecen al género *Leishmania*. Estos parásitos fueron identificados por primera vez por Cunningham en 1885 y posteriormente descritos por Leishman en 1900 y Donovan en 1903 (Handman, 1999). La clasificación taxonómica del género *Leishmania* es la siguiente (Rioux y cols., 1990):

Dominio: Eukaryota (Whittaker y Margulis, 1978).
Reino: Protista (Haeckel, 1866).
Subreino: Protozoa (Goldfuss, 1817).
Filo: Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963).
Subfilo: Mastigophora (Deising, 1866).
Clase: Zoomastigophorea (Calkins, 1909).
Orden: Kinetoplastida (Honigberg, 1963).

Suborden: Trypanosomatina (Kent, 1880).
 Familia: Trypanosomatidae (Döflein, 1901).
 Género: *Leishmania* (Ross, 1903).

Las especies del género *Leishmania* se encuentran clasificadas en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, de acuerdo a su localización (supra o peri-pilórica, respectivamente) en el tracto digestivo del insecto vector (Lainson y Shaw, 1987). A su vez cada uno de los subgéneros comprende varios complejos en los que se agrupan las diferentes especies de *Leishmania* según el grado de similitud entre ellas.

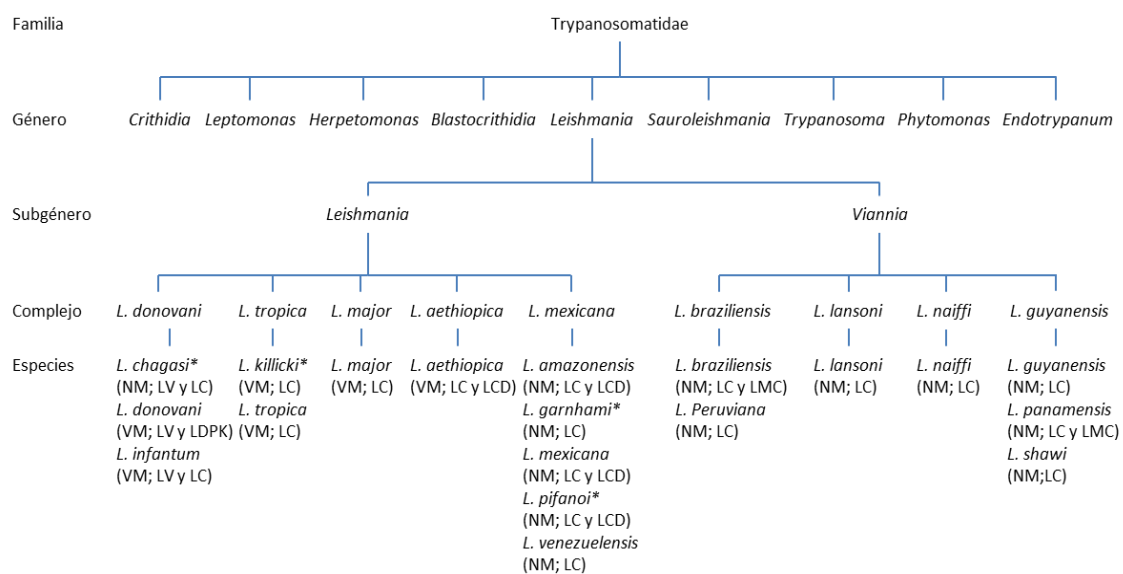


Figura 1. Clasificación taxonómica de las especies del género *Leishmania* que afectan al ser humano. NM: Nuevo Mundo. VM: Viejo Mundo. LC: leishmaniasis cutánea. LCD: leishmaniasis cutánea difusa. LMC: leishmaniasis mucocutánea. LV: leishmaniasis visceral. El asterisco indica las especies cuya clasificación taxonómica se encuentra bajo discusión. Figura adaptada de (Liu, 2012; OMS, 2010).

1.3 Biología molecular y bioquímica de *Leishmania*.

Leishmania es un organismo que divergió muy tempranamente del tronco evolutivo de los eucariotas y por ello, al igual que otras especies del orden Kinetoplastida, presenta una serie de peculiaridades moleculares y bioquímicas que la diferencian de los eucariotas superiores. Entre estas características se encuentran:

Reproducción: los protozoos del género *Leishmania* se reproducen por multiplicación asexual o agamogonia. Los promastigotes se dividen por bipartición longitudinal desde la zona anterior a la posterior, exceptuando los promastigotes metacíclicos (ver más adelante), que no se dividen. La división celular de los amastigotes se realiza por fisión binaria simple. La reproducción sexual o el intercambio genético no está completamente demostrado, si bien algunos trabajos sugieren la posibilidad de que se produzcan fenómenos de recombinación genética entre distintos individuos en el interior del insecto vector (Rougeron y cols., 2010). No obstante, la clonalidad no conlleva necesariamente ausencia de recombinación, sino que ésta no es lo suficientemente frecuente como para romper la estructura de la población clonal (Tibayrenc, 1992).

Kinetoplasto: *Leishmania*, al igual que el resto de organismos pertenecientes al orden Kinetoplástida, presenta una única mitocondria en cuyo interior se encuentra una estructura discoidal denominada kinetoplasto. Dicha estructura está constituida por el ADN mitocondrial, también denominado ADN del kinetoplasto (ADNk) y proteínas. El ADNk se compone de dos tipos de moléculas de ADN circular: maxicírculos (varias docenas) y minicírculos (varios miles). Ambos tipos de moléculas se encuentran entrelazadas entre sí formando una única red de ADN. Los maxicírculos contienen los genes que codifican para ARN ribosómico y las subunidades de los complejos respiratorios. Un rasgo único de los maxicírculos es que muchos de sus transcritos sufren edición de ARN, un proceso por el cual, residuos de uridina son insertados o deletados en sitios específicos. En algunos casos la edición ocurre a escala masiva, llegando a constituir las uridinas introducidas por el proceso de edición la mitad de los nucleótidos de la región codificante del ARNm. Los minicírculos juegan un papel crucial en este proceso codificando pequeños ARN guías que controlan la especificidad de la edición (Torri y cols., 1996).

Tripanotión: el sistema tiol-redox de tripanosomátidos comprende cuatro tioles de bajo peso molecular: glutatión, glutationilespermidina, tripanotión y ovotiol A. A diferencia de eucariotas superiores, la principal molécula portadora de grupos tiol del sistema tiol-redox celular no es el glutatión sino el tripanotión que consiste en dos moléculas de glutatión acopladas a una de espermidina. El tripanotión juega un papel importante en el mantenimiento de un ambiente celular reductor, protegiendo al parásito del estrés químico y oxidativo (Krauth-Siegel y cols., 2003).

Transcripción: todos los genes que codifican para proteínas se encuentran organizados en unidades de transcripción policistrónicas, cada una de las cuales puede contener decenas o centenas de genes con funciones que no están generalmente relacionadas entre sí (Johnson y cols., 1987; Mottram y cols., 1989). La transcripción se inicia desde un promotor situado en 5' con respecto a la unidad de transcripción, dando lugar a un ARN policistrónico que es procesado mediante los mecanismos de corte y unión en *trans* (*trans-splicing*) y poliadenilación para generar los ARNm monocistrónicos maduros (Liang y cols., 2003). El mecanismo de *trans-splicing* consiste en la adición de un fragmento de 39 ribonucleótidos denominado miniexón o *spliced leader* al extremo 5' de una unidad monocistrónica mediante una reacción de trans-esterificación. El sitio aceptor es un dinucleótido AG situado corriente abajo de una secuencia polipirimidínica. El mecanismo de poliadenilación en el extremo 3' del ARN monocistrónico, al contrario de lo que ocurre en eucariotas superiores no está dirigido por una secuencia concreta. Sin embargo, se ha propuesto que los fenómenos de *trans-splicing* y poliadenilación están acoplados, de modo que tras la adición del miniexón en el dinucleótido AG, la maquinaria de procesamiento rastrearía corriente arriba el mensajero para seleccionar el sitio de adición de la cola de poli(A) en el gen situado en la posición inmediatamente anterior (LeBowitz y cols., 1993).

En los tripanosomátidos no hay intrones en los genes y sólo se ha detectado *cis-splicing* en cuatro casos (cuatro excepciones), que en el caso de *L. major* son: ARN helicasa LmjF07.0340; poli(A) polimerasa LmjF29.2600; proteína hipotética conservada LmjF29.2000; y proteína hipotética conservada LmjF32.0850 (Rosenzweig y cols., 2008).

Regulación post-transcripcional: En los tripanosomátidos, los genes se transcriben de forma constitutiva, por lo que la regulación de la expresión génica tiene lugar principalmente a nivel post-transcripcional (Clayton, 2002). Los principales puntos de regulación son: la eficiencia en el proceso de *trans-splicing* y poliadenilación, la estabilidad del ARNm, la eficiencia del proceso de traducción y la estabilidad de la proteína. En esta regulación post-transcripcional parecen tener un papel importante las regiones no traducidas del ARN policistrónico situadas en posición 5' y 3' (5'-UTR y 3'-UTR) de cada una de las regiones codificantes. La región 5' UTR determina el grado de eficiencia del proceso de *trans-splicing*, mientras que la región 3' UTR regula el proceso de traducción (Clayton y Shapira, 2007; Kapotas y Bellofatto, 1993; Siegel y cols., 2005).

1.4 Ciclo biológico.

Leishmania posee un ciclo biológico diheteroxeno y dimórfico. En el insecto vector (hembras de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) se encuentra la forma móvil del parásito, denominada promastigote (forma extracelular) que se localiza en el interior del tubo digestivo. En el hospedador mamífero se encuentra la forma inmóvil denominada amastigote, parásito intracelular obligado de las células del sistema fagocítico-mononuclear (Handman, 2001). El estadio promastigote posee una morfología ovoide o fusiforme con un tamaño que oscila entre 6 y 20 μm y un flagelo emergente de igual o mayor longitud. El amastigote por su parte posee una morfología esférica o cuasi-esférica de 2-4 μm de longitud y un pequeño flagelo no emergente.

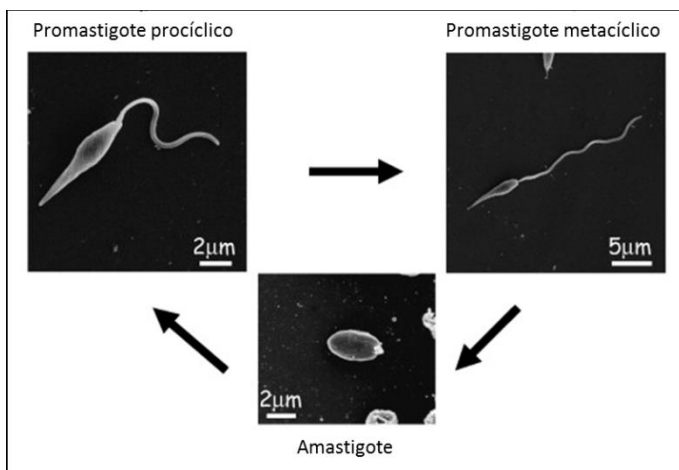


Figura 2. Cambios morfológicos en *Leishmania*. Imágenes de microscopía electrónica de las principales formas de *Leishmania*. Figura adaptada de Besterio y cols., 2007.

El ciclo biológico de *Leishmania* implica la transmisión de los amastigotes que residen en el hospedador mamífero infectado a un flebotomo hembra cuando éste pica al mamífero para alimentarse de su sangre. La sangre ingerida con los parásitos es rápidamente rodeada por una membrana peritrófica, una matriz compuesta por quitina segregada por las células epiteliales del tubo digestivo (Secundino y cols., 2005). Los macrófagos son lisados quedando libres los amastigotes que se transforman en promastigotes, los cuales secretan quitinasas permitiendo su liberación de la membrana peritrófica (Kamhawi, 2006). El periodo de tiempo que *Leishmania* permanece en el flebotomo es aproximadamente de 6 a 9 días, durante los cuales el parásito se desarrolla a través de distintas fases y morfologías. Cronológicamente, el primer estado es el de forma procíclica, ligeramente móvil y con morfología corta y ovoide. Posteriormente los promastigotes migran hacia la parte anterior del tubo digestivo del díptero. En el transcurso de la migración experimentan un proceso denominado metaciclogénesis que se caracteriza por un incremento de la longitud del flagelo,

alargamiento de la forma, reducción de la capacidad de división y un aumento de la infectividad (Sacks y Perkins, 1984). Los promastigotes llamados metacíclicos son transmitidos en la ingestión de sangre de un nuevo hospedador. La degeneración y obstrucción de la válvula estomodeal del insecto debido a la liberación de enzimas quitinolíticos y a la formación de agregados de parásitos por aglutinación respectivamente, dificulta el proceso de ingestión durante la picadura, obligando al vector a picar un mayor número de veces que los flebotomos no infectados, incrementando así la eficiencia de transmisión (Kamhawi, 2006; Rogers y Bates, 2007). Dichos promastigotes son rápidamente fagocitados por macrófagos y neutrófilos, e internalizados en el fagosoma, donde se diferencian en amastigotes.

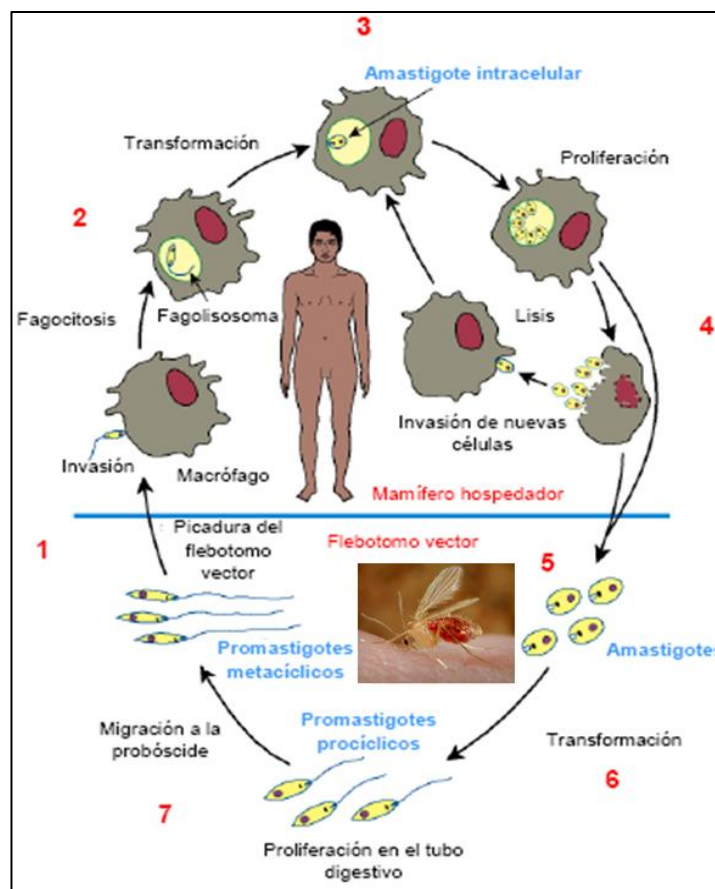


Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania*. 1. Inoculación de promastigotes metacíclicos por la picadura del flebotomo hembra. 2. Fagocitosis de los promastigotes por los macrófagos. 3. Diferenciación del promastigote a amastigote en el fagolisosoma y multiplicación de los amastigotes. 4. Lisis del macrófago parasitado, liberación de los amastigotes y diseminación de la infección por fagocitosis de los mismos por nuevos macrófagos. 5. Ingestión de macrófagos parasitados con amastigotes durante la alimentación hematófaga del flebotomo hembra y liberación de amastigotes en el tubo digestivo del vector. 6. Diferenciación de amastigotes en promastigotes procíclicos. 7. División de los promastigotes y migración hacia la probóscide del vector. Durante dicha migración los promastigotes experimentan el proceso de metaciclologénesis adquiriendo virulencia. Figura adaptada de Handman, 2001.

Excepcionalmente se han detectado casos en los que la transmisión de la enfermedad ha tenido lugar por medios poco frecuentes como por vía sexual (Symmers, 1960), congénita (Figueiró-Filho y cols., 2004), por transfusión sanguínea (Dey y Singh, 2006) o mediante el uso compartido de agujas en drogodependientes (Cruz y cols., 2002).

1.5 Epidemiología.

Actualmente la leishmaniasis está presente en 4 continentes, siendo considerada endémica en 88 países, 72 de los cuales se encuentran en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis presenta una prevalencia a nivel mundial de 12 millones de personas. En cuanto a la incidencia, se estima que cada año surgen 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea y 0,5 millones de leishmaniasis visceral. La población en riesgo es de 350 millones de personas aproximadamente. No obstante, estas cifras podrían estar subestimadas puesto que la leishmaniasis es de declaración obligatoria sólo en 33 de los 88 países afectados (Desjeux, 2004). El mayor número de casos de leishmaniasis tiene lugar en países subdesarrollados. En concreto, el 90% de leishmaniasis cutánea aparece en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria, el 90% de leishmaniasis mucocutánea se concentra en Bolivia, Brasil y Perú y el 90% de los casos de leishmaniasis visceral en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán. En los últimos años se está produciendo un incremento en el número global de casos, lo cual se asocia a la situación de subdesarrollo de las principales zonas endémicas, con problemas de desnutrición y escasa o nula cobertura sanitaria, así como a la invasión de dichas zonas por individuos no inmunes para la explotación económica de las mismas, mejor diagnóstico de la enfermedad, y a la aparición de resistencias frente a los fármacos habituales (Alvar y cols., 2006). El aumento de la incidencia de la enfermedad en el mundo desarrollado se debe al carácter de *Leishmania* como patógeno oportunista, asociado a casos de inmunodepresión tanto por quimioterapia (cáncer, trasplantes), como por infección por VIH (Cruz y cols., 2006). Además, el calentamiento global está propiciando la propagación de las leishmaniasis a áreas en las que nunca se había detectado, como consecuencia de la migración del vector a nuevas regiones óptimas para su desarrollo. Un ejemplo de ello es la leishmaniasis visceral endémica en el área Mediterránea, la cual está avanzando hacia el norte (Desjeux, 2001).

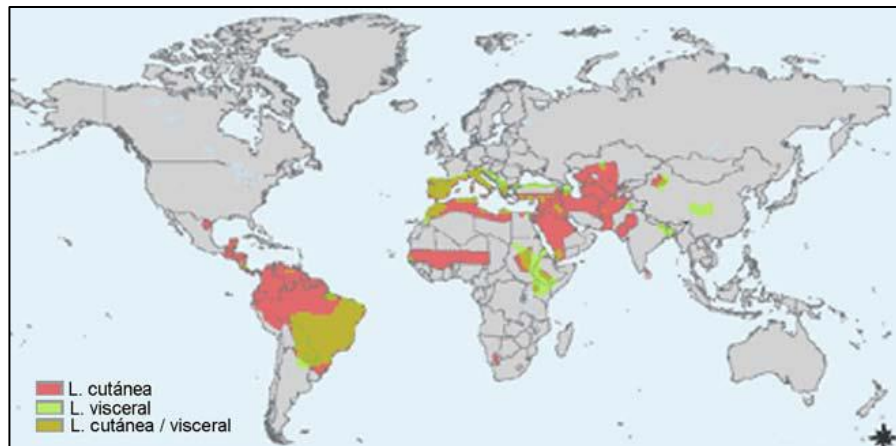


Figura 4. Distribución mundial de la leishmaniasis según sus diferentes manifestaciones clínicas. El área de distribución de la leishmaniasis mucocutánea se incluye en el de la leishmaniasis cutánea. Figura adaptada de la OMS.

En España la leishmaniasis es una zoonosis endémica, presente en la mayor parte del territorio peninsular e Islas Baleares, producida por *Leishmania infantum*. Las especies de vector implicadas en la transmisión del parásito son *P. perniciosus* y *P. ariasi*. El perro es el principal reservorio, habiéndose estimado que el 7% de la población canina está infectada (Encinas y cols., 2006). La incidencia en seres humanos es baja, con un promedio de 100 nuevos casos al año, de los cuales un 90% se corresponden con leishmaniasis visceral y un 10% con leishmaniasis cutánea. Las principales regiones afectadas son la Comunidad Valenciana, la Comunidad de Madrid y Cataluña (Encinas y cols., 2006). Desde julio de 2009 está teniendo lugar un brote de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad de Madrid donde la incidencia se ha quintuplicado (Suárez y cols., 2012). Estudios realizados en la región afectada por el brote epidemiológico han demostrado que la liebre puede actuar como reservorio secundario, siendo capaz de transmitir la infección al vector *P. perniciosus* (Molina y cols., 2012).

1.6 Manifestaciones clínicas.

La forma y gravedad de las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis dependen tanto de la especie infectiva como del estado inmunológico del hospedador (Handman, 1999). A pesar de la heterogeneidad en la sintomatología y patología de la leishmaniasis, todas sus manifestaciones clínicas comparten como rasgo común la parasitación de células del sistema fagocítico-mononuclear. Según los órganos afectados, la leishmaniasis en el

hombre se clasifica en tres grupos fundamentales: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral (Alvar y cols., 2006).

Leishmaniasis cutánea: se caracteriza por la aparición de úlceras cutáneas en el lugar de la picadura del vector, generalmente en zonas expuestas del cuerpo (cara, brazos o piernas). Las especies causantes de esta afección en el Viejo Mundo son *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, y en algunas ocasiones *L. infantum* y *L. donovani*. En el Nuevo Mundo las especies implicadas son *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi*. Por lo general es relativamente leve y auto-curativa.

Leishmaniasis mucocutánea: cursa con úlceras cutáneas que curan inicialmente, pero tras la lesión primaria los parásitos migran por vía hematológica o linfática hacia la orofaringe, provocando graves lesiones de la mucosa y cartílago de las cavidades orofaríngea y nasal. Es una enfermedad altamente estigmatizante. Los casos de muerte se asocian a infecciones bacterianas y malnutrición. Es típica del continente americano. Las especies que la producen pertenecen al subgénero *Viannia*, especialmente *L. braziliensis* y *L. panamensis* (Myler y Fasel, 2008).

Leishmaniasis visceral (Kala-azar): es la forma más grave de la enfermedad, con una tasa de mortalidad cercana al 100% si no se trata. Es producida por *L. infantum* y *L. donovani* en el Viejo Mundo y por *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. La enfermedad cursa con la invasión de las células del sistema fagocítico-mononuclear del hígado, bazo, médula ósea y mucosa intestinal, principalmente. El periodo de incubación es variable, pudiendo durar hasta un año, con aparición gradual de sus manifestaciones clínicas. Los primeros signos son fiebre, anorexia y palidez de las mucosas, posteriormente aparece hepato-esplenomegalia, y leucopenia que finaliza en pancitopenia.

Existen además otras manifestaciones clínicas de menor incidencia: leishmaniasis dérmica post-*Kala-azar* y leishmaniasis cutánea difusa.

Leishmaniasis dérmica post-Kala-azar: surge generalmente como secuela tras la curación clínica de los pacientes con leishmaniasis visceral causada por *L. donovani*, aunque en ocasiones también puede aparecer en pacientes que no han mostrado previamente síntomas de leishmaniasis visceral. Se caracteriza por la aparición de máculas hipopigmentadas o eritematosas dispersas por la piel que pueden dar lugar posteriormente a pápulas y nódulos, especialmente en la cara (OMS, 2010). En ocasiones puede generar ceguera (Khalil y cols., 2011).

Leishmaniasis cutánea difusa: está causada por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y *L. mexicana* y *L. amazonensis* en el Nuevo Mundo. Cursa con aparición de pápulas o nódulos no ulcerados distribuidos ampliamente por la piel, especialmente en extremidades y cara. No cura espontáneamente y son frecuentes las recidivas tras el tratamiento (OMS, 2010).

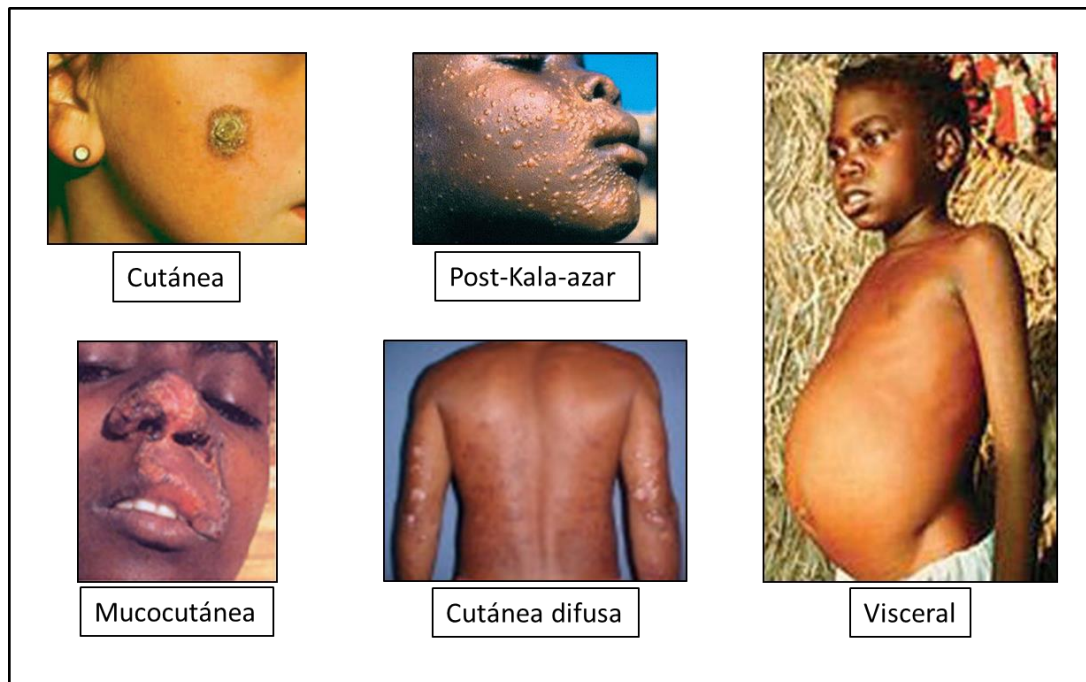


Figura 5. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana. Imágenes representativas de las diferentes manifestaciones que puede presentar la leishmaniasis en el ser humano.

1.7 Respuesta inmune en la infección por especies del género Leishmania.

Tras la inoculación de los parásitos por el vector, se produce la activación del sistema del complemento del hospedador vertebrado, que elimina a más del 90% de los promastigotes. No obstante, un bajo porcentaje de parásitos capaz de resistir la acción lítica del complemento, es internalizado por células fagocíticas tanto circulantes como residentes en la dermis (Domínguez y cols., 2002; Moreno y cols., 2007). Las principales células fagocíticas implicadas son los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas. Los neutrófilos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune innata, ya que son capaces de fagocitar y destruir microorganismos mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y liberación de enzimas líticos almacenados en sus gránulos. Por otro lado, son capaces de participar en la regulación del sistema inmune

mediante la producción de citoquinas como IL-12, IFN- γ , y TNF- α (Chen y cols., 2005). Los macrófagos también poseen actividad microbicida, aunque se han descrito diferentes vías mediante las cuales el parásito puede ser internalizado sin activar los mecanismos efectores del macrófago. En el interior del macrófago, el parásito se diferencia a amastigote y comienza a replicarse activamente dentro de los fagolisosomas. La activación de los macrófagos es crucial para el control de la enfermedad. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno. Estas células se activan tras la fagocitación del parásito aumentando la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), encargadas de la presentación de antígenos de origen intracelular y extracelular respectivamente, y de moléculas coestimuladoras. Igualmente tras la fagocitación del parásito, las células dendríticas adquieren una alta capacidad migratoria, lo que les permite alcanzar los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos) donde activan a los linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante la presentación de antígeno (Satthaporn y Eremin, 2001). Los linfocitos T colaboradores o T *helper* (CD4+) vírgenes, pueden dar lugar a dos tipos de poblaciones linfocitarias: Th1 o Th2, que se diferencian en el patrón de expresión de citoquinas. En el modelo murino, la resistencia o susceptibilidad frente a la leishmaniasis cutánea está asociado al desarrollo de una respuesta Th1 o Th2 respectivamente. Los factores que determinan la diferenciación de las células T CD4+ hacia un fenotipo Th1 o Th2 no se conocen con exactitud, aunque se cree que el tipo de célula dendrítica encargada de realizar la presentación de antígeno podría ser relevante (de Saint-Vis y cols., 1998; Moser y Murphy, 2000). De igual modo la citoquina IL-12 está asociada al desarrollo de una respuesta Th1. Esta citoquina activa a las células NK, las cuales son responsables de la producción temprana de IFN- γ que influirá en el desarrollo de una respuesta Th1 frente a la leishmaniasis (Scharton-Kersten y cols., 1995). De igual modo IL-12 activa a las células T CD4+ tipo Th1, y T CD8+ las cuales producen también IFN- γ . Los linfocitos CD4+ Th1 y CD8+ activados migran de regreso a la piel y allí interactúan con los macrófagos infectados. La secreción IFN- γ por los linfocitos Th1 activa a los macrófagos parasitados y los estimula a producir óxido nítrico mediante la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible. La participación de los linfocitos CD8+ se da por dos mecanismos: por acción directa de los mecanismos citotóxicos y por la producción de las citoquinas activadoras de macrófagos (TNF- α e IFN- γ) que favorecen la muerte de los parásitos intracelulares. El desarrollo de una respuesta Th2, conlleva la producción de las citoquinas IL-4 e IL-10 por parte de los linfocitos T CD4+. Estas citoquinas estimulan la inmunidad humoral e inhiben la proliferación de la respuesta Th1 haciendo al macrófago poco susceptible para la activación por IFN- γ (Awasthi y cols., 2004). Debido a que el parásito se protege de la

respuesta inmune humoral en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos, se ha considerado que dicha respuesta no es efectiva contra el parásito pudiendo llegar a ser perjudicial para el hospedador por la formación de inmunocomplejos (Cunningham, 2002). Sin embargo, el significado de la respuesta Th2 en el establecimiento o no de la enfermedad excepto en el caso de la leishmaniasis cutánea en ratones, es incierto y parece que no existe una clara producción diferencial de citoquinas Th1-Th2 que determine la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad. Ambos tipos de citoquinas están presentes y el balance entre ellas es lo que determina la progresión (Ajadary y cols., 2000; Bottrel y cols., 2001; Stanley y Engwerda, 2007).

1.8 Mecanismos de evasión frente a la respuesta inmune del hospedador mamífero.

Leishmania ha desarrollado mecanismos adaptativos que aseguran su supervivencia en los distintos ambientes que atraviesa a lo largo de su ciclo biológico. Por un lado, una vez inoculados en el hospedador mamífero, deben de ser capaces de evadir la respuesta inmune innata. Posteriormente, en el interior de la célula fagocítica, deben de resistir la acción de enzimas lisosomales y metabolitos tóxicos. A continuación se describen algunos de estos mecanismos de evasión:

Resistencia al sistema del complemento: Las moléculas de LPG expresadas en la membrana de los promastigotes metacíclicos poseen una mayor longitud que la de los promastigotes procíclicos (McConville y cols., 1992). Esta mayor longitud de las moléculas de LPG se traduce en un mayor espesor de la superficie externa del parásito, lo que podría evitar la inserción del complejo de ataque a la membrana (Schamber-Reis y cols.) C5b-C9 (Puentes y cols., 1990). Además, la metaloproteasa de superficie gp63 es capaz de actuar sobre C3b dando lugar a la forma inactiva iC3b, impidiendo la formación del CAM. Por otro lado iC3b es capaz de opsonizar los promastigotes permitiendo su entrada a los macrófagos a través del receptor CR3 (Brittingham y cols., 1995).

Múltiples vías de entrada al interior del macrófago: Existe un gran número de receptores en los macrófagos cuya activación va a permitir la internalización del parásito. Los principales son CR1 y CR3, pero hay otros muchos como el receptor de manosa-fucosa, CR4, el receptor de la fibronectina, el receptor de la proteína C reactiva o los receptores Fc (Alexander y cols., 1999). También se ha observado la entrada del parásito a través de neutrófilos. Cuando los neutrófilos infectados entran en apoptosis,

podrían ser fagocitados por macrófagos facilitándose de este modo la entrada silenciosa de parásitos que han resistido la degradación en los neutrófilos (Charmoy y cols., 2010).

Alteración del proceso de maduración de los fagolisosomas: Los amastigotes son capaces de sobrevivir y reproducirse en el interior de fagolisosomas, sin embargo los promastigotes son más sensibles a las hidrolasas y al pH ácido. Debido a ello los promastigotes a través de las moléculas de LPG de sus membranas retrasan la fusión fagosoma - endosoma, lo que les permite llevar a cabo la diferenciación a amastigote bajo condiciones menos restrictivas (Antoine y cols., 2004; Lodge y Descoteaux, 2006).

Modulación de las vías de señalización de la célula fagocítica: *Leishmania* puede afectar las vías de señalización del macrófago para interrumpir sus funciones celulares. Se ha observado que macrófagos infectados por *Leishmania* no responden adecuadamente a IFN- γ , LPS o activadores de la proteína quinasa C (Descoteaux y Turco, 1999). La señal de transducción se ve modificada mediante la alteración de los niveles de fosforilación celular ya sea por regulación de las quinasas y fosfatasas celulares o por la expresión de fosfatasas propias del parásito que actúan sobre proteínas del macrófago (Kane y Mosser, 2001).

Supresión de la producción de óxido nítrico: La producción de óxido nítrico (NO) juega un importante papel en el control de la infección por parte del hospedador (Green y cols., 1990; Liew y cols., 1990). Sin embargo, se ha descrito que *Leishmania*, tras la infección, puede bloquear su producción (Gantt y cols., 2001a; Melby y cols., 2001). La enzima que cataliza la obtención de NO es la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La presencia de glicoinositolfosfolípidos (Descoteaux y Turco; 1999) o fosfatidilserina en la superficie de los amastigotes podrían ser los responsables de bloquear la inducción de iNOS y por tanto, la síntesis de óxido nítrico (Wanderley y cols., 2006).

Modulación de la producción de citoquinas: Tanto promastigotes como amastigotes de diferentes especies de *Leishmania* reducen la capacidad de los macrófagos para producir IL-12, la cual es necesaria para una respuesta Th1 (Belkaid y cols., 1998; Carrera y cols., 1996). La entrada de parásitos a través de receptores Fc induce además la producción de IL-10, la cual está asociada a la disminución de actividad microbicida por parte de macrófagos (Sutterwala y cols., 1998).

Inhibición de daño oxidativo: Mediante la entrada preferencial a los macrófagos vía los receptores CR1 y CR3, los promastigotes eluden la activación de la respuesta oxidativa (Brittingham y Mosser, 1996). Los amastigotes interfieren en la formación de especies reactivas de oxígeno en el macrófago a través de diferentes mecanismos, por ejemplo mediante la degradación del grupo hemo e inhibición de la formación del complejo NADPH oxidasa (Lodge y Descoteaux, 2006; Pham y cols., 2005).

1.9 Control de la enfermedad.

1.9.1 Actuaciones sobre el reservorio y el vector.

La leishmaniasis es una zoonosis, excepto en núcleos de alta densidad humana como India y China, donde es considerada una antroponosis. En España, y en general en Europa del Sur, el perro es el principal reservorio. El empleo de quimioterapia en el perro supone curación clínica pero no parasitaria, siendo por tanto una enfermedad crónica. El control sobre el vector se realiza mediante fumigación con insecticidas tanto en el ámbito doméstico como en el peridoméstico, utilización de mosquiteras y de collares repelentes en el perro que previenen de la picadura al mismo (Alexander y Maroli, 2003).

1.9.2 Vacunas.

El desarrollo de vacunas frente a *Leishmania* se divide arbitrariamente en tres grandes grupos dependiendo de la naturaleza y producción del antígeno (Palatnik-de-Sousa, 2008):

Vacunas de primera generación: Consisten en la inoculación de parásitos vivos (atenuados o no) o muertos. La inoculación de parásitos vivos virulentos puede ocasionar el desarrollo de lesiones graves que requieren tratamiento. Este hecho ha conllevado el abandono de la práctica de leishmanización excepto en Uzbekistán (Noazin y cols., 2008). El uso de vacunas con parásitos vivos atenuados es controvertido ya que existe el riesgo potencial de reversión a un fenotipo virulento (Handman, 2001). Utilizar especies no patógenas como *L. tarentolae*, permite también inducir una inmunidad cruzada protectora contra las especies patógenas (Breton y cols., 2005). La generación de vacunas empleando parásitos muertos también ha sido llevada a cabo, tanto para la leishmaniasis cutánea como visceral. Sin embargo, aunque son seguras e

inmunogénicas no confieren el grado de protección deseada (Antunes y cols., 1986; Armijos y cols., 2003; Khalil y cols., 2000; Vélez y cols., 2005).

Vacunas de segunda generación: Consisten en la inmunización con determinadas fracciones del parásito purificadas a partir de cultivos del mismo, o con proteínas recombinantes. El empleo de la clonación de genes y expresión de proteínas recombinantes ha impulsado el desarrollo de un gran número de vacunas. El principal problema que pueden presentar es que las proteínas pierdan inmunogenicidad debido a que su conformación no sea igual a la de la proteína nativa y se pierdan epítomos conformacionales (Coler y Reed, 2005). En esta segunda generación se incluyen también los parásitos vivos modificados genéticamente (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Vacunas de tercera generación: Se trata de vacunas de ADN, y consisten en la inoculación de un plásmido de expresión eucariota con el gen clonado de un determinado antígeno. La primera vacuna de este tipo fue un plásmido portador de un fragmento de la proteína gp63 (Xu y Liew, 1994). Otras de las vacunas empleadas se basan en construcciones con el antígeno LACK (*Leishmania homologue of receptors for Activated C Kinase*; (Ramos y cols., 2008; Ramos y cols., 2009) y con cisteína proteinasas A y B (Khamesipour y cols., 2006). De esta manera las vacunas de ADN mimetizan los efectos de las vacunas con parásitos vivos pero sin el riesgo de infección.

1.9.3 Tratamiento.

En la actualidad existe un conjunto de fármacos disponibles relativamente eficaces para el tratamiento de la leishmaniasis. No obstante, la aparición de resistencias, los fenómenos de recidivas y la toxicidad asociada a algunos de ellos, hace necesario continuar con la búsqueda de nuevas dianas para la generación de compuestos alternativos (Singh y cols., 2012). Algunos de los fármacos empleados actualmente son:

Antimoniales pentavalentes: Han sido empleados durante más de 50 años como fármacos de primera línea frente a la leishmaniasis, actualmente su uso está más restringido debido a la aparición de cepas resistentes (Lira y cols., 1999). Las dos formas utilizadas son el antimonio de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato sódico (Pentostam®), ambas de administración intramuscular o intravenosa. Para que el fármaco sea activo se requiere la reducción del estado de oxidación Sb^{5+} a Sb^{3+} , siendo la forma trivalente responsable de la toxicidad del fármaco y de sus efectos secundarios

adversos. El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la reducción de la capacidad redox del parásito, esencialmente por depleción de los niveles de GSH y T(SH₂) (Wyllie y cols., 2004) e inhibición de la tripanotona reductasa que conduce a la muerte por apoptosis (Sudhandiran y Shaha, 2003). Los antimoniales pentavalentes pueden producir efectos secundarios como pancreatitis, alteraciones renales, arritmias cardíacas, hepatitis, etc., que en muchos casos llevan a la reducción o el cese del tratamiento (Croft y Yardley, 2002).

Pentamidina (Lomidine®): Es una diamina aromática. Se ha utilizado como segunda línea en pacientes que no responden a antimoniales. El compuesto se acumula en la mitocondria del parásito alterando el potencial de membrana de la misma e inhibiendo la topoisomerasa II mitocondrial (Basselin y cols., 2002; Singh y cols., 2012). Sus principales inconvenientes son la elevada toxicidad (puede ocasionar la aparición de los signos hipoglucemia, miocarditis y nefrotoxicidad así como originar la enfermedad de la diabetes mellitus) y la aparición de resistencias.

Anfotericina B: Es un antibiótico poliénico obtenido a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Su acción letal se basa en la permeabilización selectiva de la membrana plasmática del patógeno por su interacción preferente con ergosterol (esterol mayoritario de la membrana en *Leishmania*) sobre el colesterol presente en la membrana de las células de mamífero (Ramos y cols., 1996). Su formulación liposomal (Ambisome®), disminuye su toxicidad e incrementa su eficacia lo que la convierte en el actual tratamiento de elección para leishmaniasis visceral en países desarrollados. Su administración intravenosa y el elevado coste del Ambisome son sus principales inconvenientes. Hasta la fecha, sólo se han citado casos de resistencia a anfotericina en laboratorio, tras crecimiento del parásito bajo presión continua del fármaco, que cursa con cambios cualitativos y cuantitativos de esteroides de la membrana plasmática (Croft y cols., 2006).

Paromomicina (Aminisidina®): Se trata de un aminoglicósido catiónico cuya administración es tanto tópica como parenteral. Actualmente es el fármaco más económico y los niveles de toxicidad mostrados son bajos. En bacterias actúa mediante unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano con inhibición de la síntesis de proteínas. En cambio, en *Leishmania* el mecanismo de acción no está claro, aunque es posible que la mitocondria sea su principal diana (Jhingran y cols., 2009). Debido a que su uso aún no está extendido no existen casos de resistencia. En la India, el porcentaje

de curación de leishmaniasis visceral es similar al obtenido con anfotericina B (Sundar y cols., 2007).

Miltefosina (hexadecilfosfocolina): En marzo del 2002 la miltefosina fue aprobada como fármaco contra la leishmaniasis visceral en India y comercializada bajo el nombre de Impavido® (Sindermann y cols., 2004). Sus ventajas radican en su administración oral y escasos efectos secundarios, así como su eficacia de curación en pacientes con leishmaniasis visceral, incluso frente a fracaso previo con antimoniales (Jha y cols., 1999; Sundar y cols., 1998). Sin embargo, como contrapartida la miltefosina presenta una elevada vida media (lo que puede causar la aparición de resistencias), y se ha observado cierta actividad teratogénica en ratones, lo que desaconseja su empleo en mujeres embarazadas (Murray, 2000). El modo de acción de la miltefosina no se conoce por completo pero se sabe que inhibe la síntesis de fosfolípidos, glucolípidos y glucoproteínas (Lux y cols., 2000) y produce un proceso similar a la apoptosis (Verma y cols., 2007).

2. Mantenimiento y reparación de la información génica.

2.1 El genoma de Leishmania spp.

Leishmania posee un genoma diploide, con un número haploide que oscila entre $n = 34$ y $n = 36$ dependiendo de la especie. El tamaño de los cromosomas puede variar desde ≈ 250 kilobases hasta ≈ 4 megabases. *L. major* y *L. donovani* poseen 36 cromosomas, mientras que *L. braziliensis* tiene 35, debido a la fusión de los cromosomas 20 + 34. Otras especies de *Leishmania* como *L. mexicana* y *L. amazonensis* poseen sólo 34 cromosomas como resultado de la unificación de los cromosomas 8 + 29 y 20 + 36.

Se han secuenciado los genomas de tres especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*) habiéndose identificado más de 8300 genes codificantes de proteínas y 900 codificantes de ARN. El tamaño medio de los genes que codifican para proteínas es de 1901 pdb y el de las regiones intergénicas es de 2045 pdb. El contenido de G + C de las regiones codificantes e intergénicas es 62,5% y 57,3% respectivamente.

Sólo se ha podido asignar función al 35% de los genes, según los datos de caracterización experimental (3,7%) y de similitud de secuencia con proteínas de función conocida en otros organismos (31,5%). El resto de los genes codifican para proteínas hipotéticas o desconocidas, algunas de las cuales (5,7%) presentan similitud de secuencia con proteínas de función desconocida de otros organismos no pertenecientes al orden Kinetoplastida, la mayoría (50,7%) muestra similitud de secuencia con proteínas de la familia de los tripanosomátidos y el 8,3% son proteínas exclusivas del género *Leishmania* (Myler y Fasel, 2008).

2.2 ADN polimerasas.

Para que la información genética pueda ser transmitida a las células hijas, el ADN tiene que ser replicado. Este proceso debe producirse manteniendo un equilibrio entre la fidelidad que garantice la conservación de la información genética durante generaciones y cierta variabilidad que permita un pequeño grado de diversidad y evolución de las especies. De igual modo los organismos han de poder preservar la integridad del ADN, reparándolo si fuera necesario. En ambos procesos, replicación y reparación, tienen un papel relevante las ADN polimerasas.

Las ADN polimerasas son enzimas con actividad nucleotidil transferasa. En base a su secuencia aminoacídica se clasifican en 7 familias: A, B, C (presentes únicamente en procariotas), D (presentes únicamente en arqueas), X, Y y RT (Hubscher y cols., 2010). Toda las ADN polimerasas poseen una serie de características comunes:

- Catalizan la adición de nucleótidos en el extremo 3' OH de una molécula que actúa como cebador y que puede consistir en un pequeño segmento de ADN, ARN o incluso un aminoácido como serina, treonina o tirosina (Salas, 1991).
- Para poder llevar a cabo la reacción de polimerización, las ADN polimerasas requieren la presencia de dos iones metálicos divalentes (magnesio o manganeso por lo general), con los que interaccionan a través de residuos aminoacídicos conservados en su centro activo. Uno de los iones se encuentra situado entre el fosfato α del nucleótido entrante y el extremo 3' del cebador, mientras que el otro se encuentra en contacto con los tres grupos fosfato del nucleótido entrante (α , β , γ). El primer ion metálico disminuye la afinidad del

grupo 3' OH del cebador por el hidrógeno promoviendo el ataque nucleofílico del grupo 3'O⁻ sobre el fosfato α del nucleótido entrante. El segundo ion metálico interacciona con los fosfatos β y γ facilitando su liberación (Doublie y cols., 1999; Steitz, 1999).

- La mayoría de las ADN polimerasas precisan de una cadena de ácido nucleico que actúe como molde dirigiendo la síntesis de la nueva hebra (extensión del cebador). No obstante, existen algunas excepciones a esta norma general como las polimerasas TdT y Pol μ , las cuales poseen actividad transferasa terminal (Andrade y cols., 2009; Boulé y cols., 2001).
- El dominio polimerasa adopta una estructura tridimensional similar a la de una mano derecha, pudiendo dividirse en los subdominios dedos, palma y pulgar, presentando cada uno de ellos una función determinada. El subdominio palma contiene los residuos aspárticos encargados de contactar con los dos iones metálicos durante la catálisis. El subdominio dedos está implicado en las interacciones con el nucleótido entrante, y el subdominio pulgar participa en el posicionamiento del ADN de doble hebra, la procesividad y la translocación (Steitz, 1999).

Desde que en 1958 se descubrió la primera ADN polimerasa, ADN polimerasa I de *E. coli* (Lehman y cols., 1958), el número de ADN polimerasas conocidas se ha incrementado notablemente, habiéndose descrito 5 en *E. coli* y 17 en el ser humano.

Familia	Fago T7	<i>E. coli</i>	<i>L. infantum</i>	<i>H. sapiens</i>	Función principal
A	Pol I				Replicación y reparación ADN
		Pol I			Procesamiento de fragmentos de Okazaki
				Pol γ	Replicación y reparación ADN mitocondrial
			Pol θ *	Pol θ	Síntesis a través de lesiones ¿SHM? ¿BER? ¿DSB?
			Pol IA		Reparación ADN mitocondrial
			Pol IB		Replicación ADN mitocondrial
			Pol IC		Replicación ADN mitocondrial
			Pol ID		Replicación ADN mitocondrial
				Pol ν	Síntesis a través de lesiones
B			Pol α *	Pol α	Replicación de ADN nuclear
			Pol δ *	Pol δ	Replicación de ADN nuclear
			Pol ϵ *	Pol ϵ	Replicación de ADN nuclear
			Pol ζ *	Pol ζ	Síntesis a través de lesiones
C		Pol II		Reparación del ADN	
		Pol III		Replicación del ADN	
D					
X			Pol β -PAK		Replicación mitocondrial
			Pol β	Pol β	BER
				Pol λ	BER, NHEJ
				Pol μ	SHM, NHEJ, Recombinación V(D)J
			Pol σ *	Pol σ	Cohesión de cromátidas hermanas
Y				TdT	Recombinación V(D)J
		Pol IV			Síntesis a través de lesiones
		Pol V			Síntesis a través de lesiones
			Pol η	Pol η	Síntesis a través de lesiones
				Pol ι	Síntesis a través de lesiones
			Pol κ	Pol κ	Síntesis a través de lesiones
RT			REV1 *	REV1	Síntesis a través de lesiones
			TERT	TERT	Alargamiento de telómeros

Tabla 1. ADN polimerasas descritas en diferentes organismos. (*) Indica que la polimerasa no ha sido aún estudiada, por lo que sus funciones podrían diferir con respecto a las de su homóloga en humanos. SHM: hipermutación somática. BER: reparación por escisión de base. DBS: rotura de doble hebra. NHEJ: unión de extremos no homólogos.

Como se observa en la tabla 1, las ADN polimerasas pueden desempeñar diversas funciones. El que participen en un proceso u otro dependerá de las propiedades de cada enzima. Algunas de las características que diferencian a las distintas polimerasas son:

- La presencia de dominios adicionales: además del dominio polimerasa, estas proteínas pueden presentar otros dominios suplementarios, los cuales les pueden conferir actividades enzimáticas adicionales (actividad 3'-5' exonucleasa, 5'-3' exonucleasa, desoxirribosafosfato liasa, ATPasa, helicasa, primasa...) o permitir la interacción con diversas proteínas accesorias (dominio BRCT).
- El número de nucleótidos incorporados al extremo 3'OH del cebador por evento de unión al ADN: las enzimas que incorporan pocos nucleótidos se denominan distributivas, mientras que las que son capaces de incorporar un gran número de nucleótidos antes de disociarse del ADN se denominan procesivas.
- La preferencia de sustrato: las polimerasas presentan diferente grado de actividad dependiendo del tipo de sustrato. Algunas muestran preferencia por *gaps* de uno o pocos nucleótidos (β , λ ...), otras por ADN con amplias regiones de cadena sencilla como molde (δ , ϵ ...) y otras por ADN con lesiones (η , ι ...).
- La eficiencia con la que realizan la reacción de inserción de nucleótido.
- La fidelidad de síntesis: las ADN polimerasas presentan diferente grado de selectividad por el nucleótido complementario a la hebra molde. Para evitar cometer errores algunas polimerasas presentan actividad 3'-5' exonucleasa que les permite escindir el nucleótido recién incorporado si fuese incorrecto.

2.2.1 ADN polimerasas en tripanosomátidos.

La secuenciación del genoma de diversos tripanosomátidos ha permitido un mayor conocimiento de las vías de replicación y reparación de ADN en estos organismos. Actualmente son 16 las ADN polimerasas identificadas en tripanosomátidos, sin embargo muchas de ellas aún no han sido estudiadas. A continuación se relata brevemente los principales datos conocidos en relación con estas polimerasas.

Familia A.

Los tripanosomátidos carecen de ADN polimerasa γ (polimerasa encargada de la replicación y reparación del ADN mitocondrial en eucariotas). En su lugar, se ha demostrado la presencia en el kinetoplasto de 4 polimerasas tipo I (PolIA, PolIB, PolIC y PolID). Se ha sugerido que PolIA puede tener una función de reparación, mientras que PolIB, PolIC y PolID estarían implicadas en replicación (Klingbeil y cols., 2002). El silenciamiento de alguna de estas tres polimerasas conlleva la pérdida de ADN mitocondrial (minicírculos y maxicírculos), colapso del potencial de membrana mitocondrial y muerte celular (Bruhn y cols., 2010).

Familia X.

La primera ADN polimerasa descrita en tripanosomátidos fue la Pol β de *Crithidia fasciculata* (protozoo parásito de artrópodos), la cual presenta una localización mitocondrial (Torri y Englund, 1992; Torri y Englund, 1995). Posteriormente, estudios en *Trypanosoma brucei* determinaron la existencia de una segunda Pol β de mayor tamaño, la cual posee una región amino terminal rica en prolina, arginina y lisina, por lo que se ha denominado Pol β -PAK (Saxowsky y cols., 2003). Ambas polimerasas (Pol β y Pol β -PAK) poseen actividad dRP-liasa, pero se diferencian en las condiciones óptimas de polimerización y en la disposición que ocupan dentro de la mitocondria, lo que sugiere que puedan tener un distinto papel en el mantenimiento y replicación del ADN mitocondrial (Lopes y cols., 2008; Saxowsky y cols., 2003). Pol β podría estar implicada en la reparación por escisión de base de daños oxidativos (Schamber-Reis y cols., 2012). De igual modo, también se han realizado experimentos con la Pol β de *Leishmania infantum* confirmándose su actividad dRP liasa intrínseca y su capacidad de, en presencia de proteínas accesorias, completar *in vitro* el proceso de reparación por escisión de base (Alonso y cols., 2006). No obstante, en *L. infantum* al igual que en mamíferos y otros eucariotas superiores, Pol β presenta una localización nuclear por lo que su función debe ser la de reparar el ADN de este compartimento celular (Taladriz y cols., 2001).

Familia Y.

En tripanosomátidos se han descrito dos polimerasas de la familia Y: Pol η y Pol κ . El número de genes que codifican para estas proteínas varía entre las distintas especies de tripanosomátidos. Ambas polimerasas han sido estudiadas en *Trypanosoma cruzi*. Pol η presenta una localización nuclear, mientras que Pol κ se encuentra presente en el kinetoplasto. Al igual que en eucariotas superiores, Pol η podría actuar en la síntesis a

través de dímeros de pirimidina, puesto que se ha observado que su integración en levaduras RAD30 deficientes revierte la sensibilidad de las mismas a la luz UV. Por su parte Polk estaría implicada en reparación de roturas de doble hebra mediante recombinación homóloga. Ambas polimerasas podrían participar en diferente grado en la síntesis a través de lesiones oxidativas (de Moura y cols., 2009; Rajão y cols., 2009).

Familia RT.

Se ha estudiado la actividad telomerasa en *T. brucei*, *L. major* y *L. tarentolae*. Las propiedades de reconocimiento y elongación de cebador de las telomerasas de tripanosomátidos parecen seguir las reglas generales de las telomerasas de eucariotas superiores (Cano y cols., 1999).

2.3 Lesiones en el ADN.

La integridad del ADN está continuamente comprometida debido a la presencia de agentes genotóxicos tanto endógenos como exógenos. Entre los agentes endógenos (productos del metabolismo) se encuentran las especies reactivas de oxígeno, diversos agentes alquilantes y productos de la peroxidación lipídica. Por su parte, entre los agentes exógenos se encuentran la radiación UV, la radiación ionizante y múltiples productos químicos. Estos compuestos atacan el ADN generando diversos tipos de daños:

Daños oxidativos: pueden generar multitud de bases modificadas. Algunas de las más estudiadas son 8oxodG y timina glicol. La lesión 8oxodG tiene un marcado carácter mutagénico puesto que favorece la incorporación de dATP en lugar de dCTP induciendo transversiones G:T (Shibutani y cols., 1991). En cambio, la lesión timina glicol tiene un carácter principalmente citotóxico debido a que generalmente aparea con dATP, pero ejerce un fuerte bloqueo de la replicación (Aller y cols., 2007).

Daños alquilantes: al igual que en el caso anterior, los daños alquilantes pueden generar una gran variedad de bases modificadas. Algunas de ellas como N7-metilguanina se considera que no tienen efectos citotóxicos ni mutagénicos. Sin embargo, existen otras lesiones que sí poseen un efecto mutagénico (O6-metilguanina) o citotóxico (N3-metiladenina) (Shrivastav y cols., 2010).

Uniones intercatenarias: los agentes bifuncionales pueden establecer enlaces con dos bases de hebras opuestas a la vez. Esta interacción impide la separación de las hebras de ADN interfiriendo en procesos fundamentales como la replicación o la transcripción (Ho y Schärer, 2010).

Dímeros de pirimidina: se producen como consecuencia de la radiación UV. Las principales lesiones son los dímeros de pirimidina cis-sin ciclobutano (CPD) y los fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP). De estos daños el CPD es el más abundante, especialmente el formado entre dos timinas (Gonzalez-Púmariega y cols., 2009). Esta lesión produce un fuerte bloqueo de la síntesis para la mayoría de las ADN polimerasas (Johnson y cols., 2005).

Además de los daños producidos por agentes genotóxicos, la molécula de ADN presenta una inestabilidad intrínseca, lo que puede originar:

Cambios de nucleótidos: la desaminación espontánea puede suponer la conversión de una base en otra, por ejemplo la citosina al desaminarse da lugar a uracilo. Esta modificación puede ocasionar la alteración de la información genética.

Pérdida de bases: la hidrólisis espontánea de un enlace glicosídico conlleva la aparición de un sitio abásico, lo que puede suponer la pérdida de información genética.

2.4 Mecanismos de reparación del ADN.

Para poder garantizar la estabilidad genómica, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos encargados de reparar el ADN cuando sea necesario. Cada uno de los sistemas está especializado en un tipo de lesión:

Reparación directa: devuelve las estructuras originales a los nucleótidos modificados sin necesidad de remplazarlos. Un ejemplo de este tipo de reparación es la fotorreactivación de los dímeros de pirimidinas inducidos por luz UV. La enzima fotoliasa, presente en bacterias y algunos eucariotas, emplea la energía luminosa para romper las uniones covalentes entre las pirimidinas, volviendo estas a su forma monomérica (Benjamin, 2010). Otro tipo de reparación directa del ADN es la reversión de la alquilación de las bases mediante las alquiltransferasas. Las lesiones del ADN O6-metilguanina y O6-etilguanina son reparadas por la O6-alquilguanina-ADN

alquiltransferasa, la cual transfiere el grupo metilo o etilo causante de la modificación de la base a uno de sus propios residuos de cisteína (Voet y cols., 2007).

Reparación por escisión de base (BER): es el principal mecanismo de reparación de nucleótidos cuyas bases nitrogenadas han sido modificadas como consecuencia de un daño oxidativo, alquilante o por desaminación. También permite la reparación de aquellos nucleótidos en los que se haya perdido la base debido a hidrólisis espontánea. Existen dos vías de reparación por escisión de base: de trecho corto (*Single Nucleotide Base Excision Repair*; SN-BER) y de trecho largo (*Long Patch Base Excision Repair*; LP-BER). En SN-BER se produce la escisión y reemplazamiento de un único nucleótido, mientras que en LP-BER son 2-13 los nucleótidos sustituidos.

SN-BER: la ruta comienza con el reconocimiento de la base modificada por la ADN glicosilasa correspondiente, la cual cataliza la ruptura del enlace N-glicosídico promoviendo la eliminación de la base. A continuación pueden actuar una AP-endonucleasa o una AP-liasa. Si es una AP-endonucleasa la que actúa, ésta realiza un corte en posición 5' con respecto al sitio abásico, generándose de esta forma un residuo 3' hidroxilo y un residuo 5' desoxirribosafosfato (5' dRP). A continuación una ADN polimerasa con actividad dRP-liasa escinde el residuo 5' dRP originando un *gap* de un nucleótido que es rellenado por la propia polimerasa. Por último, la ADN ligasa sella la unión. Si por el contrario es una AP-liasa la que actúa tras la acción de la glicosilasa (o es una glicosilasa bifuncional, es decir con actividad glicosilasa y AP-liasa), se produce un corte en posición 3' con respecto al sitio abásico. A continuación actúa una AP-endonucleasa generando un *gap* de un nucleótido al realizar un corte en 5' con respecto al sitio abásico. Este *gap* es rellenado por una ADN polimerasa y finalmente la ligasa completa el proceso de reparación. En esta segunda vía de SN-BER no se genera un residuo dRP, por lo que no se requiere una ADN polimerasa con actividad dRP-liasa.

LP-BER: el inicio de esta vía de reparación es idéntico al de SN-BER. Tras la escisión de una base dañada por la acción de la ADN glicosilasa se produce un corte en 5' con respecto al sitio abásico por la acción de una AP-endonucleasa, generándose un residuo 3' hidroxilo y un residuo 5' dRP. Si éste residuo dRP se encuentra modificado (oxidado o reducido) y no puede ser escindido por la actividad dRP-liasa, se produce una síntesis de nucleótidos asociada a desplazamiento de banda (desplazamiento de la cadena de ADN situada en posición 3' del *nick*). Posteriormente, la endonucleasa FEN-1 escinde la cadena sencilla de ADN desplazada, generándose un sustrato adecuado para la acción

de la ligasa. Esta vía de reparación por tanto tampoco requiere la presencia de actividad dRP-liasa.

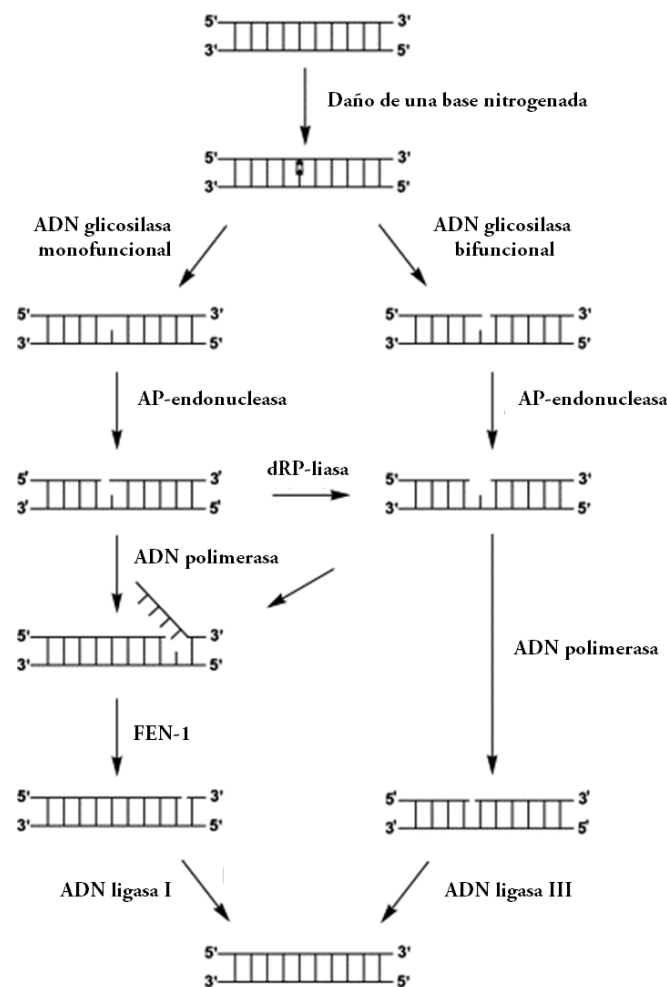


Figura 6. Reparación por escisión de base (BER). La reparación por escisión de base puede ser iniciada por una glicosilasa monofuncional o bifuncional. Si actúa una glicosilasa bifuncional, tras eliminar la base dañada, realiza un corte en posición 3' con respecto al sitio abásico. Posteriormente una AP-endonucleasa realiza un corte en posición 5' del sitio abásico, generándose un *gap* de un nucleótido que es rellenado por una ADN polimerasa. La ADN ligasa III es la encargada de sellar el *nick*. Si por el contrario es una ADN glicosilasa monofuncional la que actúa en primer lugar eliminando la base dañada, la acción posterior de la AP-endonucleasa genera un residuo 5' dRP. Si este residuo es eliminado por una ADN polimerasa con actividad dRP-liasa, se genera un *gap* de un nucleótido y el proceso de síntesis de ADN y ligación continúa como se describió anteriormente. Si el residuo dRP no puede ser eliminado, se lleva a cabo la polimerización asociada con desplazamiento de banda. Posteriormente FEN-1 elimina la cadena de ADN desplazada. El proceso finaliza tras la ligación realizada por la ADN ligasa I.

Reparación de apareamientos erróneos (MMR): Esta vía de reparación permite eliminar aquellos nucleótidos que han sido erróneamente incorporados por las polimerasas. Además, también se ha relacionado con la regulación del proceso de recombinación homóloga, al impedir que éste se lleve a cabo entre moléculas cuya secuencia difiera. En eucariotas, el heterodímero MSH2-MSH6 es el encargado de reconocer los apareamientos incorrectos así como las inserciones y deleciones de pequeño tamaño (1-2 nucleótidos), mientras que el heterodímero MSH2-MSH3 reconoce preferentemente inserciones y deleciones de mayor tamaño. Tras la unión a la lesión de uno de estos dos complejos de reconocimiento, se produce el reclutamiento del heterodímero MLH1-PMS2. La presencia de pequeños *nicks* en la hebra recién sintetizada parece ser la señal que determina que la reparación se lleve a cabo en dicha hebra. MLH1-PMS2 posee actividad endonucleasa dependiente del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el factor de replicación C (RFC). Si existe un *nick* próximo a la lesión en posición 5', la enzima Exo1 (exonucleasa 5'-3') inicia la eliminación de la hebra recién sintetizada. Si por el contrario el *nick* más próximo a la lesión está situado en 3' con respecto a ella, MLH1-PMS2 produce un corte en posición 5' de la lesión, permitiendo nuevamente la actividad de Exo1. La proteína de replicación A (RPA) protege el ADN de cadena simple durante la escisión y facilita la resíntesis de ADN, llevada a cabo por la polimerasa delta. El proceso finaliza tras la ligación realizada por la ADN ligasa I.

Reparación por escisión de nucleótidos (NER): Este sistema de reparación está implicado en la eliminación de lesiones voluminosas que distorsionan la doble hélice de ADN. Existen dos subtipos de NER: "Global Genome Repair" (GG-NER) que es el encargado de reparar las lesiones producidas a lo largo de todo el genoma y "Transcription-Coupled Repair" (TC-NER) que está especializado en la reparación de aquellas cadenas de ADN que han iniciado el proceso de transcripción (Hanawalt, 2002). La principal diferencia entre ambos subtipos de NER radica en las proteínas implicadas en el reconocimiento de la lesión. TC-NER es activado tras el bloqueo de la translocación de la ARN polimerasa II en el sitio dañado, que inducirá el reclutamiento de las proteínas CSA y CSB (van den Boom y cols., 2004) mientras que GG-NER es activado por factores especializados en el reconocimiento de daño, como por ejemplo las proteínas de unión a ADN dañado por luz UV, UV-DBB1 y UV-DBB2 (Tang y cols., 2000) o el heterodímero XPC-RAD23B (Reardon y cols., 1996). Los siguientes pasos son llevados a cabo por un conjunto de factores comunes a los dos subtipos de NER e implican el desenrollamiento de la doble hebra de ADN alrededor de la lesión por el complejo TFIIH (Schaeffer y cols., 1994) seguido de dos incisiones en la hebra que contiene la lesión por dos

endonucleasas específicas: ERCC1-XPF y XPG. Estas incisiones realizadas en posición 5' (ERCC1-XPF) y 3' (XPG) con respecto a la lesión, dan como resultado la liberación de un fragmento de ADN de 24-32 nucleótidos. El *gap* generado es rellenado por una ADN polimerasa (δ , ϵ , κ) en presencia de PCNA y RFC. Por último, el fragmento es sellado por la ADN ligasa III-XRCC1 o la ADN ligasa I.

Reparación de rotura de doble hebra: Las roturas de doble hebra (*Double Strand Break*; DSB) suponen un grave problema para las células, pudiendo provocar realineamientos del genoma y muerte celular. Existen dos mecanismos principales en la reparación de DSB: recombinación homóloga (*Homologous Recombination*; HR) y unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining*; NHEJ). Mientras que HR permite la restauración de los dos fragmentos de ADN afectados por DSB de un modo libre de errores, el mecanismo de NHEJ implica la pérdida o ganancia de nucleótidos.

Recombinación homóloga (HR): Tras la rotura de ADN de doble hebra se produce la activación de la ATM quinasa, la cual a su vez activa a un grupo de exonucleasas que generan extremos 3' protuberantes en ambos fragmentos de ADN. La proteína Rad51 interacciona con las hebras simples de ADN de dichos extremos para formar un filamento nucleoproteico. Rad51 media en el reconocimiento de la secuencia homóloga y la invasión de la cromátida hermana, generando una estructura con forma de X denominada unión de Holliday. Tras dicha invasión, se forma un heterodúplex de ADN en la región complementaria, dando lugar a un lazo D (*Displacement loop*). A continuación se produce la extensión del extremo 3' protuberante utilizando como molde la secuencia complementaria en el segmento de ADN homólogo no dañado. Una vez se ha iniciado la síntesis, el proceso de HR puede seguir tres rutas diferentes:

DSBR (*Double Strand Break Repair*): el extremo 3' de la hebra de ADN invasora que está siendo polimerizado, puede unirse con el extremo 5' del otro fragmento de ADN afectado por la rotura, estabilizando el lazo D y dando lugar a la generación de una doble unión de Holliday (dHJ) (Szostak y cols., 1983). Esta dHJ puede ser resuelta dando lugar a productos entrecruzados o no entrecruzados o disolverse dando lugar exclusivamente a productos no entrecruzados.

SDSA (*Synthesis-Dependent Strand-Annealing*): la hebra invasora tras ser extendida puede ser desplazada del lazo D, volviendo a su posición original, hibridando con la cadena que no invade y sirviéndole como molde para el sellado del *gap* (Nassif y cols., 1994).

BIR (*Break-Induced Replication*): la estructura del lazo D no se estabiliza mediante alineamiento con la cadena no invasora y la extensión del extremo 3' invasor continúa hasta el final de la molécula. Este proceso es activado sobre todo cuando hay sólo un extremo de ADN, ya sea debido a la pérdida del otro extremo o en el proceso de alargamiento de telómeros en células deficientes en telomerasa (Malkova y cols., 1996).

Unión de extremos no homólogos (NHEJ): Tras producirse la rotura de doble hebra, la proteína heterodimérica Ku (Ku70/Ku80) se une a los extremos de ADN, previniendo su degradación nucleolítica. El complejo Ku-ADN recluta a la polinucleótido kinasa dependiente de ADN (ADN-PK), la cual desplaza a la proteína Ku hacia el interior de la hebra de ADN. Las dos moléculas de ADN-PK, una en cada fragmento de ADN dañado, pueden interactuar a través de la rotura de doble hebra formando un "puente" entre los dos extremos de ADN (DeFazio y cols., 2002). Como paso previo a la ligación puede ser necesario el procesamiento de dichos extremos de ADN mediante actividades nucleasa y polimerasa. Las moléculas de ADN-PK pueden reclutar a la proteína Artemis, la cual posee una actividad exonucleasa 5'-3' propia, pero que tras activación por ADN-PK, adquiere además capacidad exonucleasa 3'-5' (Ma y cols., 2002). Además, una vez activada, Artemis es capaz de cortar endonucleolíticamente una gran variedad de protuberancias de ADN dañado (Ma y cols., 2005). El procesamiento de los extremos puede dar lugar a *gaps* que serán rellenados por polimerasas. Pol μ y Pol λ , ambas pertenecientes a la familia X, han sido implicadas en el proceso. Estas proteínas pueden unirse a los complejos Ku-ADN por medio de sus dominios BRCT, localizados en la porción N-terminal de cada polimerasa. Pol μ es especialmente apropiada debido a su capacidad de síntesis independiente de molde que podría promover la aparición de secuencias complementarias (Ma y cols., 2004). No obstante, en caso de no estar presentes ninguna de las dos, podrían participar otras polimerasas (Bertocci y cols., 2006). Finalmente, el proceso de reparación termina con la ligación de los extremos mediante el complejo X4-L4 que comprende a la ligasa IV (Grawunder y cols., 1997).

Alt-NHEJ: Se ha observado que en ausencia de los principales factores implicados en NHEJ como Ku o ligasa IV, la capacidad de reparación de DSB se mantiene. La vía que opera en esas condiciones se ha denominado "Alternative-NHEJ". A diferencia de la vía clásica, este mecanismo tiende a producir deleciones mayores en los extremos afectados por DSB y se ha relacionado con fenómenos de translocación (Neal y Meek, 2011).

2.5 Mecanismo de tolerancia al daño: síntesis a través de lesión (TLS).

A pesar de los diferentes mecanismos de reparación que existen, cabe la posibilidad de que la maquinaria de replicación se encuentre con alguna lesión durante el proceso de duplicación del ADN. Si esto ocurriese, las ADN polimerasas replicativas (Pol δ y Pol ϵ) podrían verse bloqueadas debido a que estas enzimas precisan de una correcta geometría en el apareamiento de bases para llevar a cabo la polimerización. Con el fin de evitar que se produzca una parada de la horquilla de replicación, los organismos poseen unas polimerasas denominadas polimerasas de síntesis a través de lesión (*TransLesion Synthesis; TLS*), especializadas en llevar a cabo la síntesis de ADN empleando nucleótidos modificados como molde. De este modo, al alcanzar la horquilla de replicación la base dañada y producirse el bloqueo de la polimerasa replicativa, ésta es sustituida por una polimerasa de TLS, la cual realiza la síntesis de ADN a través de la región dañada. Tras haberse superado la lesión, la polimerasa replicativa reemplaza de nuevo a la polimerasa de TLS, continuando con el proceso de replicación. Determinadas lesiones pueden requerir la actuación de dos polimerasas de TLS, una para realizar la inserción de un nucleótido frente al ADN dañado y la otra para llevar a cabo la extensión a partir del nucleótido insertado previamente. Tras realizar la extensión, esta segunda polimerasa de TLS sería nuevamente sustituida por la polimerasa replicativa. El intercambio entre las distintas polimerasas puede estar mediado por proteínas accesorias como son PCNA o el complejo 9-1-1 que actuarían facilitando el acceso al ADN a dichas polimerasas. También se ha propuesto un segundo modo de acción de las polimerasas de TLS no asociado a la horquilla de replicación, sino a la síntesis en *gap*. En este segundo modelo no se produciría ningún intercambio entre polimerasas, puesto que solo estaría presente la polimerasa de TLS. El papel de PCNA y el complejo 9-1-1 en este modelo de síntesis, es incierto.

Las polimerasas de TLS son distributivas y poseen un grado de fidelidad menor que las polimerasas de replicación, debido en parte a que carecen de dominio 3'-5' exonucleasa que les permita eliminar el nucleótido insertado si éste fuese incorrecto. Muchas ADN polimerasas de TLS se engloban en la familia Y (Pol η , Pol ι , Pol κ , REV1), las cuales se caracterizan por presentar un dominio accesorio (PAD), unos subdominios "dedos" y "pulgar" de pequeño tamaño y una conformación relajada de su centro activo. No obstante, existen otras polimerasas no pertenecientes a esta familia que también se han relacionado con TLS, como Pol ζ (familia B), Pol ν (familia A) o Pol θ (familia A). A pesar de

que pueden ser varias las polimerasas de TLS que sean capaces de superar un determinado daño, parece existir cierto grado de especificidad entre el tipo de lesión y la polimerasa de TLS encargada de replicarlo.

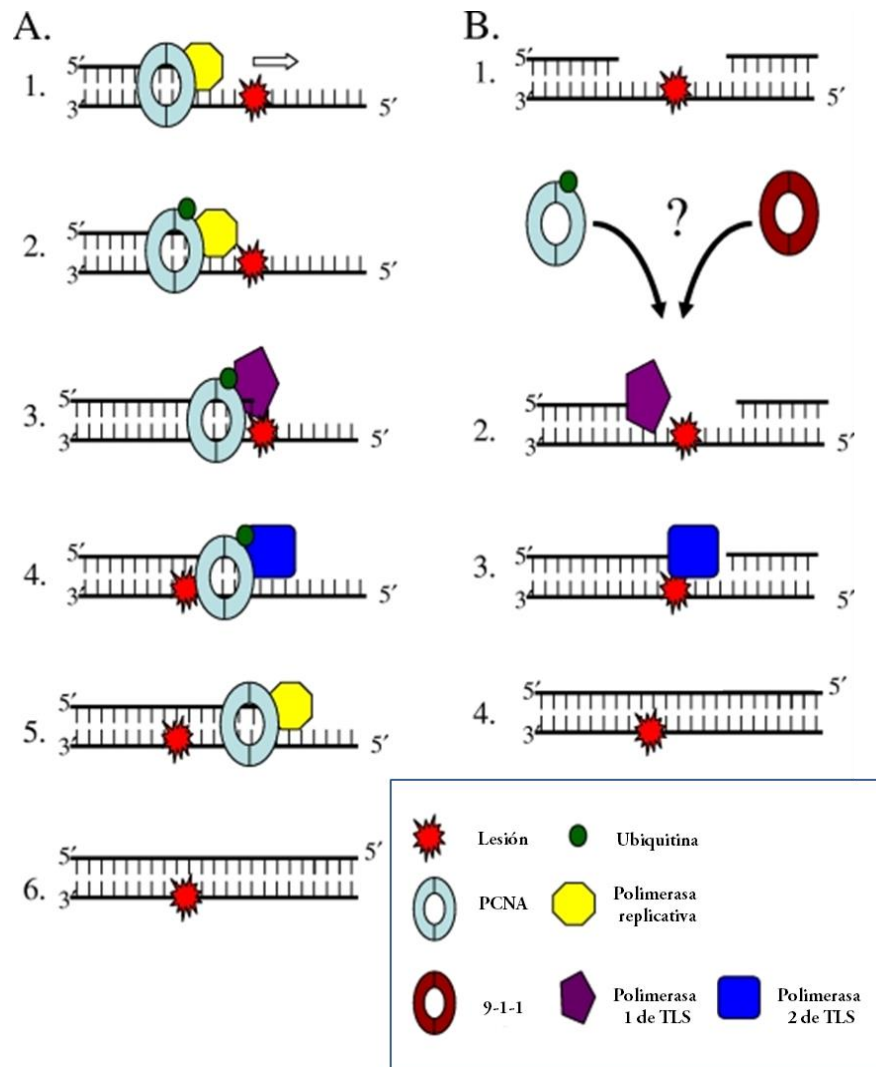


Figura 7. Síntesis a través de lesión. A. Modelo de TLS en horquilla de replicación. Tras alcanzar la horquilla de replicación un daño, se produce la ubiquitinación de PCNA. Este proceso parece ser relevante para que se produzca el intercambio entre la polimerasa replicativa y de TLS. Tras haberse superado la lesión, la polimerasa replicativa continúa con el proceso de replicación. **B.** Modelo de TLS en *gap*. En este modelo están implicadas solamente polimerasas de TLS, las cuales se encargarían de rellenar el *gap*. Figura adaptada de Waters y cols., 2009.

2.6 Reparación de lesiones complejas: acción coordinada de mecanismos de reparación y TLS.

En algunas ocasiones se requiere la acción combinada de varias vías para la reparación de un determinado tipo de daño, como es el caso de las uniones intercatenarias (interstrand crosslink; ICL), las cuales son inducidas por un gran número de agentes bifuncionales anticancerígenos como el cisplatino, la mitomicina C o el nitrógeno mostaza, así como por agentes endógenos formados por peroxidación lipídica (Ho y Schärer, 2010). Estas lesiones son particularmente citotóxicas, puesto que impiden la separación de las hebras de ADN, imposibilitando procesos esenciales como la transcripción y la replicación. Aunque el modo de procesamiento y reparación de los ICL sigue sin comprenderse por completo, se ha propuesto que requiera la participación de la vía NER así como de la acción de una o varias ADN polimerasas de TLS (Ho y Schärer, 2010). Según este modelo, se produciría una doble incisión flanqueando el ICL en una de las hebras. El oligonucleótido generado por las incisiones, que permanece unido a la hebra molde por medio del ICL, debe poseer suficiente movilidad para poder ser desplazado por una ADN polimerasa durante la síntesis del *gap*. Es posible que el oligonucleótido sea procesado por exonucleasas como paso previo a la acción de la ADN polimerasa, incrementando así las posibilidades de superación de la lesión. Tras la síntesis del *gap* por parte de la ADN polimerasa de TLS, la hebra restaurada servirá de molde para la reparación mediante NER de la hebra complementaria (Ho y Schärer, 2010; Minko y cols., 2008).

2.7 Mecanismo de reparación del ADN y tolerancia al daño en tripanosomátidos.

Reparación directa: en el genoma de los diferentes tripanosomátidos se encuentran anotados los genes que codifican para las enzimas O6-metilguanina metiltransferasa y AlkB, por lo que es probable que puedan llevar a cabo la reparación directa de daño alquilante. Del mismo modo, también se encuentra anotado el gen que codifica para la enzima fotoliasa, por lo que la vía de reversión directa de dímeros de timina puede estar también presente. No obstante, todavía ninguna de estas dos actividades ha sido descrita.

Reparación por escisión de base (BER): los tripanosomátidos, a diferencia de los mamíferos, parecen carecer de la proteína ligasa III, principal ADN ligasa implicada en SN-BER. Sin embargo, poseen un homólogo de la ADN ligasa I (implicada en LP-BER), por

lo que es posible que, al igual que ocurre en plantas (Córdoba-Cañero y cols., 2009), sea esta enzima la que en tripanosomátidos realice el paso final de sellado de la cadena de ADN tanto en SN-BER como en LP-BER. En *L. infantum* se ha descrito la participación de Pol β en el proceso de SN-BER (Alonso y cols., 2006).

Reparación por escisión de nucleótido (NER): el genoma de tripanosomátidos contienen la mayoría de los componentes de NER, pero los mecanismos bioquímicos de esta vía pueden presentar algunas diferencias menores con respecto a los eucariotas superiores. Algunos genes se encuentran duplicados en tripanosomátidos como por ejemplo XPB y DBB1 y sin embargo otros como XPA no han sido identificados. Del mismo modo el complejo TFIIH de tripanosomátidos muestra algunas características propias no compartidas con el de levaduras y mamíferos (Lee y cols., 2009). Sin embargo, la diferencia principal posiblemente sea la importancia relativa de los dos subtipos de NER. En eucariotas superiores la vía más empleada es GG-NER. En cambio, en tripanosomátidos, al presentar una expresión constitutiva de los genes codificantes de proteínas, la vía de TC-NER debe constituir el mecanismo de reparación predominante.

Reparación de apareamientos erróneos (MMR): los tripanosomátidos codifican un grupo de proteínas implicadas en MMR, lo que sugiere que son competentes para el reconocimiento y reparación de errores por esta vía. En *T. cruzi* se ha llevado a cabo la caracterización del gen MSH2 (Augusto-Pinto y cols., 2001), habiéndose observado que además de su papel en MMR, participa en la respuesta a daño oxidativo de un modo independiente de MMR (Machado-Silva y cols., 2008). En *T. brucei* también se ha realizado el estudio de MSH2 junto con MLH1. Mutaciones en ambos genes dan lugar a inestabilidad de microsatélites e incremento en la tolerancia al agente alquilante MNNG (Bell y cols., 2004), ambos fenotipos consistentes con un defecto en actividad nuclear de MMR (Schofield y Hsieh, 2003). Del mismo modo, dobles mutantes en MSH2 y MLH1 muestran una frecuencia mayor de HR tanto en moléculas homólogas como en moléculas con secuencia divergente (Bell y McCulloch, 2003). Estos resultados indican que el MMR en tripanosomátidos es activo en reparación de errores que surgen durante la replicación, en respuesta al daño químico y en la regulación de HR.

Recombinación homóloga (HR): la recombinación homóloga es la mayor vía de reparación en eucariotas inferiores (Bhattacharyya y cols., 2004). En tripanosomátidos se han identificado los componentes esenciales de este mecanismo. En *L. major* y *T. cruzi* se ha observado que la expresión de RAD51 se ve inducida por agentes causantes

de DSB (McKean y cols., 2001; Regis-da-Silva y cols., 2006). Además en *T. cruzi* se ha comprobado que la sobreexpresión de RAD51 confiere una mayor capacidad de reparación de estos daños (Regis-da-Silva y cols., 2006). Asimismo, estudios en *T. brucei*, han demostrado que el mecanismo de HR además de estar relacionado con la reparación de DSB (Glover y cols., 2008), está implicado en la capacidad del parásito de evadir el sistema inmune del hospedador, al participar en el mecanismo de expresión de las distintas proteínas de superficie VSG (Machado y cols., 2006).

Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ): Esta es la única vía de reparación que parece estar ausente en tripanosomátidos. De todas las proteínas implicadas en este mecanismo en otros organismos, solo Ku70 y Ku80 están conservadas. Estas proteínas se han asociado a mantenimiento de telómeros (Conway y cols., 2002; Janzen y cols., 2004), una función que realizan de manera independiente a NHEJ en eucariotas superiores (Williams y Lustig, 2003). A pesar de carecer de las proteínas fundamentales para el desarrollo de NHEJ, no se puede descartar que en tripanosomátidos los componentes catalíticos difieran con respecto a eucariotas superiores (por ejemplo empleando una ADN ligasa diferente). No obstante, estudios realizados con mutantes nulos en Ku70 y Ku80 de *T. cruzi* no muestran una mayor sensibilidad a agentes causantes de DSB (Conway y cols., 2002), lo que parece indicar que, en caso de existir, la vía de reparación de NHEJ tendría un papel minoritario en tripanosomátidos.

Tolerancia al daño: los tripanosomátidos presentan todas las polimerasas implicadas en síntesis a través de lesión, a excepción de Pol ι y Pol ν (tabla 1). De igual modo, también se ha detectado en estos parásitos la presencia de PCNA (Kumar y cols., 2009). Por todo ello, el proceso de síntesis a través de lesión debe actuar también en tripanosomátidos como mecanismo de tolerancia al daño.

2.8 ADN polimerasa theta.

La ADN polimerasa theta (Pol θ) es una polimerasa perteneciente a la familia A, de localización nuclear (Pang y cols., 2005), que está constituida por un dominio helicasa en el extremo N-terminal, una región espaciadora central y un dominio polimerasa en C-terminal (Harris y cols., 1996; Seki y cols., 2003). Pol θ carece tanto de actividad exonucleasa correctora 3'-5' (propia de enzimas replicativas), como de actividad

exonucleasa 5'-3' y su actividad helicasa aún no ha sido demostrada. Esta polimerasa se encuentra presente en protistas, animales y plantas. Sin embargo, algunas diferencias observadas entre las distintas Pol θ , tanto a nivel estructural como a nivel funcional, plantean la duda de si se tratan de verdaderos ortólogos (Yousefzadeh y Wood, 2013). Estructuralmente las principales diferencias entre las distintas Pol θ son: la presencia del dominio helicasa (está ausente en algunos eucariotas inferiores), la longitud de la región central (varía entre 800 y 1600 aminoácidos según la especie) y la presencia y/o longitud de 3 inserciones de secuencias entre motivos conservados del dominio polimerasa. Actualmente no se dispone de la estructura cristalina de ninguna Pol θ que permita predecir cómo pueden afectar estas diferencias estructurales a la funcionalidad del enzima. No obstante, el modelado comparativo a partir de otras polimerasas de la familia A, junto con experimentos realizados con diferentes mutantes de la Pol θ humana, sugieren que las inserciones de secuencia en el dominio polimerasa pueden ser relevantes para las características funcionales de la proteína (Hogg y cols., 2011; Seki y cols., 2004).

Pol θ fue identificada inicialmente en *Drosophila melanogaster* a partir del estudio del gen Mus308 (Harris y cols., 1996). Los individuos que presentaban mutaciones en dicho gen, mostraban hipersensibilidad a agentes causantes de uniones intercatenarias (ICL) en el ADN, mientras que su susceptibilidad a metilmetanosulfonato era normal, lo que sugería que este gen estaba implicado específicamente en la reparación de ICL (Boyd y cols., 1990; Harris y cols., 1996). Estudios desarrollados en *Caenorhabditis elegans* corroboran la implicación de Pol θ en reparación de ICL (Muzzini y cols., 2008) y sugieren además su participación en el mecanismo de reparación por escisión de base (Asagoshi y cols., 2011). Sin embargo, ensayos realizados en células DT40 de pollo establecen un papel de Pol θ relacionado con la resistencia al daño oxidativo (mediante síntesis a través de lesiones y reparación por escisión de base), pero no a ICL (Yoshimura y cols., 2006). En células de ratón algunos autores han explorado la posibilidad de que Pol θ participase en generación de variabilidad en el sistema inmune y/o en reparación de roturas de doble hebra. Aunque inicialmente se pensaba que Pol θ estaba implicada en la hipermutación somática de los genes de las inmunoglobulinas (Masuda y cols., 2005; Zan y cols., 2005), estudios posteriores parecen indicar que su participación en SHM, si la tiene, es minoritaria (Martomo y cols., 2008). Del mismo modo, Pol θ tampoco parece tener un papel significativo en la variabilidad de los genes de inmunoglobulinas mediante recombinación de cambio de isotipo (Li y cols., 2011). Por el contrario, sí parece estar implicada en reparación de roturas de doble hebra (DSB) puesto que se ha observado que células deficientes en esta polimerasa muestran hipersensibilidad a

distintos agentes causantes de DSB como radiación gamma, etopósido o bleomicina (Li y cols., 2011). El mecanismo mediante el cual Pol θ protege frente a roturas de doble hebra todavía no se conoce, aunque estudios en *D. melanogaster* sugieren su participación en la unión de extremos no homólogos (NHEJ), una de las vías junto con la recombinación homóloga de reparación de DSB (Chan y cols., 2010; Yu y McVey, 2010).

Actualmente la única Pol θ que ha sido expresada y purificada como proteína recombinante es la humana (*hPol θ*), por lo que se trata de la más estudiada. Esta polimerasa muestra una baja fidelidad de síntesis (Arana y cols., 2008; Seki y cols., 2003) y elevada capacidad de polimerización a través de lesiones. *hPol θ* es capaz de replicar frente a sitios abásicos o timina glicol, no solo insertando un nucleótido frente a estas lesiones, sino realizando también la extensión del nucleótido incorporado (Seki y cols., 2004). A pesar de no ser capaz por sí misma de superar lesiones producidas por luz UV como CPD o 6-4PP (Seki y cols., 2004), *hPol θ* puede realizar cierta extensión de los nucleótidos incorporados frente a ellas por otras polimerasas (Seki y Wood, 2008). De igual modo puede llevar a cabo de forma eficiente la extensión de extremos desapareados (Seki y Wood, 2008). Se ha descrito también que posee actividad desoxirribosa fosfato liasa y es capaz de llevar a cabo *in vitro* la reparación por escisión de base de trecho corto (Prasad y cols., 2009). En seres humanos se ha detectado la sobre-expresión de *hPol θ* en células tumorales, especialmente en cáncer colorrectal (Kawamura y cols., 2004) y de mama (Lemée y cols., 2010) asociándose a un peor pronóstico.

En *L. infantum* se ha detectado la sobre-expresión del gen que codifica *LiPol θ* en promastigotes metacíclicos con respecto a los promastigotes procíclicos, lo que podría indicar un posible papel de la polimerasa *LiPol θ* en el establecimiento de la infección (Alcolea y cols., 2009).

2

Objetivos

La ADN polimerasa θ es una de las polimerasas de más reciente descubrimiento. En los últimos años se ha llevado a cabo su estudio en diferentes organismos, sin embargo los resultados obtenidos acerca de su posible función han sido contradictorios. Este hecho ha llevado a plantear la cuestión de si las ADN polimerasas θ de los distintos organismos son verdaderos ortólogos.

Los tripanosomátidos constituyen un grupo de protozoos parásitos que divergieron muy tempranamente del tronco evolutivo de los eucariotas, por lo que presentan una serie de características propias en los mecanismos de replicación y reparación del ADN. En *Leishmania infantum*, a partir de la secuenciación de su genoma, se ha identificado un gen que codifica para la ADN polimerasa θ .

El objetivo general de esta Tesis doctoral es la identificación del papel desempeñado por la ADN polimerasa θ en el parásito *L. infantum*. Con ese fin se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Determinación de la localización subcelular de *LiPol θ* y sus niveles de expresión a lo largo del ciclo del parásito.
- 2- Caracterización bioquímica de *LiPol θ* y estudio de su posible función en síntesis a través de lesiones.
- 3- Determinación del papel fisiológico de *LiPol θ* .

3

Materiales y métodos

1. Cultivo de células.

1.1 Parásitos.

Las cepas de *Leishmania* utilizadas en los experimentos de esta Tesis doctoral fueron: *Leishmania infantum* M/CAN/ES/98/10445 (zimodema MON-1) y *Leishmania major* LV39 clone 5 (Rho/SU/59P). Los cultivos axénicos de promastigotes de *L. infantum* empleados en el análisis del nivel de expresión y localización subcelular de la proteína LiPol θ se mantuvieron en medio completo: RPMI 1640, L-glutamina 2mM, Hepes 25 mM con 10% suero bovino fetal inactivado a 56 °C durante 60 min y un combinado de antibióticos penicilina 100U/ml-estreptomicina 100 μ g/ml. Los cultivos axénicos de promastigotes de *L. major* empleados en los ensayos de proliferación celular e infectividad, se mantuvieron en medio 199 suplementado con 20% suero bovino fetal inactivado. En el caso de promastigotes transfectados con la construcción pTEX-LiPol θ se añadió 100 μ g/ml de geneticina al medio. Los promastigotes de ambas especies de *Leishmania* fueron cultivados a 27 °C.

1.2 Bacterias.

Para la amplificación y posterior purificación de los vectores de expresión y sus derivados, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (*supE 44 Dlac U169 ϕ 80lacZ DM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Las células transformadas portadoras de los plásmidos recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina (100 μ g/ml). Para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes se empleó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS [B F⁻ dcm ompT hsdS(*r_B⁻ m_B⁻*) gal λ (DE3)[pLysS Cam^r]. Las células transformadas portadoras de los plásmidos recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina (100 μ g/ml) y cloranfenicol (35 μ g/ml). Todas las bacterias fueron cultivadas en medio LB (170 mM NaCl, 1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, pH = 7.2) a excepción de las bacterias BL21(DE3)pLysS transformadas con la construcción pMAL-c2, las cuales se crecieron en medio LB con 0,2% glucosa.

1.3 Levaduras.

Para los ensayos de expresión de proteína en levadura se empleó la cepa de *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) que fue cedida por la Dra. María Jesús Martínez (Centro de Investigaciones Biológicas; CSIC). Esta cepa fue mantenida en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% D-glucosa).

1.4 Línea macrofágica de ratón.

Macrófagos de la línea monocítica RAW 264.7 procedentes de la cepa de ratón BALB/c fueron cultivados a 37 °C en atmósfera 5% CO₂ y en el mismo medio descrito para promastigotes de *L. infantum* (ver más arriba).

2. Generación y transformación de bacterias competentes.

2.1 Generación y transformación de bacterias electrocompetentes.

Para la obtención de bacterias *E. coli* DH5α electrocompetentes, se inocularon 500 ml de medio 2XYT (1.6% bacto triptona, 1% extracto de levadura, 0.5% NaCl, pH 7.0) con 10 ml de preinóculo crecido durante la noche a partir de una única colonia. El cultivo se incubó a 37 °C en agitación hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6-0.9, momento en el que se centrifugó a 4000g durante 20 min a 4 °C en 2 botellas de 250 ml preenfriadas. Se descartó el sobrenadante y se lavó cada sedimento con 200 ml de agua Milli-Q a 4 °C. A continuación, se volvió a lavar cada sedimento con 100 ml de agua Milli-Q y posteriormente con 20 ml de agua-10% glicerol. Se juntaron los 2 sedimentos y se centrifugó una vez más a 4000g durante 10 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua-10% glicerol y fue almacenado en alícuotas de 70 µl a -80 °C.

La transformación de bacterias DH5α electrocompetentes se realizó con 5 µl de producto de ligación previamente dializados durante 30 min frente a agua Milli-Q (membranas Millipore). El pulso (4,7 ms y 1,8 kV) se llevó a cabo con el electroporador "MicroPulser" (Bio-Rad, Estados Unidos). A continuación se añadió 1 ml de LB a las bacterias y se incubaron a 37 °C durante 45 min, tras lo cual se sembraron en LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina (los vectores pRSET C, pPIC9, pMAL-c2 y pTEX, poseen el gen de resistencia a ampicilina).

2.2 Generación y transformación de bacterias quimiocompetentes.

Para la obtención de bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS quimiocompetentes se inocularon 100 ml de LB en presencia de cloranfenicol (35 µg/ml), con 1 ml de preinóculo crecido a partir de una única colonia. El cultivo se dejó crecer a 37 °C en agitación hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0.5, momento en el que se centrifugó a 2000g durante 20 min a 4

°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de CaCl₂ 50 mM a 4 °C. Se incubaron las bacterias 30 minutos en hielo y se volvieron a centrifugar a 2000g durante 10 min a 4 °C. De nuevo se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 50 mM, 10% glicerol. Finalmente las bacterias se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 100 µl.

Para llevar a cabo la transformación se añadió 1 µl de ADN plasmídico (100 ng) o 5 µl de producto de ligación a una alícuota de 100 µl de bacterias quimiocompetentes. Tras 30 minutos en hielo, se incubaron las bacterias 45 segundos a 42 °C y de nuevo 2 minutos en hielo. Posteriormente se les añadió 1ml de medio LB y se dejaron crecer 1 hora a 37 °C tras lo cual se sembraron en LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina y 35 µg/ml cloranfenicol.

3. Clonaje del gen de la ADN polimerasa θ de *L. infantum*.

3.1 Purificación de ácidos nucleicos de *Leishmania*.

La extracción del ADN genómico se basó en el procedimiento descrito por Sambrook y cols., 1989. A partir de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria se recogieron 2×10^9 células mediante centrifugación a 2000g durante 10 min a 4 °C. Tras tres lavados con PBS, se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 M EDTA pH 8.0, 2% SDS, 20 µg/ml ARNasa A pancreática y 0,1 mg/ml proteinasa K) y se incubaron a 55 °C durante 3 horas. A continuación se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión durante 15 minutos, formándose una emulsión. Las distintas fases se separaron tras 10 min de centrifugación a 2500g. La fase acuosa se volvió a tratar dos veces más con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y posteriormente una vez más con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). A continuación el ADN genómico se dejó precipitando toda la noche a -20 °C con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado. Al día siguiente se centrifugó durante 30 min a 12000g y tras un lavado con etanol 70%, se dejó secar y finalmente se resuspendió en agua Milli-Q.

3.2. Amplificación y clonaje del gen de la ADN polimerasa θ de *L. infantum*.

3.2.1 Clonaje del gen *LiPol θ* en el vector pRSET C.

El gen que codifica para la ADN polimerasa θ de *L. infantum* (*LiPol θ*) fue identificado en la base de datos GeneDB (www.genedb.org). A partir de su secuencia predicha (LinJ.24.0910) se diseñaron los cebadores *Forward* (5'-GTACCATGGATGCCACCCAAATCCGC-3') y *Reverse* (5'-GATAAGCTTTCAGCCCCCTGTGGGG-3') con secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* respectivamente. La amplificación del gen se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: 95 °C durante 5 minutos, (98 °C durante 20 segundos, 65 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 2 minutos) x 25 ciclos, 72 °C durante 3 minutos. Como molde se empleó ADN genómico de *L. infantum* (ver apartado anterior). La ADN polimerasa utilizada fue *Kapa HiFi HotStart* y los componentes de la reacción se añadieron en las proporciones indicadas por el fabricante. El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% y la banda de interés fue extraída empleando el kit "Qiaquick Gel Extraction" (Qiagen, Alemania). La muestra se concentró empleando una centrifuga de vacío (SpeedVac), y se dializó durante 30 min frente a 40 ml de agua Milli-Q (V series membranes Millipore). A continuación fue digerida con las enzimas de restricción *HindIII* y *NcoI*. El vector pRSET C fue dializado frente agua Milli-Q durante 30 min y digerido con las mismas enzimas de restricción. Con el fin de evitar falsos positivos, el vector se dializó nuevamente y se defosforiló con fosfatasa alcalina bovina. Posteriormente inserto y vector se dejaron precipitando toda la noche a -20 °C con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto. Al día siguiente se centrifugaron durante 20 min a 16000g y tras un lavado con etanol 70%, se dejaron secar y se resuspendieron en 10 μ l de agua Milli-Q. Se cargó 1 μ l de inserto y de vector en gel de agarosa al 1% para estimar la concentración de cada uno. La ligación se llevó a cabo con unas relaciones vector-inserto 1:3 y 1:6 (20 ng de vector), en un volumen final de 10 μ l a 15 °C durante toda la noche. Al día siguiente la ligasa del fago T4 (New England Biolabs) fue inactivada por calor (10 min a 65 °C).

3.2.2 Clonaje del gen *LiPol θ* en el vector pPIC9.

A partir de la secuencia predicha LinJ24.0910 de la base de datos GeneDB, se diseñaron los cebadores *Forward* (5'-GTAGAATTCCCACCCAAATCCGCG-3') y *Reverse* (5'-GATGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGGCTGCCGCGGCCACCAAGG

CCCCCTGTGGGGC-3') con secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* respectivamente. Además en el cebador *Reverse* se incluyó un codón *stop* (rojo), 10 codones que codifican para histidinas (verde) y 6 codones que codifican para la secuencia de reconocimiento de la proteasa trombina (azul), además de suprimirse el codón *stop* original. Los parámetros de amplificación utilizados fueron: 95 °C durante 5 minutos, (98 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 2 minutos) x 25 ciclos, 72 °C durante 3 minutos. El procedimiento de clonaje en pPIC9 fue idéntico al realizado en el clonaje en pRSET C (descrito en el apartado anterior) con la salvedad que las enzimas empleadas en este caso fueron *EcoRI* y *NotI*.

3.2.3 Clonaje del gen completo *LiPolθ* y tres formas truncadas en el vector pMAL-c2.

Los cebadores utilizados para la amplificación de la forma completa y formas truncadas de *LiPolθ* fueron: F358 (5'-GTAGAATTCACTGGCCGCATCTT-3'), F640 (5'-GTAGAATTCCCCTCTCTCCTC-3'), F970 (5'-GTAGAATTCCCACCCAAATCCGCG-3'), *FLiPolθ* (5'-GTAGAATTCCCACCCAAATCCGCG-3') y *Reverse* (5'-GATAAAGCTTTCAGCCCCCTGTGGGG-3') con secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* en el caso de los cebadores *Forward* y *HindIII* en el cebador *Reverse*. Los parámetros de amplificación utilizados fueron: 95 °C durante 5 minutos, (98 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 2 minutos) x 25 ciclos, 72 °C durante 3 minutos. El procedimiento de clonaje en el vector pMAL-c2 fue idéntico al realizado en el clonaje en pRSET C (descrito en apartado 3.2.1) con la salvedad que las enzimas empleadas en este caso fueron *EcoRI* y *HindIII*.

3.2.4 Clonaje del gen *LiPolθ* en el vector pTEX.

Los cebadores utilizados en la amplificación del gen que codifica para *LiPolθ* fueron: *Forward* (5'-GTAACTAGTATGCCACCCAAATCCGCG-3') y *Reverse* (5'-GATAAAGCTTTCAGCCCCCTGTGGGG-3'), con secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *SpeI* y *HindIII* respectivamente. Los parámetros de amplificación utilizados fueron: 95 °C durante 5 minutos, (98 °C durante 20 segundos, 65 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 2 minutos) x 25 ciclos, 72 °C durante 3 minutos. El vector pTEX fue cedido por la Dra. Carmen Thomas (Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; CSIC). El procedimiento de clonaje en el vector pTEX fue idéntico al realizado en el clonaje en

pRSET C (descrito en el apartado 3.2.1) con la salvedad que las enzimas empleadas en este caso fueron *SpeI* y *HindIII*.

3.3 Generación de un mutante nulo del fragmento 358 de *LiPolθ* (Mutagénesis dirigida).

El mutante nulo del fragmento 358 se generó mediante tres ensayos consecutivos de mutagénesis dirigida. Utilizando los cebadores *Forward Asp1* (5'-GTTTACTCGCCTCGTTCGCCTTCAACCAGCTGGAGC-3') y *Reverse Asp1* (5'-GCTCCAGCTGGTTGAAGGCGAACGAGGCGAGTAAAC-3') se llevó a cabo la mutación del ácido aspártico 916. Mediante los cebadores *Forward Asp2* (5'-GGTAATGAGCATTACGCGGAGCTCGTCTATGCCG-3') y *Reverse Asp2* (5'-CGGCATAGACGAGCTCGGCGTGAATGCTCATTACC-3') se mutó el ácido aspártico 1115. Por último con los cebadores *Forward Glu* (5'-GTAATGAGCATTACGCCGCGCTCGTCTATGCCGTTCC-3') y *Reverse Glu* (5'-GGAACGGCATAGACGAGCGCGGCGTGAATGCTCATTAC-3') se realizó la mutación del ácido glutámico 1116. La numeración de los aminoácidos corresponde a la proteína *LiPolθ* completa. En rojo se identifica la base modificada con respecto a la secuencia nativa y que originará el cambio del aminoácido correspondiente a alanina. Como molde se utilizó la construcción pMAL-c2 - 358, obtenida a partir de miniprep de bacterias XL1-blue. Los parámetros de amplificación utilizados fueron: 95 °C durante 2 minutos, (98 °C durante 20 segundos, 68 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 4 minutos) x 15 ciclos, 72 °C durante 3 minutos. Tras comprobar en gel de agarosa 1/5 de la reacción y verificar la correcta amplificación, el resto de producto de PCR se dializó durante 30 min frente a 40 ml de agua Milli-Q (V series membranes Millipore). Posteriormente se digirió con la enzima de restricción *DpnI*, degradando de este modo el ADN plasmídico original (que se encuentra metilado al provenir de una cepa Dam +) pero no el amplificado por PCR (que contiene la mutación). El producto digerido fue introducido en bacterias XL1-blue mediante choque térmico. La construcción fue secuenciada para comprobar que la única mutación que se había producido era la introducida previamente en los cebadores.

4. Expresión y purificación de *LiPol* θ .

4.1. Expresión y purificación de *LiPol* θ en *E. coli*.

4.1.1 Expresión y purificación de 6xHis-*LiPol* θ .

El gen de la ADN polimerasa θ de *L. infantum*, clonado en el vector pRSET C fue expresado en la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para ello se inocularon 500 ml de LB – ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) – cloranfenicol (35 $\mu\text{g/ml}$) con 5 ml de cultivo de bacterias crecido durante la noche anterior y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5, momento en el cual se llevó a cabo la inducción de la expresión de 6xHis-*LiPol* θ mediante la adición de 0,5 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Tras la adición del IPTG, el cultivo se incubó a 30 °C durante 3 horas, condiciones en las cuales se obtenía una mayor cantidad de proteína. Para realizar la purificación de la proteína, se siguió el procedimiento descrito por (Giraldo y cols., 1998). Tras el periodo de expresión de la proteína, las bacterias se centrifugaron a 4000g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó con 50 ml de NaCl 0.9% frío. A continuación el sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis (KCl 1M, imidazol 60 mM, Brij 58 1%, glicerol 10%, benzamidina 1 mM) por cada 1-1,5 g de sedimento y se guardó a -80 °C. Al día siguiente el sedimento se descongeló, y se centrifugó 1 hora a 20000 rpm y 4 °C en un rotor 70.1 Ti. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón 3 M hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) pH 8.0. Se llevó a cabo una nueva centrifugación y se recogió el sobrenadante, el cual se dejó 1 hora en agitación en una columna con 1 ml de resina de agarosa-IDA-Ni²⁺. A continuación se lavó la resina con concentraciones crecientes de imidazol: 25 ml de tampón de lavado 1 (3 M GuHCl, 50 mM imidazol pH 8.0) y 10 ml de tampón de lavado 2 (3 M GuHCl, 100 mM imidazol pH 8.0) y finalmente la proteína se eluyó con 10 ml de tampón de elución (3 M GuHCl 400 mM imidazol pH 8.0). La separación electroforética de cada una de las fracciones obtenidas se realizó en gel de poliacrilamida al 8%.

4.1.2 Expresión y purificación de MBP-*LiPol* θ y formas truncadas.

La expresión de los fragmentos 358AAA, 358, 640, 970 y de la proteína completa *LiPol* θ en bacterias BL21(DE3)pLysS se llevó a cabo en idénticas condiciones. Se inocularon 250 mL de LB 0,2% glucosa – ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) – cloranfenicol (35 $\mu\text{g/ml}$) con 1,5 ml de cultivo de bacterias crecido durante la noche anterior y se incubaron a 37 °C en

agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. En ese momento se llevó a cabo la inducción de la expresión mediante la adición de 0,3 mM IPTG. Los cultivos se incubaron 2 horas a 15 °C. Tras el periodo de expresión de la proteína, las bacterias se centrifugaron a 4000g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón columna (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) por gramo de sedimento y se congeló a -80 °C. Las células se lisaron por descongelación (debido a la acción de la lisozima generada por el plásmido pLysS), y se centrifugaron 20 min a 20000g. El sobrenadante fue diluido 1/5 en el mismo tampón y se aplicó a 3 ml de resina de amilosa previamente equilibrada. Tras un lavado con 15 volúmenes de resina de tampón columna, las proteínas se eluyeron con 7 ml de tampón de elución (tampón columna + 10 mM maltosa).

4.2 Expresión de 6xHis-LiPolθ en sistema libre de células.

LiPolθ se expresó en el sistema libre de células TNT[®] T7 *quick coupled transcription/translation systems* de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante. Como ADN se empleó la construcción pRSET C - *LiPolθ*. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl (40 µl de TNT[®] T7 *quick master mix*, 1 µl de metionina 1 mM, 3,5 µl de ADN plasmídico (1 µg) y 5,5 µl de agua libre de nucleasas) a 30 °C durante 90 minutos. En la primera prueba de expresión se incluyó un control negativo (sin ADN) y un control positivo (vector de expresión de la luciferasa). La expresión de *LiPolθ* se detectó mediante *Western blot* empleando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ* a una dilución 1:500 (ver más adelante). El anticuerpo secundario utilizado fue anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (DAKO) a una dilución 1:2000.

4.3 Expresión de LiPolθ-10x en *Pichia pastoris*.

4.3.1 Generación de colonias con fenotipo Mut⁺ y Mut^s.

La cepa de levadura utilizada fue *Pichia pastoris* GS115. En primer lugar se digirieron 10 µg de plásmido pPIC9 y pPIC9-*LiPolθ* con las enzimas de restricción *StuI* o *BglII* para generar los transformantes Mut⁺ y Mut^s respectivamente. Una vez digeridos, los ADN plasmídicos fueron precipitados toda la noche con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto. Al día siguiente se centrifugaron a 16000g durante 20 min y tras un lavado con etanol 70% se dejaron secar. Finalmente se

resuspendió cada plásmido en 10 µl de agua Milli-Q. La generación de levaduras electrocompetentes, así como la transformación de las mismas con los vectores pPIC9 y pPIC9-*LiPolθ* linealizados con *StuI* o *BglII*, se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial Invitrogen. Las levaduras electroporadas se crecieron en placas MD (1,34% YNB, 4x10⁻⁵% Biotina, 2% Dextrosa) durante 2 días a 30 °C, para seleccionar los transformantes.

4.3.2 Comprobación de los transformantes Mut⁺ y Mut^s obtenidos.

En primer lugar se picaron 50 colonias de cada una de las 4 transformaciones realizadas (pPIC9 y pPIC9-*LiPolθ* linealizados con *StuI* o *BglII*) y se sembraron paralelamente en placas MM (1,34% YNB, 4x10⁻⁵% Biotina, 0,5% metanol) y MD (1,34% YNB, 4x10⁻⁵% Biotina, 2% Dextrosa). Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C. El crecimiento diferencial en las dos placas es indicativo del tipo de transformante obtenido. Las levaduras Mut⁺ crecen por igual en ambas placas, mientras que las levaduras Mut^s crecen más lentamente en MM al haber perdido el gen AOX1.

Para confirmar tanto la integración del gen de interés en el genoma de *Pichia*, como el fenotipo de los transformantes obtenidos, se llevó a cabo un análisis por PCR empleando los cebadores 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3' AOX1 (5'-GC AAATGGCATTCTGACATCC-3'). Para la obtención del ADN genómico se siguieron los protocolos de Linder y cols., 1996 o Ayra-Pardo y cols., 1998. Los parámetros de amplificación utilizados fueron: 95 °C durante 5 minutos, (98 °C durante 20 segundos, 57 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 1,5 minutos) x 30 ciclos, 72 °C durante 5 minutos.

4.3.3 Expresión de *LiPolθ* en colonias Mut⁺ y Mut^s.

Las condiciones generales de expresión de la proteína *LiPolθ* en *P. pastoris* fueron las indicadas por la casa comercial Invitrogen, que se describen a continuación.

Las colonias de levaduras Mut⁺ se crecieron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio BMGY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato potásico pH 6.0, 1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵% biotina, 1% glicerol) a 28 °C y 250 rpm durante aproximadamente 24h hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 2 y 6. En ese instante se centrifugaron a 2000g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en medio BMMY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato potásico pH 6.0, 1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵% biotina, 0.5% metanol) a una DO₆₀₀ de 1 (100-200 ml) y se creció en un matraz

Erlenmeyer de 1 L a 28 °C y 250 rpm durante 5 días. Cada 24 horas se tomó 1 ml de muestra de los cultivos y se añadió metanol a una concentración final de 0,5% para mantener la inducción.

Las colonias de levaduras Mut^s se crecieron en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 100 ml de medio BMGY a 28 °C y 250 rpm durante aproximadamente 24h hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 2 y 6. En ese instante se centrifugaron a 2000g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio BMMY y se creció en un matraz Erlenmeyer de 250 ml a 28 °C y 250 rpm durante 5 días. Cada 24 horas se tomó 1 ml de muestra de los cultivos y se añadió metanol a una concentración final de 0,5% para mantener la inducción.

Las muestras recogidas durante los distintos días se centrifugaron durante 2 min a 16000g para separar la fracción celular del medio de cultivo. Ambas fracciones se prepararon siguiendo las indicaciones de la casa comercial Invitrogen y se cargaron en gel de poliacrilamida para su posterior análisis tanto por tinción con azul de Coomassie como por *Western blot* (el anticuerpo primario utilizado fue anticuerpo anti-LiPolθ a una dilución 1:500).

Medios de cultivo alternativos: MGY (1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵% biotina, 1% glicerol).

Medios de expresión alternativos:

-MM (1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵% biotina, 0,5% metanol).

-BMMY + sorbitol (BMMY con 5% sorbitol).

-BMMY + magnesio (BMMY con 60 mM MgSO₄·7H₂O).

-BMMY + tween 80 (BMMY con 0,1-1% tween 80).

-Medio suplemento (1% extracto de levadura, metanol 0,5%, glicerol 0,125%, PMSF 1 mM).

5. Purificación de proteínas desde geles de poliacrilamida (Electroelución).

La electroelución de la proteína se llevó a cabo a partir de geles de poliacrilamida al 8% mediante el uso del sistema "Maxi D-tube" de Novagen. Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con la solución "RapidStain Reagent" de Novagen que permite la visualización de la proteína sin producir su fijación. A continuación se recortó con un bisturí la banda correspondiente a la forma completa de la proteína LiPolθ y se introdujo en un tubo de electroelución con tampón Tris 25 mM, glicina 0.192 M, SDS 1%. La electroelución se llevó a cabo sumergiendo los tubos que contenían la muestra en ese

mismo tampón y aplicando una corriente eléctrica de 120 V durante 5 horas. Al finalizar, se invirtió la polaridad de la corriente eléctrica durante 2 min para liberar la proteína que hubiera podido adherirse a la membrana (punto de corte 14 kDa) y se recogió el tampón del interior de los tubos, el cual contenía la muestra. El producto electroeluido se analizó por MALDI-TOF/TOF (servicio de proteómica, Universidad Complutense de Madrid) para descartar que hubiera proteínas contaminantes.

6. Obtención de un anticuerpo policlonal anti-LiPolθ.

La generación del anticuerpo policlonal se llevó a cabo en la “*Unitat d’Experimentació Animal de Farmàcia i Psicologia*” del parque científico de Barcelona tras la inyección de 4 dosis de aproximadamente 75-100 µg de antígeno purificado cada una. Previamente a la primera inmunización se extrajeron 15 ml de sangre con el fin de obtener suero preinmune, el cual fue utilizado como control. La primera de las inmunizaciones se realizó con 0,5 ml de proteína LiPolθ purificada (75-100 µg) con igual volumen de adyuvante completo de Freund. Cada tres semanas se administró una dosis de recuerdo. En cada una de ellas se inoculó la misma cantidad de proteína que en la dosis inicial pero en presencia de adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después de la última dosis de recuerdo se extrajo nuevamente 15 ml de sangre para la obtención de suero. Dicho suero fue testado mediante *Western blot* utilizando para ello fracciones proteicas correspondientes a bacterias BL21(DE3)pLysS transformadas con pRSET C - LiPolθ sin inducir e inducidas para determinar su efectividad. Una vez se hubo comprobado que detectaba la proteína LiPolθ y no presentaba reacción cruzada con ninguna proteína de *E. coli* se procedió a realizar el sangrado del conejo. Las muestras se guardaron congeladas a -20 °C en alícuotas de 300 µl.

7. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (*Western blot*).

Para la realización de los *Western blot* se utilizaron membranas de nitrocelulosa “Hybond-C pure” de Amersham. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 voltios con tampón Tris 25 mM, glicina 0,19 M, 20% metanol. La membrana se dejó bloqueando toda la noche a 4 °C con PBS 0.1% Tween-20 y 5% leche en polvo. Después de 16 horas, se realizaron 3 lavados en PBS 0.1% Tween-20 (1 de 15 min y 2 de 5 min) y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo. Se volvieron a lavar las membranas y se incubaron durante 1 hora con el

anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) diluido también en solución de bloqueo. Para finalizar, las membranas se lavaron de nuevo y se revelaron con los reactivos de detección ECL de Amersham, siguiendo las instrucciones del fabricante.

8. Determinación de los niveles de expresión y localización subcelular de la proteína LiPol θ .

8.1 Aislamiento de células.

8.1.1 Generación de *amastigotes-like*.

El proceso de diferenciación de la forma promastigote a la forma de tipo amastigote en cultivo axénico (o *amastigote-like*) es dependiente de las condiciones de pH y temperatura (Debrabant y cols., 2004; Saar y cols., 1998), principalmente de esta última (Alcolea y cols., 2009). Debido a ello, para la generación de *amastigotes-like* se cultivaron, durante 96 horas, los promastigotes de *L. infantum* a 37 °C en medio RPMI 1640 con ácido succínico 20 mM, 25% de suero fetal bovino inactivado y un combinado de antibióticos penicilina 100UI/ml-estreptomicina 100 µg/ml (pH del medio = 5.5).

8.1.2 Obtención de promastigotes procíclicos y metacíclicos.

8.1.2.1 Purificación de lectina de cacahuete (PNA).

Para la obtención de la lectina se sumergieron 200 g de cacahuets sin tostar en 600 ml de PBS y se mantuvieron a 4 °C toda la noche. Después de 16 horas, se homogenizó todo con una batidora, y se filtró a través de una gasa. Posteriormente se centrifugó a 10400g durante 10 min y se filtró el sobrenadante, primero a través de una gasa y después por papel de filtro. A continuación se precipitaron parte de las proteínas mediante sulfato amónico al 40%. Una vez solubilizado el sulfato amónico, la muestra se dejó en reposo 30 min y se centrifugó a 5900g durante 20 min. El sobrenadante se pasó nuevamente por una gasa primero y a continuación por un papel de filtro. Una vez descartadas las proteínas que precipitaron en el paso anterior, se aumentó la concentración de sulfato amónico hasta el 75% y se dejó en reposo otros 30 min, tras lo cual se centrifugó nuevamente a 5900g durante 20 min. En esta ocasión se recogió el sedimento, donde se encontraba la PNA, y se resuspendió en 100 ml de PBS. La muestra se dializó frente a 1 litro de PBS durante 16 horas, realizando 3 cambios de PBS. Posteriormente, la muestra se centrifugó en tubos corex a 5900g durante 10 min a 4 °C y se pasó el sobrenadante a

través de un papel de filtro y una malla de vidrio. A continuación el sobrenadante se introdujo en un circuito cerrado precolumna-columna de melibiosa durante unas 3 horas. Posteriormente se dejó lavando la columna de melibiosa con PBS durante toda la noche. Finalmente, se eluyó la PNA al añadir D-galactosa 50 mM. La obtención de PNA se realizó gracias a la colaboración del Dr. Alfredo Toraño (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias; Instituto Carlos III de Majadahonda).

8.1.2.2 Aislamiento de promastigotes procíclicos (PNA⁺) y metacíclicos (PNA⁻) de *L. infantum*.

Para la separación de las dos subpoblaciones de promastigotes (PNA⁻ y PNA⁺) se siguió el protocolo descrito por Alcolea y cols., 2009. Se inició un cultivo de *L. infantum* de 1800 ml a una concentración de $1,55 \times 10^6$ promastigotes/ml. Cada día se llevó a cabo un recuento de la población en cámara de Neubauer. Al alcanzar los promastigotes la fase estacionaria (día 6 de cultivo) se tomó un volumen equivalente a 24.000×10^6 de promastigotes (porcentaje estimado de PNA⁻ en una población $\approx 1\%$) y se centrifugó a 2000g durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en medio completo (2×10^8 promastigotes/ml). A continuación se añadió PNA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se dejó incubando 30 min a TA. La adición de PNA al medio permite la separación de las subpoblaciones procíclica y metacíclica de promastigotes (Alcolea y cols., 2009; Sacks y cols., 1985) puesto que la lectina de cacahuete se une a los residuos de D-galactosa presentes en la molécula de lipofosfoglicano (LPG) de la membrana de promastigotes procíclicos, provocando su aglutinación (y consecuente decantación por gravedad). En promastigotes metacíclicos, la molécula de LPG se encuentra modificada, presentando los residuos de D-galactosa necesarios para la interacción con PNA bloqueados por D-arabinosa (McConville y cols., 1992), por lo que no puede producirse la unión de PNA a los promastigotes y estos permanecen libres en suspensión. Al cabo de 30 min se recogieron, mediante pipeteo, los sobrenadantes que contenían los promastigotes metacíclicos (PNA⁻) en suspensión. Los sedimentos, que contenían los promastigotes procíclicos (PNA⁺), se resuspendieron con 5 ml de medio que había quedado en los tubos y se les añadió nuevo medio completo con una concentración de PNA de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se agitaron los tubos para resuspender los sedimentos de células aglutinadas y se centrifugaron a 200g durante 10 min junto con los sobrenadantes recogidos con anterioridad. La centrifugación de los sobrenadantes obtenidos previamente se realizó para descartar aquellos promastigotes PNA⁺ aglutinados que hubiesen podido ser

recogidos por error. Por su parte la adición de nuevo medio con PNA a los sedimentos y su posterior resuspensión se llevó a cabo para recuperar aquellos PNA⁻ que hubiesen precipitado al haber sido arrastrados por los agregados de PNA⁺. Tras esta centrifugación se separaron nuevamente los sobrenadantes y se observaron al microscopio óptico las fracciones sobrenadante (promastigotes PNA⁻) y sedimento (promastigotes PNA⁺) para asegurarse que no hubiera contaminaciones. Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000g para recoger los promastigotes PNA⁻ y se hizo un recuento para determinar el rendimiento obtenido. Los sedimentos se resuspendieron en medio completo y se centrifugaron a 2000g durante 10 min para lavar la aglutinina de cacahuete. Tras 2 lavados los promastigotes volvieron a disgregarse y se realizó un recuento de los mismos (promastigotes PNA⁺).

8.2 Preparación de extractos proteicos totales de *Leishmania*.

La extracción proteica se realizó siguiendo el protocolo de Johnson y Englund, 1998. Se recogió un volumen de medio de cultivo equivalente a 2×10^8 promastigotes y se centrifugó a 2000g durante 5 min. Tras 2 lavados con PBS, se resuspendió el sedimento en 200 μ l de tampón de lisis (Igepal CA-630 1%, Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 25 mM, EDTA 20 mM, PMSF 4 mM y leupeptina 4 μ g/ml) y se incubó 30 minutos a 4 °C. A continuación la muestra se centrifugó a 16000g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue almacenado a -80 °C.

8.3 Detección de los niveles de expresión de *LiPolθ* en *Leishmania*.

La detección de los niveles de expresión de *LiPolθ* en *L. infantum* en los estadios promastigote y *amastigote-like* se realizó mediante *Western blot*. Para ello se obtuvieron extractos proteicos de promastigotes a lo largo de su ciclo de diferenciación (día 1 a día 6) y de *amastigotes-like*. La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el método de BCA (ácido bicinonínico). De cada uno de los extractos se cargó 10 μ g en el gel. El anticuerpo primario utilizado fue anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ* a una dilución 1:500. El anticuerpo secundario utilizado fue anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (DAKO) a una dilución 1:2000.

8.4 Localización subcelular de *LiPolθ* mediante inmunofluorescencia indirecta.

Para cada muestra se recogieron aproximadamente $1,2 \times 10^6$ promastigotes mediante centrifugación durante 10 min a 2000g. Tras un lavado con PBS, las células se resuspendieron a una concentración de 2×10^4 promastigotes/ μl en PBS. A continuación se colocaron 10 μl (2×10^5 promastigotes) por punto sobre un portaobjetos previamente lavado y se dejó secar la gota a temperatura ambiente. Los promastigotes se fijaron mediante la adición de paraformaldehído al 4% durante 5 min, tras lo cual se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS. Seguidamente se llevó a cabo la permeabilización de los parásitos, sumergiendo las muestras en PBS-tritón 0.5% durante 5 min. A continuación se repitieron los 3 lavados en PBS. El bloqueo se realizó añadiendo PBS 0.1% Tween-20 y 5% leche durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente se eliminó el exceso de suero y se incubó la muestra con el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ* a una dilución 1:50 en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 min y se incubó otra hora con el anticuerpo secundario Alexa 488 diluido 1: 200 en solución de bloqueo, en cámara húmeda y oscuridad. En los últimos 10 min de incubación del anticuerpo secundario se añadió DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) a una dilución 1/2000 en PBS. Finalmente se hicieron 4 lavados de 5 min en PBS y se realizó el montaje con mowiol. Para la toma de imágenes se utilizó el microscopio confocal SP5 (Leica, Alemania).

9. Ensayos *in vitro* de actividad ADN polimerasa.

9.1 Marcaje de cebadores.

Los cebadores fueron marcados en su extremos 5' con [γ -32P] ATP y T4 polinucleótido quinasa (PNK). La reacción (20 picomoles de cebador, 6 picomoles de [γ -32P] ATP, 10 unidades de PNK y tampón de PNK 1x) se llevó a cabo a 37 °C durante 40 min en un volumen final de 20 μl . Posteriormente la reacción se incubó durante 20 min a 65 °C para inactivar la PNK. A continuación se añadió 50 μl de agua a las muestras para aumentar su volumen y éstas fueron filtradas por centrifugación en columnas Sephadex G-50 para eliminar los nucleótidos no incorporados (los cuales quedan retenidos en la columna). Por último, los cebadores se hibridaron con el oligonucleótido molde correspondiente.

9.2 Hibridación de cebadores y oligonucleótidos molde.

Para realizar la hibridación se incubaron 5 picomoles de cebador y 10 picomoles de oligonucleótido molde en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5 y 0.3 M NaCl en un volumen final de 50 μ l. Tras una incubación de 10 min a 80 °C, se dejó enfriar la muestra hasta alcanzar temperatura ambiente.

9.3 Análisis de los ensayos de actividad ADN polimerasa.

Todos los ensayos de actividad ADN polimerasa fueron analizados mediante electroforesis en geles 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

9.4 Actividad polimerasa de *LiPol θ* expresada en sistema libre de células.

Los cebadores SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') y Sk (5'-CACTGACTGTATG-3') marcados radiactivamente en sus extremos 5' con [γ -³²P] ATP se hibridaron con los oligonucleótidos molde T13A (5'-AGAAGTGATCTAGTACTCACTGTGATC-3') y AP0 (5'-CTCGTCAGCATCTTCATCATAACAGTCAGTG-3') respectivamente. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 10 μ M dNTPs, 5 μ l de sistema libre de células con *LiPol θ* expresada o sin ella (control negativo) y 8 mM MgCl₂. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 27 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.5 Estudio de la actividad polimerasa de los fragmentos 358, 640, 970 y la proteína completa *LiPol θ* .

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP se hibridó con el oligonucleótido molde T13C (5'-AGAAGTGTA TCTCGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 10 μ M dNTPs, y 8 mM MgCl₂. La concentración de proteína ensayada para los fragmentos 358, 640, 970 y *LiPol θ* fue 1500 nM, 750 nM, 500 nM y 200 nM respectivamente (1 μ l de la fracción de elución 3 en cada caso). Las digestiones de las proteínas recombinantes con factor XA (New England Biolabs), fueron realizadas

siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.6 Estudio de la actividad polimerasa de MBP-*LiPolθ* en presencia de Mg²⁺ y Mn²⁺.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP se hibridó con el oligonucleótido molde T13C (5'-AGAAGTGTATCTGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/µl de BSA, 5 nM de ADN marcado y 10 µM dNTPs. La cantidad de proteína utilizada fue 200 nM de *LiPolθ*. Las concentraciones de cofactor empleadas fueron 0.1, 0.5, 1, 4 y 8 mM de MgCl₂ y 0, 2, 5, 10 y 100 µM de MnCl₂. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.7 Estudio de la actividad polimerasa de MBP-*LiPolθ* a diferentes valores de pH y temperatura.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP se hibridó con el oligonucleótido molde T13T (5'-AGAAGTGTATCTGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl en presencia de 1 mM DTT, 50 ng/µl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 0,1 mM MnCl₂, 10 µM dNTPs y 200 nM de *LiPolθ*. El ensayo de determinación del pH óptimo se llevó a cabo añadiendo a cada reacción 50 mM Tris-HCl pH = 6, 6.5, 7, 7.5 u 8 según el ensayo, y la temperatura de reacción fue 37 °C. En el ensayo de determinación de la temperatura óptima se añadió 50 mM Tris-HCl pH = 7.5 y las temperaturas en las cuales se llevó a cabo la reacción fueron 27 y 37 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a la temperatura correspondiente, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.8 Ensayo de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal).

El cebador PberC (5'-CTGCAGCTGATGCGCC-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP. Posteriormente, parte del mismo fue hibridado con el oligonucleótido molde T4G (5'-GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado (cebador PberC o ADN de doble hebra PberC-T4G), 0,1 mM MnCl₂ y 200 nM de *LiPol* θ . En el caso de ADN de doble hebra se empleó una concentración de 1-100 nM de dGTP, mientras que para el ADN de hebra simple se utilizó una concentración de 1-100 μ M de cada uno de los 4 nucleótidos por separado. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.9 Estudio de la discriminación por parte de MBP-*LiPol* θ del grupo 3' OH del nucleótido entrante.

El primer PberC (5'-CTGCAGCTGATGCGCC-3') marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP se hibridó con el oligonucleótido molde T4G (5'-GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 0,1 mM MnCl₂, 200 nM de *LiPol* θ y 1-100 nM dGTP o 0,1-10 μ M ddGTP. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.10 Estudio de la fidelidad de MBP-*LiPol* θ en presencia de Mg²⁺ y Mn²⁺.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP se hibridó con los oligonucleótido molde T13A (5'-AGAAGTGTATCTAGTACTCACTGTGATC-3'), T13C (5'-AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC-3'), T13G (5'-AGAAGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC-3') y T13T (5'-AGAAGTGTATCTTGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN

marcado y 200 nM de *LiPolθ*. La concentración de dNTPs utilizada fue de 100 nM en el ensayo con magnesio y 1 nM en el ensayo en presencia de manganeso. La concentración de los cofactores fue 1 mM $MgCl_2$ o 0.1 mM $MnCl_2$. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.11 Ensayo de actividad deoxirribosafosfato liasa (dRP-liasa).

Se hibridaron 100 picomoles del oligonucleótido P6-1 (5'-CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTA-3') que presenta un uracilo en posición 16, con 100 picomoles del oligonucleótido complementario T4 (5'-GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG-3'). Posteriormente el híbrido P6-1/T4 se marcó en el extremo 3' con [$\alpha^{32}P$]dCTP (0.5 μ Ci) y polimerasa Klenow (2 u) a 37 °C durante 1 hora. A continuación el ADN se filtró por centrifugación en columna sephadex G-25 y se añadió NaCl 5M a la muestra hasta alcanzar una concentración final de 300 mM. Este sustrato (45 picomoles) se incubó con uracil ADN glicosilasa humana (*hUDG*, 100 nM) a 37 °C durante 20 min en presencia de tampón dRP (50 mM Hepes pH=7.5, 20 mM KCl y 2 mM DTT) para la escisión del uracilo. Tras la incubación, se añadió $MgCl_2$ a una concentración final de 10 mM y 40 nM de endonucleasa humana (*hAP*), además de la cantidad de tampón dRP 10x necesaria para ajustar los valores de Hepes, KCl y DTT a los que había anteriormente. La reacción se incubó durante 20 min a 37 °C. A continuación, una vez preparado el sustrato, se llevó a cabo el ensayo de actividad dRP-liasa. En cada reacción (25 μ l) se utilizó 2,5 μ l de ADN (concentración final del ADN en la reacción 100 nM). Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 50 mM Hepes pH=7.5, 20 mM KCl y 2 mM DTT. Como control negativo se empleó la polimerasa μ humana y como control positivo la polimerasa λ humana, ambas a una concentración de 100 nM. *LiPolθ* se ensayó a concentraciones 100, 200 y 400 nM. Las reacciones se iniciaron con la adición de las diferentes polimerasas, y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Tras la incubación, se añadió $NaBH_4$ a una concentración final de 340 mM, manteniendo las reacciones en hielo durante 20 min. Los productos de reacción estabilizados (reducidos) se precipitaron en presencia de dos volúmenes de etanol, 0.1 μ g/ml de tRNA y 0,4 volúmenes de acetato amónico 7.5M durante 20 min a -20 °C. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol 70%. El sobrenadante fue nuevamente desechado y tras dejar secarse las muestras, éstas fueron resuspendidas en agua y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida del 20% y 8M urea.

9.12 Ensayo de actividad polimerasa en moléculas tipo *gap* de 1 y 5 nucleótidos.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -32P] ATP se hibridó con los oligonucleótidos:

- T13C (5'-AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC-3') y Dg1P (5'-AGATACACTTCT-3') para dar lugar a la molécula *gap* de un nucleótido con un grupo fosfato en 5'.
- T13C (5'-AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC-3') y Dg1OH (5'-AGATACACTTCT-3') para dar lugar a la molécula *gap* de un nucleótido con un grupo OH en 5'.
- T18 (5'-ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC-3') y Dg5P (5'-AACGACGGCCAGT-3') para dar lugar a la molécula *gap* de cinco nucleótidos con un grupo fosfato en 5'.

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 1 mM MgCl₂ o 0,1 mM MnCl₂ en el caso de *LiPol* θ y 1 mM MnCl₂ o 2,5 mM MgCl₂ para *hpol* λ , 200 nM de *LiPol* θ o 50 nM de *hpol* λ y 0,01-1 μ M dNTPs. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C en el caso de *LiPol* θ y durante 20 min a 30 °C en el caso de *hpol* λ . Posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.13 Ensayo de extensión de extremos desapareados.

Los cebadores SP1A (5'-GATCACAGTGAGTAA-3'), SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3'), SP1G (5'-GATCACAGTGAGTAG-3') y SP1T (5'-GATCACAGTGAGTAT-3') fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ -32P] ATP y se hibridaron con el oligonucleótidos T13T (5'-AGAAGTGTATCTTGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 0,1 mM MnCl₂, 200 nM de *LiPol* θ y 0,1-100 μ M de dNTPs si éstos eran añadidos conjuntamente o 200 nM de cada nucleótido si éstos se suministraban individualmente. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.14 Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión 8oxodG.

9.14.1. Síntesis frente a 8oxodG.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -32P] ATP y se hibridó con los oligonucleótidos T13G (5'-AGAAGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC-3') y T13-8oxoG (5'-AGAAGTGTATCT8oxoGGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado y 200 nM de *LiPol* θ . La concentración de nucleótidos empleada fue 1-100 μ M cuando éstos fueron añadidos conjuntamente y 0,05-1000 nM de dCTP y 0,005-100 μ M de dATP en los ensayos en los que estos fueron añadidos individualmente. La concentración de los cofactores fue 1 mM MgCl₂ y 0.1 mM MnCl₂. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.14.2 Extensión de un par 8oxodG.

Los cebadores PberA (5'-CTGCAGCTGATGCGCA-3') y PberC (5'-CTGCAGCTGATGCGCC-3') fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ -32P] ATP e hibridados con el oligonucleótido molde T48oxoG (5'-GTACCCGGGGATCCGTAC8oxoGGCGCATCAGCTGCAG-3'). El cebador PberC se hibridó además con el oligonucleótido T4G (5'-GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 0,1 mM MnCl₂ y 200 nM de *LiPol* θ . La concentración de dGTP utilizada fue 1-1000 nM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.14.3 Inserción de 8oxodGTP.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -32P] ATP y se hibridó con los oligonucleótidos T13C (5'-AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC-3') y T13A (5'-AGAAGTGTATCT8AGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en

presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/μl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 0,1 mM MnCl₂ y 200 nM de *LiPol*θ. La concentración de nucleótidos empleada fue: 0,01-1 nM de dGTP, 0,1-10 nM de dTTP y 1-1000 nM de 8oxodGTP. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.14.4 Inserción de ribonucleótidos frente a 8oxodG.

El cebador SP1C (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ-32P] ATP y se hibridó con el oligonucleótido T13-8oxoG (5'-AGAAGTGTATCT8oxoGGTACTCACTGTGATC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/μl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPol*θ y 0,1 mM MnCl₂. La concentración de ribonucleótidos utilizada fue 1-100 μM ATP y 0,01-10 μM dCTP. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.15. Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión timina glicol.

9.15.1 Síntesis frente a timina glicol.

El cebador pFU (5'-GTACCCGGGGATCCGTAC-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ-32P] ATP e hibridado con los oligonucleótidos molde P6T (5'-CTGCA GCTGATGCGCTGTACGGATCCCCGGGTAC-3') y P6Tg (5'-CTGCAGCTGATGCGCTgGTACGG ATCCCCGGGTAC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/μl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPol*θ y 0,1 mM MnCl₂. La concentración de dNTPs utilizada fue 0,1-100 μM cuando éstos fueron añadidos conjuntamente y 1 μM cuando se emplearon por separado. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.15.2 Extensión de un par timina glicol.

Los cebadores pFUA (5'-GTACCCGGGGATCCGTACA-3') y pFUG (5'-GTACCCGGGGATCCGTACG-3') fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP e hibridados con los oligonucleótidos molde P6T (5'-CTGCAGCTGATGCGCTGTACGGATCCCGGGTAC-3') y P6Tg (5'-CTGCAGCTGATGCGCTgGTACGGATCCCCGGGTAC-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPol* θ y 0,1 mM MnCl₂. La concentración de dGTP utilizada fue 0,01-10 μ M. Cuando se emplearon los 4 dNTPs simultáneamente la concentración de estos fue 10 μ M. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.16 Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión O⁶-metildesoxiguanina (6mdG).

El cebador Pber (5'-CTGCAGCTGATGCGC-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP e hibridado con los oligonucleótidos molde T4 (5'-GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG-3') y T46mG (5'-GTACCCGGGGATCCGTAC6mGGCGCATCAGCTGCAG-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/ μ l de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPol* θ y 0,1 mM MnCl₂. La concentración de dNTPs utilizada fue 1 y 100 μ M cuando éstos fueron añadidos conjuntamente y 10 y 100 nM cuando se emplearon por separado. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 μ l de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.17 Ensayos de actividad ADN polimerasa en sitios abásicos.

El cebador Sk (5'-CACTGACTGTATG-3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP e hibridado con los oligonucleótidos molde AP0 (5'-CTCGTCAGCA TCTTCATCATACAGTCAGTG-3'), AP1 (5'-CTCGTCAGCATCTXCATCATACAGTCAGTG-3') y AP2 (3'-CTCGTCAGCATCTXXCATCATACAGTCAGTG-5'). La letra X indica la posición de la molécula de tetrahidrofurano. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un

volumen de 20 µl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/µl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPol*θ y 0,1 mM MnCl₂. La concentración de dNTPs utilizada fue 0,1-100 µM cuando éstos fueron añadidos conjuntamente y 10 µM cuando se emplearon por separado. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.18 Ensayos de actividad ADN polimerasa en lesión CPD.

9.18.1 Síntesis a través de lesión e inserción frente a T3' del CPD.

Los cebadores pUV (5'-CCGTACGATCATACTGACTAT-3') y pUV-3 (5'-CCGTACGATCATACTGAC-3') fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP e hibridados con los oligonucleótido T24TT (5'-AGGATAGTGACAGTAGTGTATGTTATAGTCAGTATGATCGTACGG-3') y T24CPD (5'-AGGATAGTGACAGTAGTGTATGT=TATAGTCAGTATGATCGTACGG-3'). El signo "=" representa el enlace covalente entre las dos timinas. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/µl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPol*θ y 0,1 mM MnCl₂. En los ensayos en los que se añadieron los 4 nucleótidos conjuntamente se empleó una concentración de 0,1-10 µM y 1-100 µM de dNTPs dependiendo de si el oligonucleótido molde presentaba o no la lesión CPD. En los ensayos en los que los nucleótidos se suministraron individualmente, la concentración de estos fue 10 nM y 10 µM dependiendo nuevamente de si el oligonucleótido molde era T24TT o T24CPD. Para la determinación de la eficiencia de *LiPol*θ en la inserción de dATP con respecto a dGTP la concentración de nucleótido empleada fue 0,5-10 µM y 1-50 µM respectivamente. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.18.2 Síntesis frente a T5' de un CPD.

Los cebadores pUVA (5'-CCGTACGATCATACTGACTATA-3') y pUVG (5'-CCGTACGATCACTACTGACTATG-3') fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP e hibridados con los oligonucleótido T24TT (5'-AGGATAGTGACAGTAGTGTATGTTATA

GTCAGTATGATCGTACGG-3') y T24CPD (5'-AGGATAGTGACAGTAGTGTATGT=TATAGTCA GTATGATCGTACGG-3'). El signo "=" representa el enlace covalente entre las dos timinas. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/µl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPolθ*, 0,1 mM MnCl₂ y 10 nM o 10 µM de dATP y dCTP dependiendo de si el oligonucleótido molde presentaba o no la lesión CPD. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

9.18.3 Extensión de un daño CPD.

Los cebadores pUVAA (5'-CCGTACGATCATACTGACTATAA-3') y pUVGA (5'-CCGTAC GATCATACTGACTATG-3') fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP e hibridados con el oligonucleótido T24CPD (5'-AGGATAGTGACAGTAGTGTATGT=TATAGTCA GTATGATCGTACGG-3'). El signo "=" representa el enlace covalente entre las dos timinas. El cebador pUVAA se hibridó además con el oligonucleótido T24TT (5'-AGGATAGTGACAGTAGTGTATGTTATAGTCA GTATGATCGTAC GG-3'). Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl en presencia de 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM DTT, 50 ng/µl de BSA, 5 nM de ADN marcado, 200 nM de *LiPolθ*, 0,1 mM MnCl₂ y 0,1-100 nM dCTP según se indique. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del ADN marcado y se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se detuvieron añadiendo 8 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol).

10. Ensayos *in vivo* de resistencia frente a agentes genotóxicos.

10.1 Generación de transfectantes estables de *L. infantum* y *L. major* que sobre-expresan el gen *LiPolθ*.

El vector pTEX, permite la expresión de proteínas en *T. cruzi* y protozoos del género *Leishmania* (Kelly, 1995; Kelly y cols., 1992). La transfección de *Leishmania* con la construcción pTEX-*LiPolθ*, se llevó a cabo mediante electroporación, siguiendo el protocolo descrito por Robinson y Beverley, 2003. Como control negativo se emplearon parásitos electroporados en ausencia de la construcción. Para la transfección se utilizaron promastigotes tanto de *L. infantum* como de *L. major* en fase logarítmica (6-9

x 10^6 promastigotes/ml) cultivados en medio 199 suplementado con 20% de suero. Para cada electroporación se tomó un volumen equivalente a 1×10^8 células, las cuales se centrifugaron 10 min a 2000g y se lavaron dos veces con medio volumen de tampón citomix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl_2 , 10 mM K_2HPO_4 , 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , pH 7.6). Posteriormente las células se resuspendieron en tampón citomix a una concentración final de 2×10^8 promastigotes/ml (500 μl de tampón citomix por muestra a transfectar) y se dispensaron en cubetas de electroporación de 4 mm de ancho de ranura. A continuación se añadieron 10 μg de la construcción pTEX-*LiPol* θ por cubeta, se mezcló con suavidad y se dejó reposar 5 min en hielo. Posteriormente se llevó a cabo la electroporación mediante dos pulsos a 25 μF y 1500 V, con un intervalo de 10 segundos entre ambos. Las cubetas se dejaron nuevamente 5 min en hielo y a continuación se transfirieron los parásitos a un frasco con 5 ml de medio 199 y se incubaron a 27 °C. A las 24 horas se realizaron tres pases de cada cultivo y se inició la selección de los parásitos transfectados adicionando el antibiótico geneticina (a una concentración diferente para cada pase). Las concentraciones iniciales fueron 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las cuales se fueron aumentando con el transcurso del tiempo. A valores de 30-35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de geneticina se consideró que la población de transfectantes había sido seleccionada, puesto que a esas concentraciones de antibiótico los parásitos correspondientes al control negativo habían muerto. No obstante, se siguió aumentando la concentración de antibiótico (hasta 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el caso de *L. infantum* y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el de *L. major*) para acentuar la selección.

10.2 Determinación del nivel de expresión de *LiPol* θ en promastigotes de *Leishmania* silvestres y transfectados.

Una vez se hubo seleccionado la población de especímenes transfectados, se decidió realizar un *Western blot*, para verificar que la resistencia al antibiótico geneticina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *L. infantum* y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *L. major*) se correspondía con un incremento en la expresión de *LiPol* θ . Para ello se llevó a cabo la extracción proteica de parásitos silvestres (*wild-type*) y transfectados (ver apartado 8.2 de materiales y métodos). Las muestras (10 μg de extracto proteico total de promastigotes silvestres de *L. infantum*, promastigotes transfectados de *L. infantum* y promastigotes silvestres de *L. major* y 0.36, 1.1 y 3.3 μg de extracto proteico total de promastigote transfectados de *L. major*) se analizaron por duplicado mediante SDS-PAGE. Uno de los geles se empleó como control de carga tras tinción con azul de Coomassie, el otro gel se analizó mediante *Western blot* empleando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-*LiPol* θ .

10.3 Ensayos de proliferación celular de promastigotes de *L. major* silvestres y transfectados en presencia de diferentes agentes genotóxicos.

La actividad de los compuestos se evaluó en placa de 96 pocillos, mediante la inhibición de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de los parásitos en ensayo a 72 horas.

Las células vivas y metabólicamente activas reducen el MTT por las reductasas mitocondriales a formazán, compuesto de color azul oscuro e insoluble. La pérdida de viabilidad celular supone la inhibición de dicha reducción. Los parásitos (promastigotes tanto silvestres como transfectados con la construcción pTEX-*LiPolθ*), fueron crecidos en medio 199 suplementado con 20% de suero, hasta alcanzar la fase logarítmica tardía, momento en el que fueron recogidos por centrifugación (10 min a 2000g). Tras dos lavados con solución Hanks (137 mM NaCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.4 mM KCl, 4.2 mM NaHCO₃ pH = 7.2), las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio RPMI sin rojo fenol completo (RPMI sin rojo fenol, 2mM L-glutamina, 10% suero bovino fetal inactivado). Tras el recuento en cámara de Neubauer, los parásitos fueron diluidos a una concentración de 8×10^6 promastigotes/ml.

Los agentes genotóxicos diluidos en medio RPMI sin rojo fenol completo, se añadieron en los pocillos en un volumen final de 50 μ l y una concentración dependiente de compuesto. Tras la adición del compuesto se añadió 50 μ l de parásitos silvestres o transfectados (concentración final 4×10^6 promastigotes/ml). Para cada línea celular (silvestre - transfectada) y concentración de compuesto, se realizó un triplicado. La placa se incubó durante 72 horas a 27 °C, tras lo cual se añadió 50 μ l de una solución MTT 1.5 mg/ml en Hanks. Las células fueron incubadas durante 1:30-2:00 horas en oscuridad a 27 °C. El formazán resultante de la reducción de MTT por los parásitos fue solubilizado mediante la adición de 50 μ L de 10% (p/v) SDS e incubación a 25 °C en oscuridad (toda la noche). Finalmente, se valoró absorbancia a 595 nm en un lector de placas ELISA. El parámetro de actividad utilizado fue la EC₅₀, (concentración efectiva 50), el cual fue calculado mediante el programa XLfit.

La concentración final de los compuestos empleados fue:

Peróxido de hidrógeno: 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μ M.

Metil metanosulfonato: 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2.5 mM.

Etil metanosulfonato: 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, y 20 mM.

Etil nitrosourea: 0, 1, 2.5, 4, 5, 7.5 y 10 mM.

Cisplatino: 0, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 μ M.

Mitomicina C: 0, 0.5, 2.5, 5, 10, 20 y 50 μ M.

En el ensayo de viabilidad tras irradiación con luz UV, los parásitos una vez contados en cámara de Neubauer fueron diluidos a una concentración de 4×10^6 promastigotes/ml y en cada pocillo se añadieron 100 μ l. La irradiación por luz UV fue de: 0, 4.5, 9, 13.5, 18, 22.5 y 27 J/cm².

11. Infección de macrófagos RAW con promastigotes de *L. major* silvestres y transfectados.

Los macrófagos RAW crecidos a 37°C en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM glutamina y 5 mM NaHCO₃, fueron resuspendidos mediante la adición de tripsina-EDTA, recogidos por centrifugación (10 min a 700g) y lavados con PBS atemperado. Posteriormente se resuspendieron en medio completo a una concentración final de $0,4 \times 10^6$ macrófagos/ml y en una placa de 24 pocillos, en la que previamente se había colocado cristales de microscopía, se plaquearon 9 pocillos con un volumen de 0,5 ml por pocillo. Los macrófagos se incubaron durante 4 horas a 37 °C para permitir su adhesión a los cristales. Los parásitos fueron recogidos en fase estacionaria e incubados con PNA para el aislamiento de los promastigotes metacíclicos (ver apartado 8.1.2.2 de materiales y métodos). Los promastigotes metacíclicos fueron centrifugados, lavados con PBS y nuevamente centrifugados. Tras eliminar el sobrenadante por decantación se llevó a cabo el recuento de especímenes, los cuales fueron llevados a una concentración final de $1,6 \times 10^6$ promastigotes/ml con medio RPMI 1640 suplementado con 5% suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM glutamina y 5 mM NaHCO₃.

A las 4 horas de incubación de los macrófagos, se retiró el medio de cada uno de los pocillos junto con las células no adheridas a los cristales. De los 9 pocillos que contenía cristales con macrófagos adheridos, a 3 de ellos se les añadió 0,5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM glutamina y 5 mM NaHCO₃ (control negativo), a otros 3 pocillos se les añadió 0,5 ml de promastigotes metacíclicos silvestres y a los otros 3 pocillos se les añadió 0,5 ml de promastigotes metacíclicos transfectados (proporción promastigotes: macrófagos = 4:1). La placa se

incubó a 32 °C durante 4 horas para permitir que tuviera lugar la infección. Al cabo de ese tiempo, los pocillos fueron lavados dos veces con PBS atemperado para retirar los promastigotes libres, tras lo cual se les añadió 0,5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM glutamina y 5 mM NaHCO₃ y se dejaron incubando a 32 °C durante 72 h. Tras las 72 horas se retiró el medio y se añadió metanol para la fijación de las muestras. Al cabo de 5 minutos se eliminó el metanol y se dejó secar las muestras. Las preparaciones se cubrieron con 200 µl de tinción May-Grünwald al 100% y se incubaron durante 3 min. A continuación se retiró la solución y se añadieron 200 µl de tinción May-Grünwald al 50% en agua destilada. Al cabo de 2 min se retiró el colorante y se lavaron las muestras 2 veces con agua. Las preparaciones se dejaron secar y se tiñeron con Giemsa durante 20 min. Las muestras se lavaron nuevamente 2 veces con agua y se dejaron secar. Por último, una vez secas, se montaron con Depex.

12. Análisis informático.

Los alineamientos de secuencia se realizaron con el programa *Clustal Omega* y fueron posteriormente ajustados a mano con el programa *Jalview*. El árbol filogenético fue desarrollado con el programa *ClustalW2* y posteriormente editado con el programa *FigTree*.

4

Resultados

1. Análisis de los niveles de expresión y localización subcelular de la ADN polimerasa *LiPol* θ .

1.1 Comparación de la secuencia aminoacídica de la ADN polimerasa *theta* de tripanosomátidos.

En el año 2007 se publicaron los genomas de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* (Peacock y cols., 2007), facilitándose en gran medida la identificación de los genes de interés. A partir de la secuencia predicha en la base de datos GeneDB, se diseñaron los cebadores que permitieron la amplificación y el posterior clonaje del gen LinJ.24.0910. Este gen consta de 3516 pb y codifica para la proteína ADN polimerasa *theta* de *L. infantum* (*LiPol* θ), la cual presenta 1171 aminoácidos de longitud y un peso molecular de 125 kDa (figura 8). La proteína *LiPol* θ está constituida por una región N-terminal propia (residuos 1-617) que no presenta similitud con otras proteínas que no sean polimerasas θ de tripanosomátidos, y una región C-terminal (residuos 618-1171) que conforma un dominio polimerasa homólogo a las polimerasas de la familia A. En el extremo N-terminal se encuentra una región rica en aminoácidos Ser, Pro y Thr susceptible de ser fosforilada (residuos 1-200).

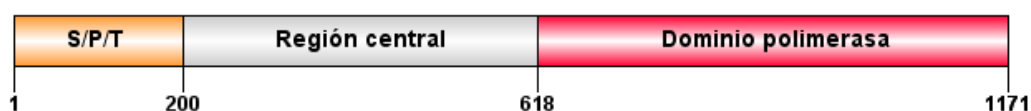


Figura 8. Representación esquemática de la proteína *LiPol* θ . En la imagen se muestra la región rica en aminoácidos serina, prolina y treonina (naranja), la región central (gris) y el dominio polimerasa (rojo). Los números en la parte inferior hacen referencia a los residuos aminoacídicos que delimitan cada región.

La comparación de la secuencia aminoacídica, deducida de los genes codificantes para la ADN polimerasa θ en diversos tripanosomátidos, indica que esta proteína se encuentra muy conservada en los organismos pertenecientes a esta familia. Concretamente, *LiPol* θ presenta más de un 90% de identidad con especies del subgénero *L. Leishmania*, un 76% con *L. Viannia braziliensis* y un 30-34% de identidad (44-51% de similitud) con distintas especies del género *Trypanosoma*. La figura 9 muestra la secuencia aminoacídica de *LiPol* θ en un alineamiento múltiple con las secuencias predichas de las polimerasas θ de diversos tripanosomátidos.

L.inf MPPKSARRGSATHALVPPALATEVAPSPPPAEPQSHRGRTRQESALLFWLEAACAAPVSR 60
L.maj MPPKSARRGSVAHALVPPALTEAAPSPPAEPQLHSRRTRQESALLFWLEAACAAPVSR 60
L.mex MPPKSARRGSVAHALMQPALATEAAPSPPRAEPQSHSRTRQESALLFWLEAACAAPVSR 60
L.brz ----- 0
T.cru -----MSLVTRFKKQGGVESVLFWASSLAKSQ--- 28
T.bru -----MKNLSIFSARRDDLSAFFWTDSLIKSC--- 28
T.con -----MSFTSNNGDESSVFWAGELQKLR--- 24

L.inf SSTNADRASASSSST-----TAAAATPVAETKREPSVDLASRPPPEEQLK 105
L.maj SSTNADRASASSSST-----TAAAATPVAETKREPSVDLVS RPPPEEQLK 105
L.mex TSTNADRASASSSST-----TAAAATPVAATKREPSVDLASRPPPEEQRE 105
L.brz ----- 0
T.cru -RTQAVPPSASGEVVPSPPLLFPAAAVAGCDD-ATPVDPQQKHHVEEEER-SRGDAEM 85
T.bru --GNIGSSGIHAS-----VTSKQKSPA-----ASTDRK 55
T.con --QECDDASIACS-----KDG--VESDKKQEAVEAIP--QKGFIE 59

L.inf QQPWHGGASTQOETATPEVSAAAGASAAEAPSTFLVQTVATKPPPPPGEMRLGGDTSGS 165
L.maj QQPRHGGASTQ-ETATPEVSAAAGASVEEAPSTFLVQTVTKPL-PPPGEIRGGGDASGS 163
L.mex QQQPHGDASTQ-ETAAPEVSAAAGASAAEASSTFLVQTVTTPP-PPPGETREGDGATGS 163
L.brz ----- 0
T.cru QPVTGNGGET-----TAEQKEDDGANVPGCQQEQQRTPVTETIWHVDSP-----ATS-S 134
T.bru RR-----RST---EFSTETLLIA---ETPVTTASKN-TVLTPSAS 88
T.con RS-----RSPPLQDEPFVKTLATQEVL-----DVLFSNEKSSPS 93

L.inf RKTADAPPTPGTEHPAPLPHLSWGTGPRRLVVADAVPLFDSL LAGRLGPVAVDVQLQGHT 225
L.maj RKTADAPPTPATEHPVPLPHLSWGTGPRRLVVADAVPLFDSL LAGRLGPVAVDVQLQGHT 223
L.mex RKTADAPPTPGIEHIPPHLSWGTGPRRLVVADAVPLFDSL LAGHLGPVAVDVQLQGHT 223
L.brz -----MPLFGTLLAGLLGPVAVDVQLQGHT 25
T.cru RSRADA AVAA-----TS-NVSKHRG-DYCRFKDVL MVCEPLLQGLLGPVGI DVEMNGTT 186
T.bru RALSPP-VASGPSCAE-----ISVRGFDDALS VSEDLFEGRLGPVAVDVVELGENT 137
T.con R-DQGVLS TDGVHSPVA-KKMRCEA-----TNVFSFSDKLFKALGPVMI DVELAGNV 144

L.inf RLSQQPQQFEAALQAYERQSTGALREALSSVQPFLLCNAGGGADMRVNHSEASGGGMDD 285
L.maj RLSRQPQQFEAVLQAYERQTISELREALSNVQPFLLCNAGGGADMRVNHSEASGGGMDD 283
L.mex RLLQQPQQFEAALQAYERQSAGELREALSSVQPFLLCNAGGGPGMRANHSGVSGGMDD 283
L.brz RLLQHPQLFEAALQAYERQSAGELREALRSVQPFLLCNTGGAADMC MNHSEALGGGV DG 85
T.cru AMLRDPNGFATALDSLEKASCDSLRFHDSIQLFFIIRG----- 225
T.bru SLMNDASAFSAALAEIDRGSASDVQKLNSSIKVMLLVGG----- 176
T.con SSLSDPSNFCMALLESDRAGAQLKEVNSSVTIQILAGE----- 183

L.inf DGHPQPAHGAAVLSNSSVLYTMDPASNYVPLPLLAQLLRAPQVTKLLLSRLLYRLLFLF 345
L.maj EDHPQTALGAAVLSTSPVLYTMHPANNYPVLPLLAQLLRAPQVTKLLLSRLLYRLLFLF 343
L.mex DGHPKTAFGAAVLSSTSSVLYTMHPANNYPVLPLLAQLLRTPQVTKLLLSRLLYRLLFLF 343
L.brz DGHPQAALGAA-----VLYTMHPANGYPVLPLLAQLLRAPQVTKLLLSRLLYRLLFLF 139
T.cru -----DSFYTLDSVCSPLVFLAKLLSVPANTKIVHQAPIYRLLFMF 268
T.bru -----EAYVFTPRDTFS-ITFLAKLLASENVTKVLLNGRPLYQLLFRF 219
T.con -----DFFYTLRPSSEYSPV-IFLAKLLSCSDVTKIVMCAQPLYQLLFRF 226

L.inf LGTDRVELSSVVDLPTWAALGQQLRPSLALLFHLPIEGVASLSDITAVLPSEARQLLHEE 405
 L.maj LGTDRVELSSVVDLPTWAALGQQRPSLALLFHVPIEGVGSFPDIAAALPSEARQLLDEE 403
 L.mex LGTDRVELSSVVDLPTWAALGQQRPSLALLFHLPIEGVGCWSDIEAVLPSEARQLLHEE 403
 L.brz LGTDRVELSSVVDLPTWTALGQQRPSLALLFHLPMESVNRLSDIAAVLPSEAQQLLNEE 199
 T.cru LGTDRVEVRNLVDISVWSAVVERVCGPRPYT-K----GFADSQSLWQSLPETSRESIEVQ 323
 T.bru LGTDRIDVRNLVDLSVWVQVIERVRGPIHAGIKC-----ANPKEAMMKLPESVRAQIQTR 274
 T.con LGTDRVEVRNVVDISLCVKVIACYRGKPYTTM----DS-IDIRDFCGFAEDIRKRIRAR 281

L.inf TQSMQQQPLHA-----TRPVGSESDSELDVQEASTDGSAGDKEDGG-DDARREGGD 459
 L.maj TQSMQQQPLHA-----TRPVGSESDSELDVQEASTDGSAGDTEDDGDDGRHEGGD 458
 L.mex TQSMQQQPLAT-----TRSVGSESESELDVQASTDGSAGDKEDGG-DDARHEGGD 457
 L.brz TESIAQQQPQEQQLPNQTRSMRLEDNSELDLGEASTDDTNGAGDRNDGGEDE-HDEGGS 258
 T.cru LEKA-----KQERWCEGT 336
 T.bru VNNS-----MVVLRGGGS 287
 T.con AEEI-----AAS-----S 289

L.inf ARAVAADGTAEDEPADAVQLLQRIPLAEQPLGGNSRNASG---ADFDSAARAVGVKRRLL 516
 L.maj AQAVAADGAAEDAPADAVQLLQRIPLAEQPLGGNKRNASG---ADFGSAVRAVGVKRRLL 515
 L.mex ARAVGADGAAEDEPADAVQLLQRIPLAEQPLDGNDRRASD---ADFGSATRAAGGKRRLL 514
 L.brz TRAVAADGAAEDEVDALIELLHRIQPLAEQPLNSNCSRVSGAAGTDSASAARTAGRKRRS 318
 T.cru -----LKAEEGE----- 343
 T.bru LP--ADG-----PLRQG-GGG----- 300
 T.con LE-----EYQ-----TQSEK-CCS----- 302

L.inf LRSRQRHRRRRYDSGPSLSSSSCANAPALADVHGLRTITLIFYVHVLRSRLLDVVDPGATG 576
 L.maj LRSRQRHRRRYPYDSGPSLSSSSCADAPALADVHGLKTTITLIFYAHVLSRLLDVVDPGATG 575
 L.mex LRSRQRHRRRRYDSGPSLSSSSCVDAPALADVHGLKTVTLFYAHVLSRLLDVVDPGATG 574
 L.brz LRSRQRHRRRHYDSDIPLSS-SLADASTLADYHGLKVMTLFFTHVLSRLLDIVNPGMTG 377
 T.cru -----ATMVLSSSSPSSSGEMPLPQLLGRFKSLATLYAYEAYLQSVES---SGATG 392
 T.bru -----QNMLE-MPPLPSIGSISDSQMEDRLCSFMALHEYYESFVKSVDD---DNPK-- 347
 T.con -----QNCSTTTQTTVSSSMYSKPVLRRELLCNLLSTYEFYDTHLKPVLE---SPLTK 351

L.inf VAAPSAGIAALSLATSRGGDAIASPVSAVRYRFSPELCAIRTYADFLCELMAYHGMFV 636
 L.maj VAAPSAGIAALPLATPRCGGDAITSPVSAAWRYRFSPELCAIRTYADFLCELMAYHGLFV 635
 L.mex VAAPSAGIAALPLATSRFGDVIIPSPVSAVRYRFSPELCAIRTYADFLCELMAYHGMFV 634
 L.brz VAAPRVGIGALPLTTSRCGSNVI GSPASAVRYRISPELCAIRTYADFLCELMAYHGMFV 437
 T.cru -----NVFMSLFTVCSLETRVSVFLCEVMYHGMFV 422
 T.bru -----VSSVCSLPAVCHLETSSVAFLCEVMYHGMFV 378
 T.con -----SATASLRSQCILQTEVSVFLCEVMYHGMFV 381

L.inf NDTVAHGMLTALDVQMAAIEDVGLRVAAVLAATEPAVPSATAEKAEGQWSEIEMVYKCL 696
 L.maj NDTVAHGMLTALDVQMAAIDDVGMRVAAAIMATTEPAAPSATAEKAEGCQWSEIEMVYKCL 695
 L.mex NDTVAHGMLTALDVQMAAIEDVGLRVAAAVLATAEPAAPSATTEKGEGRKWSMELVHQCCL 694
 L.brz NDTVTHKMLTLLDVQMATIEDLGLRVAAALLATTDPVAPSTTPEAECSKWNVGVAVHRCL 497
 T.cru EKNMLDSMVADLEQKIKALIEKGNVALRAMATA---SNESI--DMETVDAWNL---IKTL 474
 T.bru RKTAFELMTKDLLEDQIEKISDYGKTLLDASPCS-KYSGGSF--SVREA---TAEVMVDCL 432
 T.con KKKLLDSMMKDLNAQITDIAEYLSEITASSPSQ-ESGVPKI--NVLTA---SAEDVVTYL 435

L.inf ARLTAAATPEMPRAVNAHYLRLLAAQAKQSSCARAEQLRLGCQLVCVWMAAYLDRATTRN 756
 L.maj ARLNAAATPEIPRAVNVQYLRVLAQAQKQSSGARAEQLRLGCQLVCVWMAAYLDRATTRN 755
 L.mex TRLTAAATPEMPRAVNIHYLRLLAAQAKQSSCARAEQLRLGCQLVCVWMAAYLDRAANRN 754
 L.brz ARLTAASTMFEIPRALNAHYLRLLAAQAKHSNCVRAAQFRLGCQLVCAWMAAYLDRVTAKK 557
 T.cru -QSQFGGPWTFKAGNVEEQMQ----QIGAY---LDEKQSCADSNVARIWLAHERREFKFR 526
 T.bru -RDTYGYNLS-VNGSFDKQLQ----KFYRG---AGKGNESGRKLAHVWLAIRERTDFMR 482
 T.con -RCRYRHTFP-RDGEWEKQLE----NFCQN----ESDDTSPGKLFGRAMWLAHERLQFQK 485

L.inf RLHDMFRKVVADKLHVCVLEKPRDSAAEDGP-----AVSDASTAQVSRVCYSMHPNWWLH 810
 L.maj RLHDMFRKVVADKLHVCVLEKPRDAAEDGT-----AVPDAWTAQASQVCYSMHPDWWLH 809
 L.mex RLHDMFRKVVADKLHVCVLEKPRDAAENGNT-----AVSDASTAQVSRVCYSMHPDWWLH 808
 L.brz RLHDMFSKVSDDLRLHVRLEKPRDAAVEDDV-----AAPDAPMPQVSEVCYSIHPDWWLH 611
 T.cru SLMEGFTKGAASMQRARLIIVPEEMASTE-----GGGHSNPHHVGAAQYR-LFFSVHAKWSVH 580
 T.bru TLRSNVENMNMLDRIVDVATQVASNEEDEGANDCSGSGGSSVGSSTKKAACYSVHPHWAVH 542
 T.con ALRGSMENINLIHRVVDVGTRSQEKTEENESCPSGSGSTCDSAGSSTKKVYLLSVHPQWSVH 545

2

L.inf NKSTGRIFSAIPNVQNLKQPPRTTFPIHALSATPSRNS--GGDESLQPYGYVDPPTTEED 868
 L.maj NTSTGRIFSAIPNVQNLKQPPRTMFPPIHALSATPSRNS--GGDESLRPYSHIDPPTTEED 867
 L.mex NTSTGRIFSSLPNVQNLKQPPRTAFPIHTLSATPSRNS--GGDESLRHYSYVDPPTTEED 866
 L.brz NTSTGRIFSAIPNVQNLKQPPRTAFPIHALSATQDRSSNGGDESLRPYGYVDSPTTEED 671
 T.cru HATTSRFLCSRPCLOTVAKNPPIS-RTAP----- 608
 T.bru HTSTGRLYCSRPNLOTVPKTAQKCTYVSP----- 571
 T.con HNTTGRLYCSRPNLOTVPKPKSKCIYLN----- 574

3 (A)

L.inf VDRWLSLAEAAAVDQASSVQFPLFPENEPQWTLRHLHCAPPGCCLLASFDNFQIELRLLAHI 928
 L.maj VERWLSLAEAAAVDQASPAQFPLFPENEPQWTLRHLHCAPPGCCLLASFDNFQIELRLLAHI 927
 L.mex VARWLALAEAAALVDQASSAQFPLFPENEPQWTLRHLHCAPPGCCLLASFDNFQIELRLLAHI 926
 L.brz VDRWLSLAEAGVIDQASSAQFLLFPEHPQWTLRHLHCAPPGCCVLSFDNFQIELRLLAHI 731
 T.cru -----SSSPVTFIT-NPEWTLRHLHGPPGCTLVSFDFNQIELRVAHI 652
 T.bru -----LTSYGLLFT-NPEWTLRHLHGPAAGCVLLSFDFNQIELRVLAHI 615
 T.con -----KNANSGHIF-NPEWTLRHLHGPPGCTILSVDFNQIELRVLAHI 618

4 (B)

L.inf SGDAALQEHLISANVDVIALVTASVLRRLPSIDHVRPEQRQAVKVIIVYGLLYGMGPESMDVR 988
 L.maj SGDAALQEHLISANVDVIALVTASVLRRLPSIDRVREQRQAVKVVYGLLYGMGLESMDVR 987
 L.mex SGDAALQEHLISANVDVIALVTASVLRRLPSIDHVRPEQRQAVKVIIVYGLLYGMGPESMDVR 986
 L.brz SGDSALQEHLISNVDVIALVTASVLRRLPSIDHVRPEQRQAVKVIIVYGLLYGMGPELMDVR 791
 T.cru SGDPILLVQQLRGGSDVLAEMALRVMQLPRLADVTPYLRQGTKVYVYGLLYGMGPESLDLR 712
 T.bru SGDELLIQHLSSEYDVLISAMTRHLTGLSDDEQVPHLRETQVYVYGLFYGMGLATMKER 675
 T.con SGDRRLIEQLSNEYDVLIAITRRIADI PNENAVPEPSLREAKVIVYGLVYGMGTSQMQR 678

L.inf IKKINEEFATSEQQ-QHR--GEAASSAPAPMAARDLLRRFHRVYPRIEENYLRETRQEALR 1045
 L.maj IKKINEEFAASEQQ-QHR--GEAASSAPAPMPARDLLRRFHRVYPRIESYLRETRQEALR 1044
 L.mex IKKINEEFATSEQQ-QHRGGEASSPGPAPMSAHDLLRRFHRVYPRIESYLRETRQEALR 1045
 L.brz IRKINEEFATAEQQQHDREGAASSDPESASARDLLRRFYHAYPRVESYLRETRQEAQN 851
 T.cru LRQLHKETT-----PSAEQPPLSARQFLRSFNQCYPAVQGFLLRSTRLRAFH 758
 T.bru VKILMSAH-----SVPSSQRKITAADTLRAFHRQRYPAAGKFLTRARIRAFH 722
 T.con IENLTVENE-----EERALTRKYKAHTLVNEFHAFYGVAAKYLAVNBLAAFH 725

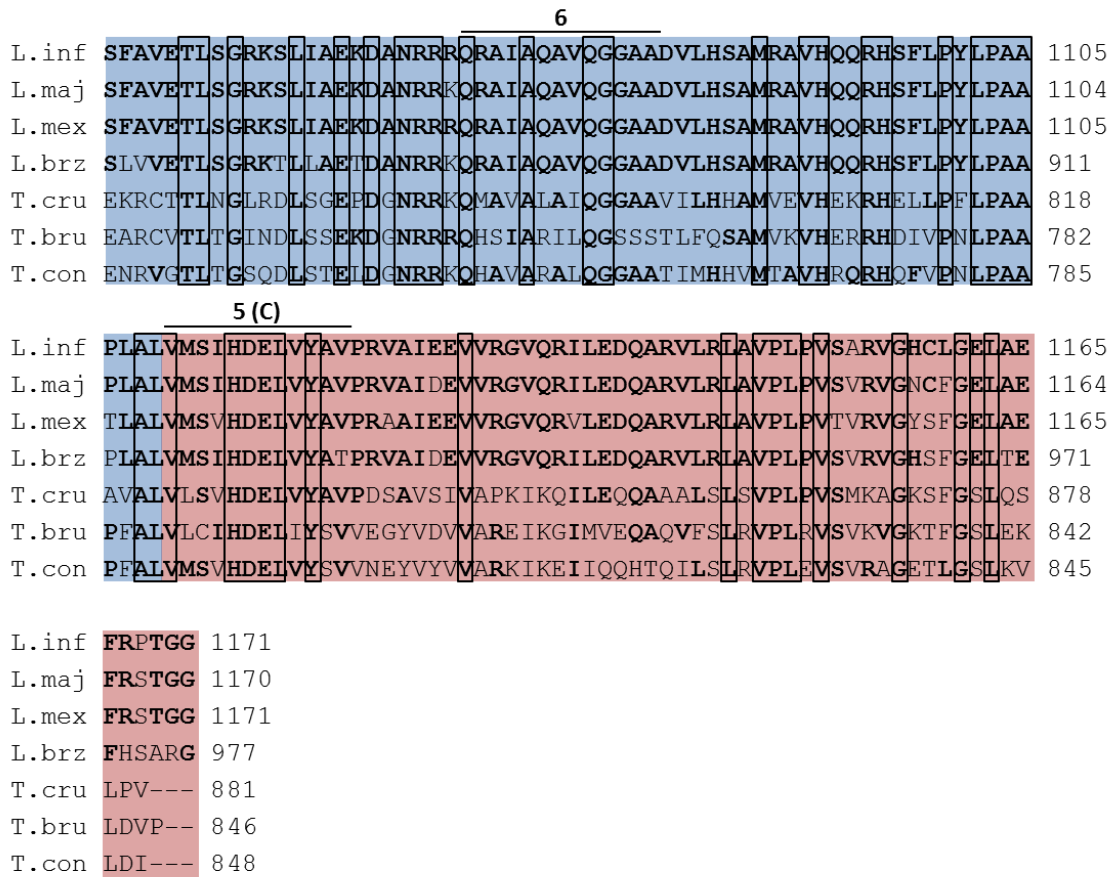


Figura 9. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de LiPol θ y de ADN polimerasas θ de diferentes tripanosomátidos. En naranja se resalta el extremo amino terminal rico en prolina, serina y treonina susceptible de sufrir modificaciones post-traduccionales. El símbolo (▼) indica el inicio del dominio polimerasa, el cual posee los seis motivos conservados en las polimerasas de la familia A (números 1-6 situados en la parte superior) y se compone de los subdominios pulgar (verde), palma (rojo) y dedos (azul). Los residuos idénticos respecto a LiPol θ se indican en negrita. Los residuos conservados en todas las polimerasas θ se engloban con un recuadro negro. Los números indican la posición relativa de los residuos en función del extremo N-terminal de cada ADN polimerasa. Las secuencias alineadas pertenecen a: *Leishmania infantum*, *Leishmania major* ([LmjF.24.0890](#)), *Leishmania mexicana* ([LmxM.24.0890](#)), *Leishmania braziliensis* ([LbrM.24.0900](#)), *Trypanosoma cruzi* ([TcCLB.508647.170](#)), *Trypanosoma brucei gambiense* ([Tbg972.11.6260](#)) y *Trypanosoma congolense* ([TcIL3000.11.5840](#)).

Como se observa en la figura 9, el extremo C-terminal (residuos 618-1171) se encuentra altamente conservado en las polimerasas θ de tripanosomátidos y en él se localizan los 6 motivos característicos de las polimerasas de la familia A (Delarue y cols., 1990; Patel y cols., 2001). La comparación de secuencia con otras polimerasas de la misma familia permite subdividir desde el punto de vista estructural el dominio polimerasa en tres

subdominios: pulgar, palma y dedos (Steitz, 1999). El extremo N-terminal, por su parte, muestra mayor variabilidad, debido principalmente a inserciones en las polimerasas θ del género *Leishmania*. *LiPol* θ , al igual que las polimerasas θ de *L. major* y *L. mexicana*, posee en este extremo una región rica en prolina, serina y treonina (residuos 1-200) la cual podría constituir un dominio diana de modificaciones post-traduccionales que regulasen su actividad.

1.2 Clonaje y expresión del gen *LiPol* θ .

El gen que codifica la proteína *LiPol* θ fue amplificado a partir de ADN genómico extraído de *L. infantum* y clonado en el vector pRSET C, el cual permite la expresión de la proteína recombinante fusionada a una cola de 6 histidinas en su extremo N-terminal. La construcción pRSET C - *LiPol* θ se introdujo inicialmente en bacterias *E. coli* DH5 α y se comprobó mediante secuenciación que no se habían producido errores de copia durante el proceso de amplificación del gen. Posteriormente se llevó a cabo la transformación con la construcción pRSET C - *LiPol* θ de bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS, las cuales posibilitan la expresión de la proteína.

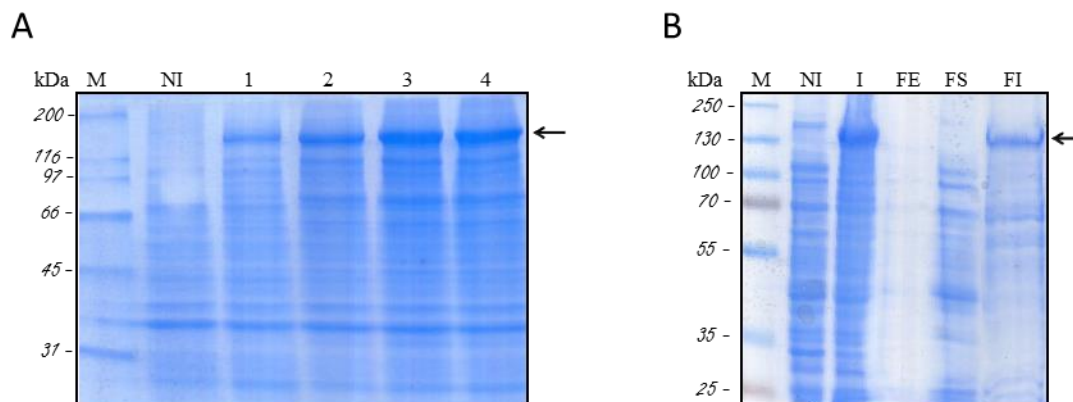


Figura 10. Expresión de la proteína recombinante 6xHis-*LiPol* θ en *E. coli*. A. Expresión de 6xHis-*LiPol* θ a 30 °C y diferentes tiempos de inducción. M: marcador de peso molecular. NI: extracto proteico de cultivo de *E. coli* no inducido. 1-4: extractos proteicos de cultivo de *E. coli* inducido 1-4 horas. B. Análisis de solubilidad de la proteína sobre-expresada 6xHis-*LiPol* θ . Tras llevar a cabo la inducción de la proteína se realizó un análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones extracelular (FE), soluble (FS) e insoluble (FI) del cultivo, observándose la presencia de 6xHis-*LiPol* θ en ésta última. M: marcador de peso molecular. NI: extracto no inducido. I: extracto inducido. La flecha indica la posición de la proteína 6xHis-*LiPol* θ .

Como se puede observar en la figura 10A, los extractos proteicos correspondientes a cultivos de *E. coli* inducidos con IPTG (calles 1 - 4) presentan un polipéptido del tamaño esperado para 6xHis-LiPolθ (≈ 125 kDa) que no está presente en el cultivo no inducido. Al llevar a cabo la lisis de las bacterias inducidas y separar la fracción soluble de la insoluble, se observó que la proteína aparecía en ésta última (figura 10B). En las diferentes condiciones de expresión que se ensayaron, la proteína 6xHis-LiPolθ se halló siempre de forma insoluble. Debido a ello, se decidió llevar a cabo la expresión en las condiciones que permitían obtener una mayor cantidad de proteína (3 horas a 30 °C) y solubilizar posteriormente la misma con hidrocloreuro de guanidina.

1.3 Purificación de la proteína recombinante 6xHis-LiPolθ y obtención de un anticuerpo policlonal anti-LiPolθ.

La purificación de 6xHis-LiPolθ se efectuó mediante cromatografía de afinidad en resina de agarosa-IDA activada con níquel (figura 11A). En las fracciones de elución, junto a la proteína 6xHis-LiPolθ, aparecían en baja proporción otros productos de menor tamaño. El análisis mediante *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-poli-histidina reveló que estos productos correspondían a fragmentos incompletos de 6xHis-LiPolθ (figura 11B). Estos productos pueden haberse generado como consecuencia de la degradación de la proteína completa o de la síntesis abortiva de la proteína recombinante.

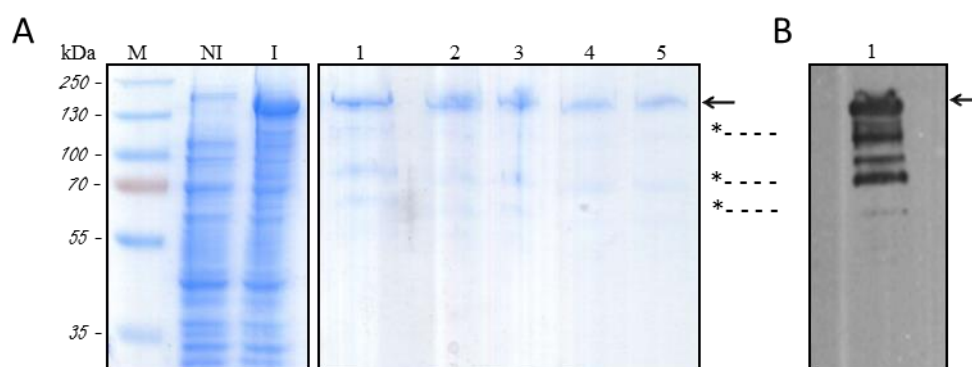


Figura 11. Purificación de la proteína recombinante 6xHis-LiPolθ. **A.** Análisis electroforético de las fracciones de elución obtenidas en la purificación de la proteína 6xHis-LiPolθ mediante cromatografía de afinidad en resina de agarosa-IDA-Ni²⁺. M: marcador de peso molecular. NI: no inducido. I: inducido. Calles 1-5: fracciones de elución. **B.** *Western blot*, realizado con un anticuerpo monoclonal anti-poli-histidinas, de la primera fracción de elución de la purificación de 6xHis-LiPolθ. La posición de 6xHis-LiPolθ, viene indicada por una flecha, mientras que los productos de menor tamaño están señalados por asteriscos.

El análisis mediante *Western blot* (figura 11B) indicó que los fragmentos de menor tamaño observados correspondían a formas incompletas de 6xHis-*LiPol* θ . No obstante, para confirmar que no hubiese proteínas contaminantes de *E. coli*, se decidió purificar la forma completa de la proteína a partir de gel de poliacrilamida mediante electroelución (figura 12A). El producto obtenido de la electroelución fue analizado mediante MALDI-TOF/TOF para verificar la pureza de la muestra. Una vez confirmado que la banda con peso molecular de 125 kDa correspondía únicamente a 6xHis-*LiPol* θ , la proteína fue empleada para la generación de un anticuerpo policlonal en conejo *New Zealand white*. La especificidad del anticuerpo obtenido fue evaluada mediante *Western blot* del extracto crudo de bacterias *E. coli*, transformadas con la construcción pRSET C – *LiPol* θ , no inducidas e inducidas (figuras 12B y 12C).

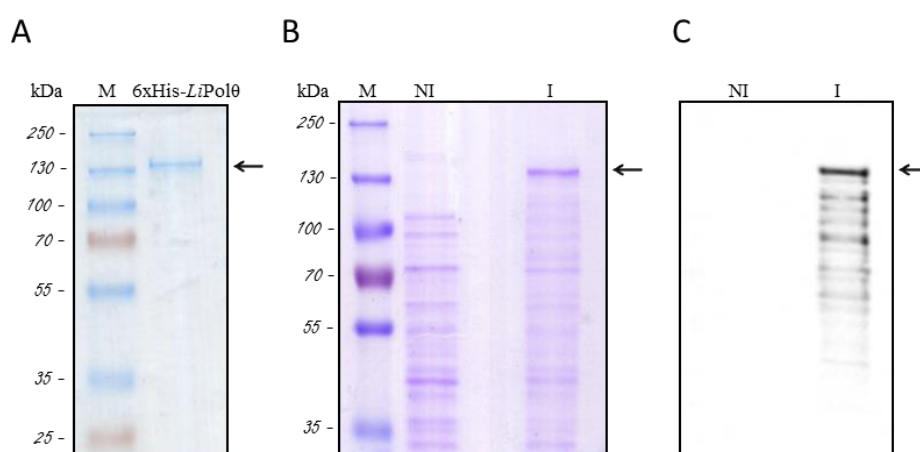


Figura 12. Generación de un anticuerpo policlonal anti-6xHis-*LiPol* θ . **A.** Forma completa de 6xHis-*LiPol* θ electroeluida a partir de geles de poliacrilamida. M: marcador. **B.** Análisis mediante SDS-PAGE del extracto crudo de bacterias *E. coli*, transformadas con la construcción pRSET C – *LiPol* θ , no inducidas (NI) e inducidas (I) **C.** *Western blot* correspondiente a las muestras de la figura 12B, realizado con el suero obtenido del conejo inmunizado con la proteína recombinante 6xHis-*LiPol* θ . La flecha indica la posición de la proteína 6xHis-*LiPol* θ .

Como se puede ver en la figura 12C, el suero obtenido no produce reacción cruzada con proteínas de *E. coli*, puesto que no se detecta señal en el extracto no inducido, mientras que sí se observan las bandas correspondientes a 6xHis-*LiPol* θ y sus productos incompletos en el extracto inducido.

Habiéndose observado que el suero reconocía la proteína recombinante 6xHis-*LiPol* θ expresada en *E. coli*, se evaluó la capacidad del mismo para la detección de la proteína

LiPolθ endógena de *Leishmania*. Para ello, se obtuvo el extracto proteico de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica y posteriormente se realizó el análisis electroforético de 4 réplicas de 10 µg de proteína en dos geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie mientras que el otro se analizó mediante *Western blot* con el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ*.

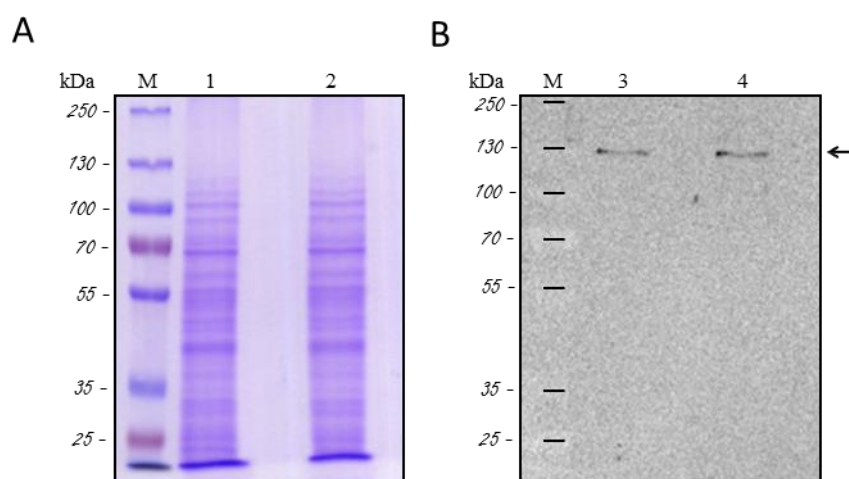


Figura 13. Detección de la proteína *LiPolθ* en extractos de *Leishmania*. A. Análisis mediante SDS-PAGE de 10 µg de extracto proteico de promastigotes de *L. infantum* (dos réplicas). B. *Western blot* correspondiente a dos muestras equivalentes a las de la figura 13A, realizado con el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ*. M: marcador. 1 - 4: réplicas de 10 µg de extracto proteico de *Leishmania*. La flecha indica la posición de *LiPolθ*.

El suero obtenido a partir de conejo inmunizado con la proteína recombinante 6xHis-*LiPolθ* reconoce una única proteína de aproximadamente 125 kDa en los extractos proteicos de *Leishmania* (figura 13B), por lo que concluimos que el anticuerpo policlonal generado es válido para la detección específica de *LiPolθ* en *Leishmania*.

1.4 Análisis de los niveles de expresión de *LiPolθ* a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum*.

El nivel de expresión de la proteína *LiPolθ* durante el ciclo de vida de *L. infantum* fue evaluado mediante *Western blot* a partir de extractos proteicos tanto de promastigotes procíclicos y metacíclicos como de *amastigotes-like*.

Para determinar la expresión relativa de *LiPolθ* en el estadio promastigote, en primer lugar se llevó a cabo la purificación de la lectina de cacahuete (ver apartado 8.1.2.1 de Materiales y métodos). Posteriormente se inició un cultivo de promastigotes en medio completo, a partir del cual se obtuvieron diariamente los extractos proteicos correspondientes a 2×10^8 promastigotes. Al alcanzar el cultivo la fase estacionaria (día 6), se llevó a cabo el aislamiento de los promastigotes metacíclicos mediante selección negativa por aglutinación con lectina de cacahuete de los promastigotes procíclicos (ver apartado 8.1.2.2 de Materiales y métodos). Finalmente se obtuvieron los extractos proteicos de ambas subpoblaciones (procíclica y metacíclica).

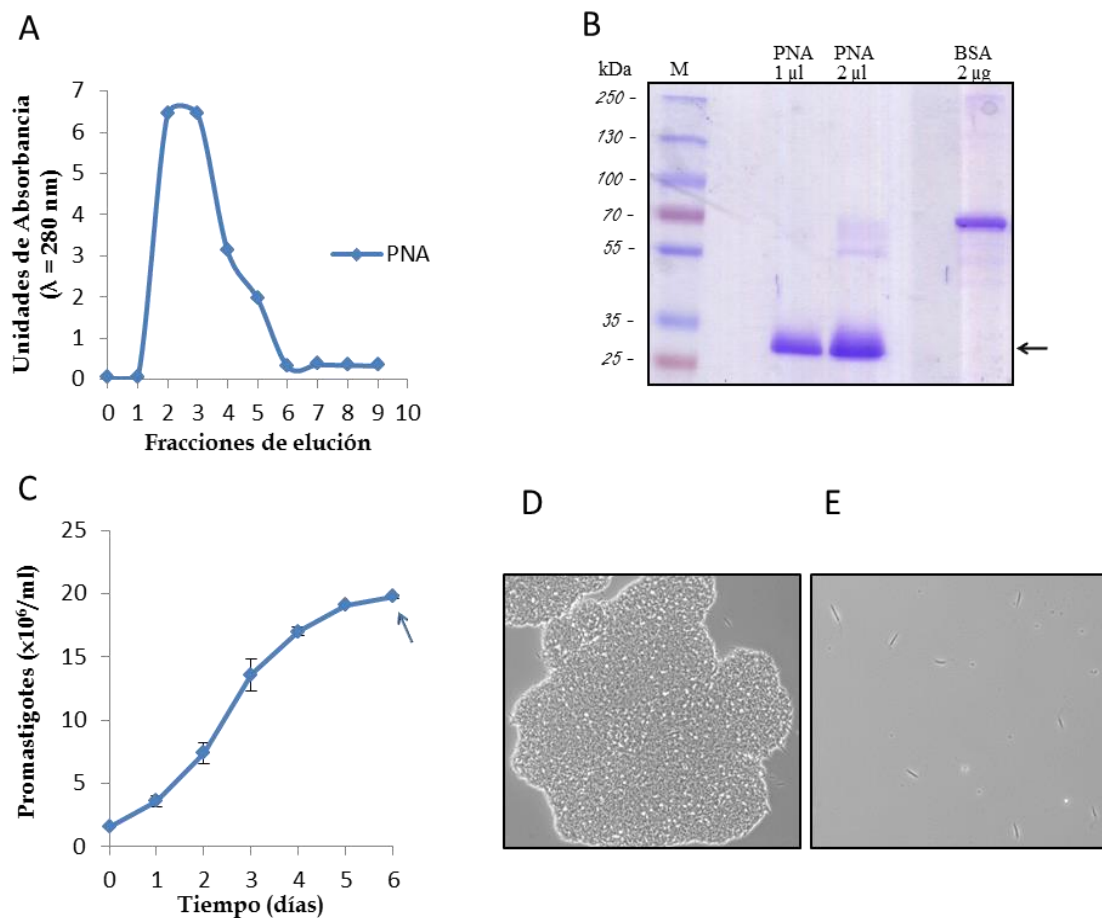


Figura 14. Aislamiento de promastigotes procíclicos y metacíclicos. **A.** Curva de elución de la lectina de cacahuete (PNA), tras su purificación en columna de melibiosa inmovilizada en agarosa. **B.** Análisis electroforético de la proteína PNA purificada. La proteína BSA se empleó como control de concentración. La flecha indica la posición de la proteína PNA. **C.** Curva de crecimiento de promastigotes de *L. infantum*. La flecha azul indica el día en el que se realizó el aislamiento de promastigotes procíclicos y metacíclicos (fase estacionaria). **D.** Promastigotes procíclicos aglutinados (PNA⁺). **E.** Promastigotes metacíclicos no aglutinantes (PNA⁻).

La concentración de proteínas de los extractos obtenidos fue cuantificada mediante el método de BCA. Las muestras (10 µg de cada una) fueron analizadas por duplicado mediante SDS-PAGE. Uno de los geles fue empleado como control de carga tras tinción con azul de Coomassie, el otro fue analizado mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-*LiPolθ*.

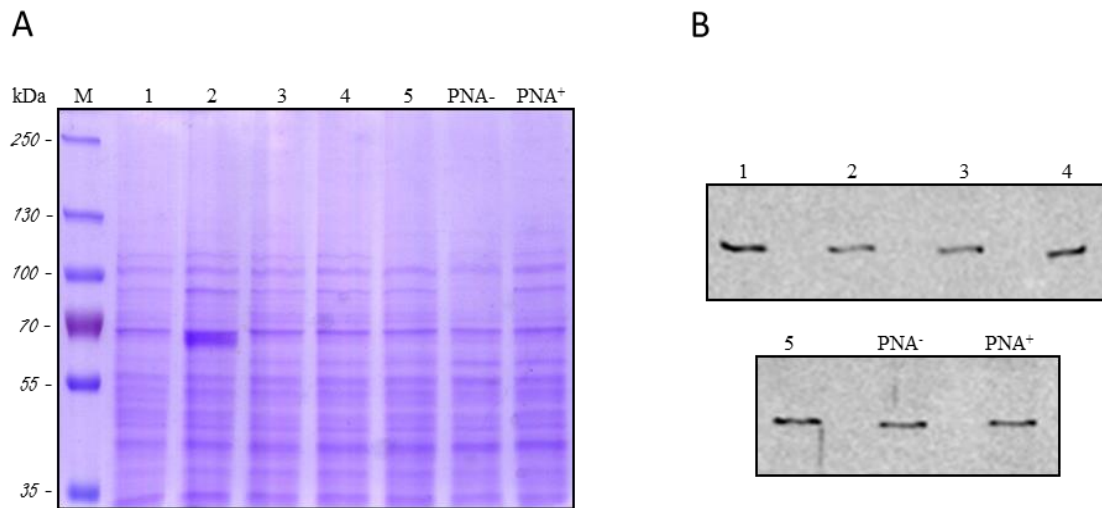


Figura 15. Expresión de *LiPolθ* en promastigotes de *L. infantum* a lo largo de la curva de crecimiento. **A.** Análisis mediante SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos de promastigotes a lo largo de la curva de crecimiento. **B.** *Western blot* correspondiente a las muestras de la figura 15A, realizado con el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ*. M: marcador. 1-5: extractos proteicos de promastigotes obtenidos los días 1-5 de la curva de crecimiento. PNA⁻ y PNA⁺: extractos proteicos de promastigotes metacíclicos y procíclicos respectivamente, obtenidos ambos el sexto día de la curva de crecimiento.

Como se observa en la figura 15B, la proteína *LiPolθ* se expresa de modo constitutivo, presentando unos niveles similares a lo largo de la curva de crecimiento de los promastigotes.

Para poder evaluar el nivel de expresión de *LiPolθ* en el estadio amastigote, en primer lugar, se llevó a cabo la diferenciación del parásito de la forma promastigote a la forma de tipo amastigote (o *amastigote-like*) en cultivo axénico. Para ello se dispuso un cultivo de promastigotes en medio completo a pH 5.5 y se incubó a 37 °C durante 96 horas. Como control se llevó en paralelo un cultivo de promastigotes en las condiciones habituales (pH = 7.2 y 27 °C). Transcurrido ese tiempo, se comprobó que las células

incubadas a 37 °C y pH ácido poseían una morfología redondeada, con flagelo generalmente no emergente, de forma similar a los amastigotes y se procedió a la obtención de los extractos proteicos.

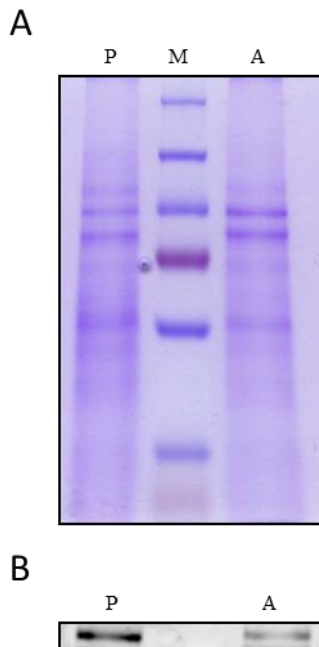


Figura 16. Expresión de *LiPolθ* en *amastigote-like*. A. Análisis electroforético de extractos proteicos de promastigotes (P) y de formas *amastigote-like* (A). B. *Western blot* de los extractos proteicos correspondientes al gel de la figura 16A, realizado con el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ*.

La proteína *LiPolθ* se expresa también en el estadio amastigote (figura 16B), aunque en niveles inferiores (aproximadamente dos veces menor) con respecto al estadio promastigote.

1.5 Localización subcelular de *LiPolθ*.

Con objeto de determinar la localización subcelular de la proteína, se llevó a cabo la detección de la misma mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello se utilizó el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ* como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 488 como secundario. En las muestras empleadas como control negativo, se sustituyó el anticuerpo anti-*LiPolθ* por suero preinmune. En ambos casos se realizó de manera simultánea el marcaje del ADN celular, nuclear y mitocondrial, con DAPI.

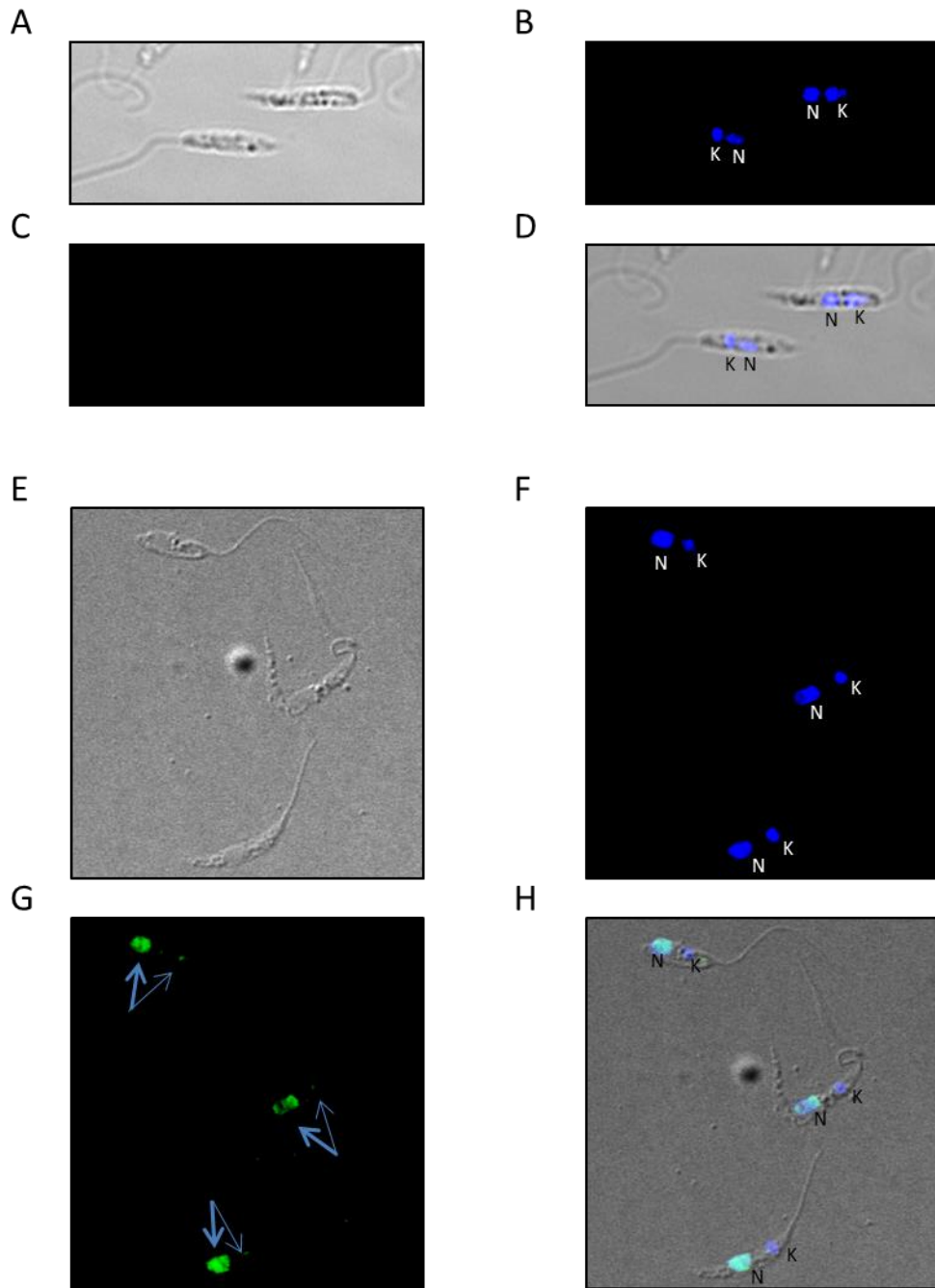


Figura 17. Localización subcelular de *LiPolθ*. **A y E.** Imagen de contraste interdifereencial. **B y F.** Localización con DAPI del ADN celular, ya sea perteneciente al núcleo (N) o al kinetoplasto (K). **C y G.** Detección de fluorescencia emitida por Alexa 488 habiéndose empleado como anticuerpo primario suero preimmune (control negativo) o anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ* respectivamente. **D.** Superposición de las imágenes A, B y C. **H.** Superposición de las imágenes E, F y G.

En las muestras en las que se empleó anticuerpo anti *LiPolθ* como anticuerpo primario se detectan dos focos de fluorescencia en el espectro de emisión correspondiente a Alexa 488. Uno de los focos, el de mayor intensidad, co-localiza con el núcleo del parásito; el otro en cambio, co-localiza con el kinetoplasto. En las muestras empleadas como control negativo, no se detectó fluorescencia correspondiente a Alexa 488. Por ello, concluimos que la proteína *LiPolθ* se encuentra localizada principalmente en el núcleo, aunque una pequeña fracción de la misma se halla también en la mitocondria del parásito.

2. Características generales de la actividad *in vitro* de *LiPolθ*.

2.1 Determinación de la actividad ADN polimerasa intrínseca de *LiPolθ*.

2.1.1 Expresión de *LiPolθ* en sistema libre de células.

Para comprobar que la proteína codificada por el gen LinJ.24.0910 poseía actividad ADN polimerasa, se llevó a cabo a modo de primera aproximación, la expresión de la misma como proteína de fusión mediante el sistema libre de células *TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System*.

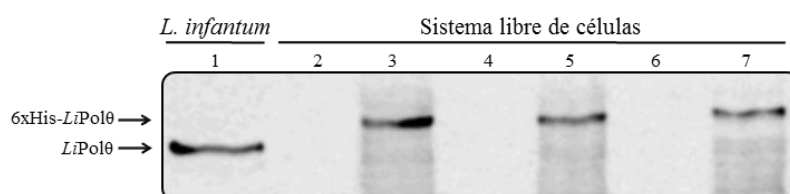


Figura 18. Expresión de 6xHis-*LiPolθ* en sistema libre de células. La detección de 6xHis-*LiPolθ* se realizó mediante *Western blot* empleando el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ*. Calle 1: extracto proteico de *L. infantum* (control positivo). Calles 2, 4 y 6: sistema libre de células en ausencia de la construcción pRSET C - *LiPolθ* (control negativo). Calles 3, 5 y 7: sistema libre de células en presencia de la construcción pRSET C - *LiPolθ*.

Como se observa en la figura 18, *LiPolθ* se expresa en el sistema libre de células. La diferencia de tamaño mostrada con respecto a la proteína endógena de *L. infantum* es debida a la cola de 6 histidinas incorporada por el vector pRSET C en el extremo N-terminal de la proteína recombinante.

2.1.2 Actividad ADN polimerasa de 6xHis-*LiPolθ* expresada en sistema libre de células.

Una vez expresada *LiPolθ*, se evaluó su actividad ADN polimerasa sobre moléculas tipo molde/cebador abierto. Como control de la actividad polimerasa basal que pudiera estar presente en el sistema libre de células, se ensayó también un volumen equivalente

del mismo que fue llevado en paralelo, en ausencia de vector, durante la expresión de *LiPolθ* (carriles 2, 4 y 6 de la figura 18).

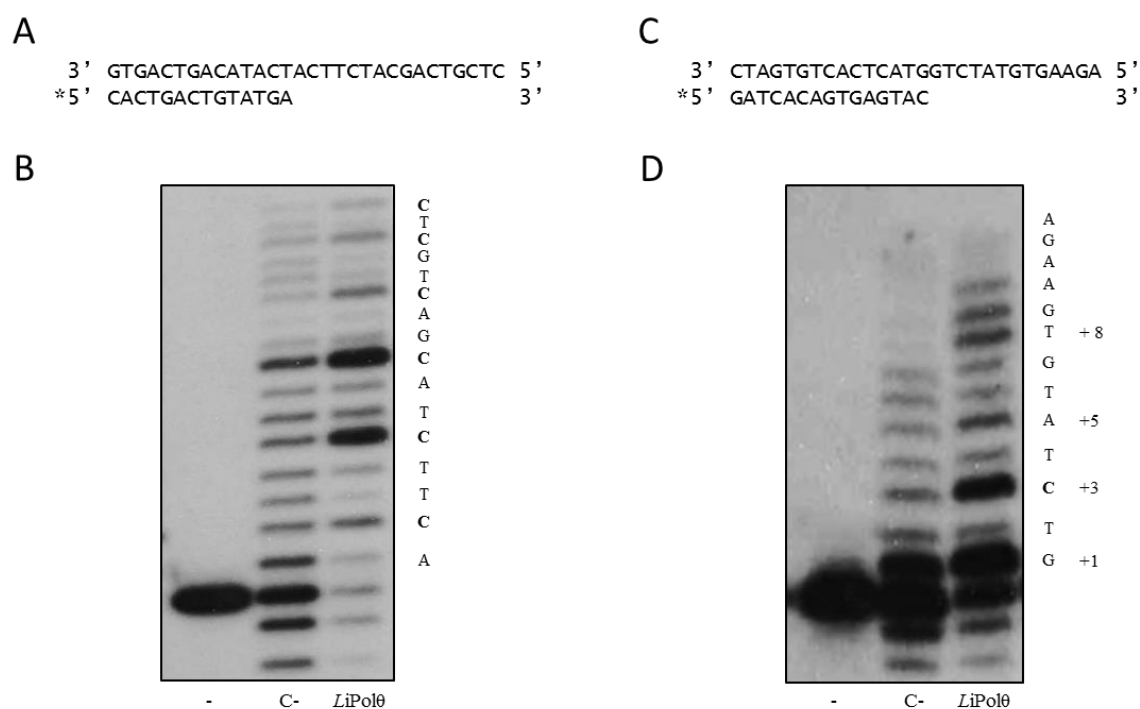


Figura 19. Actividad ADN polimerasa asociada a 6xHis-*LiPolθ*. **A y C.** Secuencias de la moléculas de ADN utilizadas como sustrato en cada uno de los ensayos. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y D.** Ensayos de extensión de cebador. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.4 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 8 mM Mg²⁺, 10 μM de dNTPs, 5 nM de ADN y 5 μl de reacción de sistema libre de células sin vector (C-) o 5 μl de reacción de sistema libre de células con la construcción pRSET C - *LiPolθ* (*LiPolθ*).

En los ensayos de actividad ADN polimerasa realizados (figuras 19B y 19D), se observa la presencia de una actividad polimerasa propia del sistema libre de células (C-). No obstante, la fracción de sistema libre de células empleada en la expresión de 6xHis-*LiPolθ* posee una mayor actividad polimerasa (mayor porcentaje de sustrato extendido) y un patrón de polimerización claramente diferenciado. En este sentido, cabe destacar el ensayo representado en la figura 19B, donde se observan varias bandas de mayor intensidad relativa, correspondientes todas ellas a la inserción frente a la base molde dC. Dicho patrón de polimerización ha sido previamente observado para la *hPolθ* en este mismo sustrato, lo que llevó a sugerir que la polimerasa tiende a liberarse del ADN tras la inserción de un nucleótido frente a la base molde dC (Seki y cols., 2004; Seki y

Wood, 2008). Esta característica, conservada en *LiPolθ*, debe ser dependiente del contexto de secuencia, al no observarse en todos los sustratos (figura 19D).

El aumento de la actividad polimerasa como consecuencia de la expresión de *LiPolθ*, confirma que el producto del gen LinJ.24.0910 posee una actividad ADN polimerasa intrínseca.

2.2 Expresión de LiPolθ en condiciones nativas.

Tras confirmar que la proteína *LiPolθ* posee una actividad ADN polimerasa intrínseca, se llevaron a cabo dos estrategias distintas con el fin de obtener la proteína en condiciones nativas para su posterior purificación y estudio de la actividad:

- Expresión de *LiPolθ* en la levadura *Pichia pastoris*.
- Expresión de *LiPolθ* en bacteria *E. coli*.

2.2.1 Expresión de LiPolθ en Pichia pastoris.

Se eligió el modelo de *P. pastoris* para expresar la proteína *LiPolθ* por tratarse, al igual que *Leishmania*, de un organismo eucariota, por lo que podía ser un sistema apropiado para la obtención de la proteína.

P. pastoris es una levadura capaz de emplear metanol como única fuente de carbono. Para ello posee entre otras proteínas, dos enzimas alcohol oxidasa prácticamente idénticas a nivel de secuencia, pero cuyo nivel de expresión es muy diferente. El gen AOX1 es el responsable del 85% de la actividad alcohol oxidasa, mientras que el gen AOX2 es responsable del 15% restante (Inan y Meagher, 2001). El gen de interés puede ser clonado en vectores que contienen, entre otros componentes, el promotor y la secuencia de ADN situada en 3' con respecto a la señal de terminación de la transcripción del gen AOX1 y posteriormente ser integrado en el genoma de *P. pastoris*. Dependiendo de cómo tenga lugar dicha integración se pueden generar dos tipos de transformantes: Mut⁺ (*methanol utilization plus*), y Mut^s (*methanol utilization slow*). Si la integración se produce mediante un proceso de recombinación homóloga simple, se generarán transformantes Mut⁺; en cambio, si la integración se produce mediante un proceso de recombinación doble entre las regiones correspondientes a las secuencias situadas en posición 5' y 3' con respecto al gen AOX1 del vector y del genoma, se

generarán transformantes Mut^s. Este segundo caso conlleva la pérdida del gen AOX1 endógeno (y la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa). La proteína de interés es expresada al inducir el cultivo con metanol.

2.2.1.1 Obtención de transformantes Mut⁺ y Mut^s.

El gen que codifica para *LiPolθ* fue amplificado y posteriormente clonado en el vector pPIC9 (ver apartado 3.2.2 de Materiales y métodos). Tras comprobar la ausencia de mutaciones, se digirieron 10 µg de plásmido pPIC9 (control negativo) y 10 µg de la construcción pPIC9-*LiPolθ* con las enzimas de restricción *Stu*I o *Bgl*II para generar los transformantes Mut⁺ y Mut^s respectivamente. Los plásmidos linealizados se introdujeron en *P. pastoris* por electroporación y los transformantes se seleccionaron mediante crecimiento en medio sin histidina. La determinación del fenotipo se realizó tanto por crecimiento en placas MD (*minimal dextrose*) y MM (*minimal methanol*) como por PCR (ver apartado 4.3.2 de Materiales y métodos).

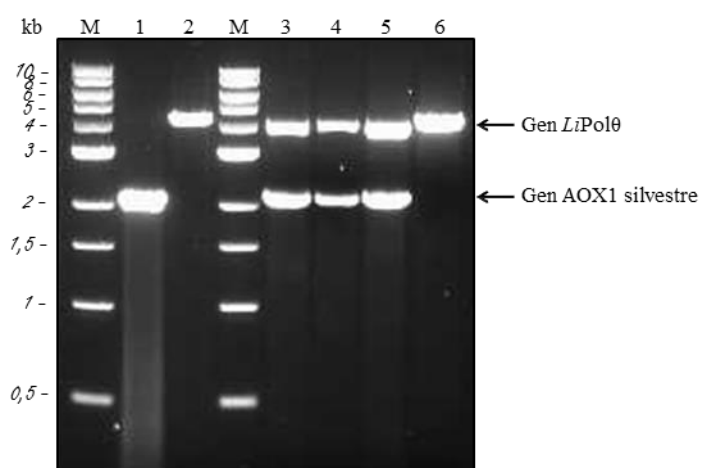


Figura 20. Determinación del fenotipo de los transformantes de *P. pastoris* mediante PCR. M: marcador. Calle 1: falso positivo. Calles 2 y 6: transformantes Mut^s. Calles 3-5: transformantes Mut⁺.

Como se observa en la figura 20, en aquellas colonias donde el plásmido se ha integrado mediante un único fenómeno de recombinación (inserción), al realizar la PCR con los cebadores de la región 5' y 3' del gen AOX1 se observan 2 bandas: una correspondiente al gen AOX1 silvestre y otra al gen de *LiPolθ* más las regiones 5' y 3' del gen AOX1 procedentes del vector. Estas colonias presentan un fenotipo Mut⁺. En cambio, en aquellas colonias donde se ha producido un fenómeno de recombinación doble (reemplazamiento), solo se observa una única banda correspondiente al gen de *LiPolθ* flanqueado por las regiones 3' y 5' del gen AOX1 procedentes del vector. Estas colonias

presentan un fenotipo Mut^s. Eventualmente pueden aparecer falsos positivos, colonias que aun siendo capaces de crecer en medio sin histidina, carecen del gen de interés.

2.2.1.2 Expresión de *LiPolθ-10xHis*.

Una vez verificada la integración del gen *LiPolθ* en el genoma de *P. pastoris*, se llevó a cabo la expresión de la proteína. Para ello se utilizaron dos colonias Mut⁺ y dos colonias Mut^s con inserto, además de una colonia Mut⁺ y una colonia Mut^s sin inserto (controles negativos). Las colonias se crecieron en medio BMGY hasta alcanzar la densidad óptica adecuada, momento en el que se centrifugaron y se resuspendieron en medio BMMY, induciéndose la expresión de la proteína (ver apartado 4.3.3 de Materiales y métodos). Cada día se tomó 1 ml de cultivo como muestra y se añadió metanol a una concentración final de 0,5% para mantener la inducción. Al cabo de 5 días se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y *Western blot*.

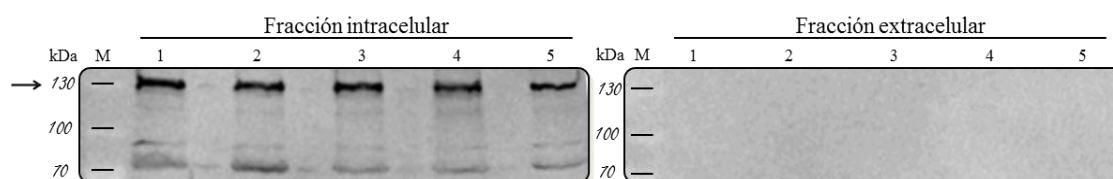


Figura 21. Expresión de *LiPolθ-10xHis* en *P. pastoris*. La expresión de *LiPolθ* a lo largo de los 5 días de inducción se detectó únicamente en la fracción intracelular mediante *Western blot* con el anticuerpo policlonal anti-*LiPolθ*. M: marcador. 1-5: días de inducción. La flecha señala la proteína *LiPolθ-10xHis*.

Tanto en las colonias Mut⁺ como en las colonias Mut^s, los niveles de expresión de *LiPolθ-10xHis* fueron similares, pudiendo detectarse la proteína solamente mediante *Western blot*. Además, a pesar de haberse expresado conjuntamente con la secuencia de señalización extracelular del factor α , *LiPolθ-10xHis* se localizaba en la fracción correspondiente a proteínas intracelulares (figura 21). En los *Western blot* realizados a partir de colonias sin inserto (controles negativos) no se detectó señal ni en la fracción intracelular ni en la extracelular (datos no mostrados).

Con el fin de incrementar la producción de *LiPolθ-10xHis*, se llevó a cabo la expresión de la proteína en diferentes condiciones: menor temperatura de inducción (23 °C) (Li y cols., 2001), incremento de la concentración del agente inductor metanol, adición de

sorbitol como fuente suplementaria de carbono durante la inducción e incorporación de Mg^{2+} al medio de expresión. Sin embargo, la expresión de *LiPolθ-10xHis* no se vio favorecida en ninguna de estas condiciones (figura 22).

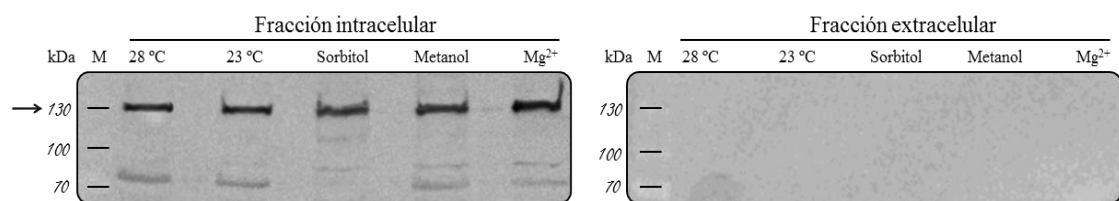


Figura 22. Expresión de *LiPolθ-10xHis* en *P. pastoris* bajo diferentes condiciones de cultivo. La modificación de diferentes condiciones de cultivo no produjo ningún efecto ni en la cantidad de proteína expresada ni en la localización de la misma. M: marcador. La flecha señala la proteína *LiPolθ-10xHis*.

La expresión a 15 °C, la utilización de matraces con deflectores para una mejor aireación, o el empleo de medio suplemento y medio MM como medios de inducción, fueron otras medidas que se llevaron a cabo para tratar de incrementar la expresión de la proteína. Por otro lado, para favorecer la expresión extracelular de la misma, se probó el uso de diferentes concentraciones de tween® 80 en el medio de inducción (Arnesen y cols., 1998). Ninguna de estas medidas dio resultado. En última instancia se llevó a cabo el cultivo e inducción de *P. pastoris* en fermentador. Al no producirse un incremento significativo en la cantidad de proteína expresada se concluyó que *P. pastoris* no es un sistema de expresión adecuado para la proteína *LiPolθ-10xHis*.

2.2.2 Expresión de la proteína *MBP-LiPolθ* y sus formas truncadas *MBP-970*, *MBP-640* y *MBP-358* en *E. coli*.

Dadas las dificultades para obtener la proteína *LiPolθ* a partir de *P. pastoris*, se llevó a cabo la expresión de la misma en *E. coli*. Para solventar los problemas de solubilidad asociados a la expresión de la proteína en este sistema (ver apartado 1.2 de Resultados), el gen que codifica para *LiPolθ* fue clonado en el vector pMAL-c2, el cual permite la expresión de la proteína de interés fusionada en el extremo N-terminal a MBP (proteína de unión a maltosa), favoreciendo su solubilidad y posterior purificación. De igual modo, se llevó a cabo el clonaje de 3 fragmentos del gen, todos ellos correspondientes al extremo 3' del mismo (región codificante del dominio polimerasa), con el fin de evaluar si alguna de las formas truncadas de *LiPolθ* presentaba una mayor estabilidad y

solubilidad que la proteína completa. Estos fragmentos de gen constaban de 1074, 1920 y 2910 nucleótidos, codificando por tanto formas de la proteína de 358, 640 y 970 aa respectivamente.

La proteína MBP-*LiPol* θ y las formas truncadas MBP-358, MBP-640 y MBP-970, fueron expresadas como proteínas de fusión en bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS. La incubación del cultivo bacteriano a baja temperatura (16 °C) durante la expresión, y la incorporación de la MBP en el extremo N-terminal de las diferentes formas proteicas, permitió la obtención de las mismas en forma soluble (figura 23).

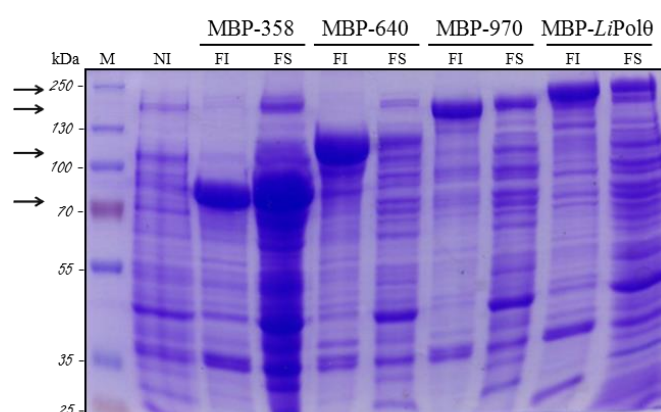


Figura 23. Análisis de la solubilidad de MBP-*LiPol* θ y las formas truncadas MBP-358, MBP-640 y MBP-970. M: marcador. Ni: extracto no inducido. FI: fracción insoluble. FS: fracción soluble. Las flechas señalan la posición de las diferentes formas proteicas expresadas.

*2.2.2.1 Purificación y evaluación de la actividad polimerasa de la proteína MBP-*LiPol* θ y sus formas truncadas.*

Las distintas formas proteicas, localizadas en la fracción soluble, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad en resina de amilosa. Posteriormente, su actividad fue ensayada empleando como sustrato uno de los híbridos molde/cebador abierto utilizado con la polimerasa 6xHis-*LiPol* θ expresada en el sistema libre de células.

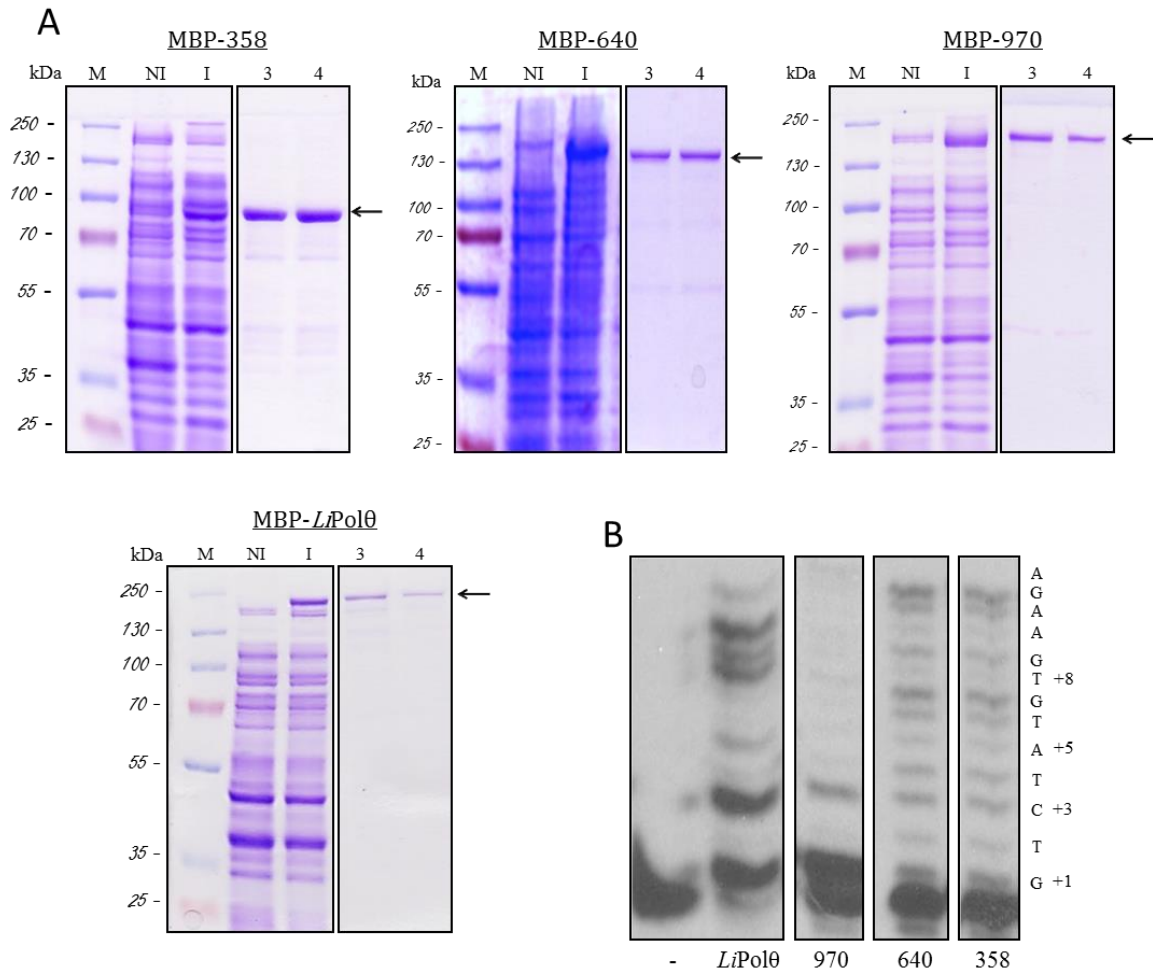


Figura 24. Actividad polimerasa de las formas proteicas MBP-358, MBP-640, MBP-970 y MBP-*LiPolθ*. **A.** Purificación de MBP-358, MBP-640, MBP-970 y MBP-*LiPolθ*. M: marcador. NI: no inducido. I: inducido. 3 y 4: fracciones de elución. La flecha señala la posición de las proteínas. **B.** Ensayo de extensión de cebador. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.5 de Materiales y métodos.

En el ensayo realizado se observó extensión de cebador con cada una de las cuatro formas proteicas empleadas (figura 24B). No obstante, existían diferencias en el grado de actividad así como en el patrón de polimerización mostrado por cada uno de los fragmentos ensayados. La proteína de fusión MBP-*LiPolθ* es la forma más activa y, bajo condiciones de ensayos similares, muestra un patrón de polimerización idéntico al detectado con la proteína 6xHis-*LiPolθ* expresada en el sistema libre de células (figura 19D), observándose en ambos casos la mayor intensidad relativa de las bandas +1, +3, +5, +8, +9 y +10. El fragmento MBP-970 muestra una actividad ADN polimerasa menor, puesto que parte del sustrato no es extendido, y los productos mayoritariamente

formados son de 1 y 3 nucleótidos de extensión. Por último, en el ensayo realizado con los fragmentos MBP-640 y MBP-358 también se observa una actividad mucho menor que la mostrada por MBP-*LiPol* θ , pero en este caso el patrón de polimerización varía con respecto al observado para la proteína completa y el fragmento MBP-970, mostrando todas las bandas una intensidad relativa similar. Esta variación en el patrón de polimerización podía ser consecuencia de tratarse de formas truncadas. No obstante, en el ensayo realizado con MBP-640 y MBP-358 también se observa una banda un nucleótido menor que el cebador, la cual no puede atribuirse a estos fragmentos, al carecer *LiPol* θ de un dominio con actividad exonucleasa.

Para determinar si la actividad ADN polimerasa observada en el ensayo con MBP-358 y MBP-640 era propia de estos fragmentos, se generó un mutante inactivo de la forma truncada MBP-358. Para ello, se llevó a cabo la sustitución de los residuos Asp916, Asp1115 y Glu1116 a alanina (numeración correspondiente a la posición en la proteína completa *LiPol* θ) mediante mutagénesis dirigida (ver apartado 3.3 de Materiales y métodos). Estos residuos son los equivalentes a los aminoácidos Asp705, Asp882 y Glu883 de la polimerasa I de *E. coli* y se encuentran altamente conservados en todas las ARN y ADN polimerasas tanto procariontas como eucariotas (Delarue y cols., 1990). Los residuos Asp705 y Asp882 están implicados en la coordinación de los dos iones metálicos divalentes necesarios para la catálisis (Steitz, 1998) y su sustitución es una de las mutaciones más deletéreas para la actividad de la polimerasa I (Polesky y cols., 1992; Polesky y cols., 1990). El aminoácido Glu883, a diferencia de Asp705 y Asp882, no resulta esencial para la catálisis. Sin embargo, su sustitución conlleva también una disminución de la actividad polimerasa (Gangurde y cols., 2000; Polesky y cols., 1992). El mutante inactivo de MBP-358 (MBP-358AAA) fue expresado y purificado en las mismas condiciones que el fragmento MBP-358 silvestre, obteniéndose con valores similares de rendimiento y pureza. Una vez purificado, se llevó a cabo de nuevo un ensayo de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto con ambos fragmentos proteicos.

A

```

3' CTAGTGTCACACTCATGGTCTATGTGAAGA 5'
* 5' GATCACAGTGAGTAC 3'

```

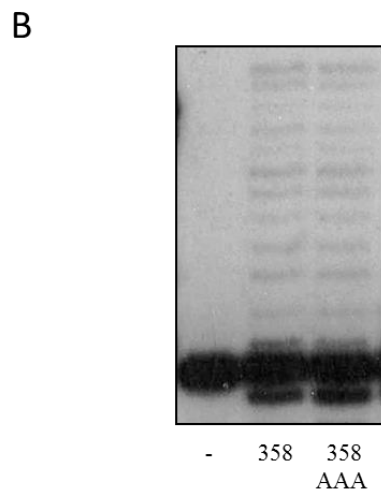


Figura 25. Actividad ADN polimerasa de los fragmentos MBP-358 silvestre y MBP-358AAA. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de extensión de cebador. El ensayo se realizó de acuerdo a como se describe en el apartado 9.5 de Materiales y métodos, empleando una concentración de 5 nM de ADN, 10 μ M de dNTPs, 8mM Mg^{2+} y 200 nM de los fragmentos 358 y 358AAA.

Los fragmentos MBP-358 y MBP-358AAA mostraron un mismo nivel de actividad ADN polimerasa y exonucleasa. Este resultado indica que las formas proteicas MBP-358 y MBP-640 son inactivas. Los productos de extensión y degradación observados en los ensayos con estos fragmentos deben corresponder a la actividad de proteínas endógenas de *E. coli*. En base a estos resultados, se puede concluir que la forma truncada de menor tamaño de *LiPol* θ que conserva actividad ADN polimerasa es el fragmento 970, aunque esta es menor que la de la proteína completa. Debido a ello, se eligió la forma completa MBP-*LiPol* θ para la realización de los ensayos de caracterización funcional de la proteína.

2.3 Caracterización bioquímica de MBP- *LiPol* θ .

2.3.1 Actividad de MBP-*LiPol* θ en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} .

Como se ha indicado anteriormente en la introducción, las ADN polimerasas requieren la presencia de un cofactor para su actividad, y la concentración óptima del mismo varía según la polimerasa. Con el fin de determinar las condiciones más favorables para MBP-*LiPol* θ , se evaluó su actividad en presencia de distintas concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} .

A

3' CTAGTGTCACCTCATGGTCTATGTGAAGA 5'
 * 5' GATCACAGTGAGTAC 3'

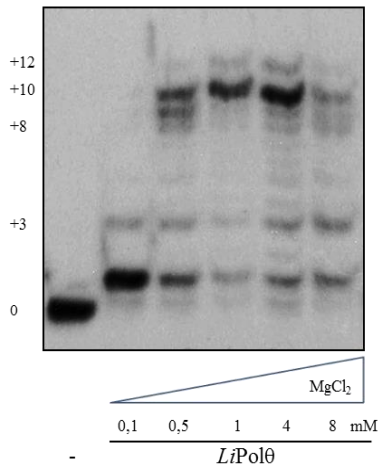
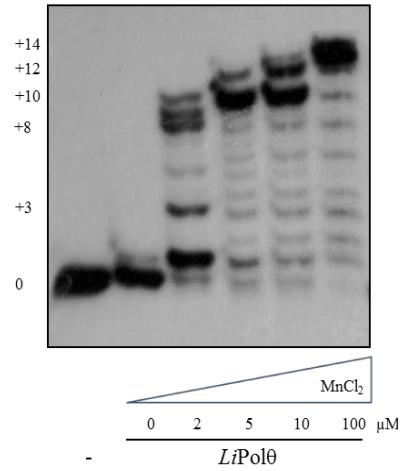
B**C**

Figura 26. Actividad ADN polimerasa de *LiPolθ* con Mg^{2+} y Mn^{2+} como cofactores. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Ensayos de extensión de cebador realizados en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.6 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 10 μ M de dNTPs y 200 nM de *LiPolθ*.

Como se observa en la figura 26, *LiPolθ* parece mostrar una actividad distributiva con ambos cofactores. La actividad máxima de *LiPolθ* se observa a concentraciones de 1 mM de $MgCl_2$ (figura 26B) y 100 μ M de $MnCl_2$ (Figura 26C). En presencia del cofactor Mg^{2+} , *LiPolθ* origina mayoritariamente un producto +10, extendiendo el cebador hasta 3 nucleótidos antes del final de la hebra molde. En cambio, en presencia de Mn^{2+} *LiPolθ* es capaz no solo de polimerizar hasta el final de la hebra molde, sino que además inserta un nucleótido extra en el extremo 3' dando lugar a un producto +14. La adición no dirigida por molde de un nucleótido en extremos romos es una característica de las polimerasas de la familia A (Clark, 1988; Clark y cols., 1987; Takata y cols., 2006). En estas condiciones la actividad ADN polimerasa observada anteriormente con los fragmentos MBP-358 y MBP-640 se encuentra inhibida, observándose únicamente actividad nucleasa (datos no mostrados). Debido a ello, aún en el caso de estar presente la polimerasa de *E. coli* en la purificación de MBP-*LiPolθ*, la actividad ADN polimerasa detectada será únicamente producto de MBP-*LiPolθ*. Salvo que se indique lo contrario, todos los ensayos de caracterización funcional de *LiPolθ* fueron llevados a cabo en presencia de Mn^{2+} .

2.3.2 Actividad de *LiPol* θ a diferentes valores de pH y temperatura.

Para determinar los valores óptimos de pH y temperatura para la actividad de *LiPol* θ , se llevó a cabo un ensayo de polimerización en moléculas tipo molde/cebador abierto. Los valores de pH que se evaluaron fueron todos próximos al pH fisiológico de *Leishmania*. Del mismo modo, las temperaturas ensayadas fueron 27 °C y 37 °C por consistir en los valores a los cuales el parásito se ve expuesto en el estadio promastigote y amastigote respectivamente.

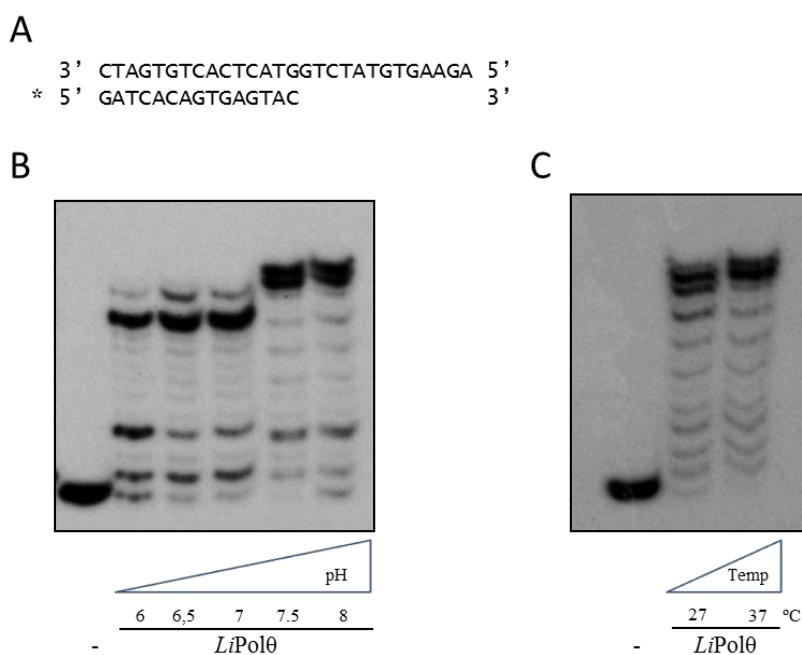


Figura 27. Actividad de *LiPol* θ a diferentes valores de pH y temperatura. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Ensayos de extensión de cebador a diferentes valores de pH y temperatura respectivamente. El ensayo se realizó de acuerdo a como se describe en el apartado 9.7 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 10 μ M de dNTPs, 100 μ M Mn^{2+} y 200 nM de *LiPol* θ .

LiPol θ es activa a todos los valores de pH a los que se ha ensayado (figura 27B), si bien se aprecia un incremento en su actividad entre pH 7 y 7.5. Valores de pH superiores a 8 (pH 8-10) no suponen una variación en la actividad de *LiPol* θ (datos no mostrados). En referencia a la temperatura (figura 27C), *LiPol* θ muestra un ligero incremento en su actividad a 37 °C con respecto a 27 °C. Por todo ello, los ensayos de caracterización de la actividad de *LiPol* θ se llevaron a cabo a 37 °C y pH 7.5.

2.3.3 Actividad desoxinucleotidil transferasa terminal.

Como se comentó en la introducción, algunas polimerasas presentan la capacidad de llevar a cabo la extensión de un oligonucleótido en ausencia de ADN molde. Para determinar si *LiPolθ* posee dicho potencial, se evaluó su actividad polimerasa en presencia de una molécula de ADN de hebra simple y de doble hebra.

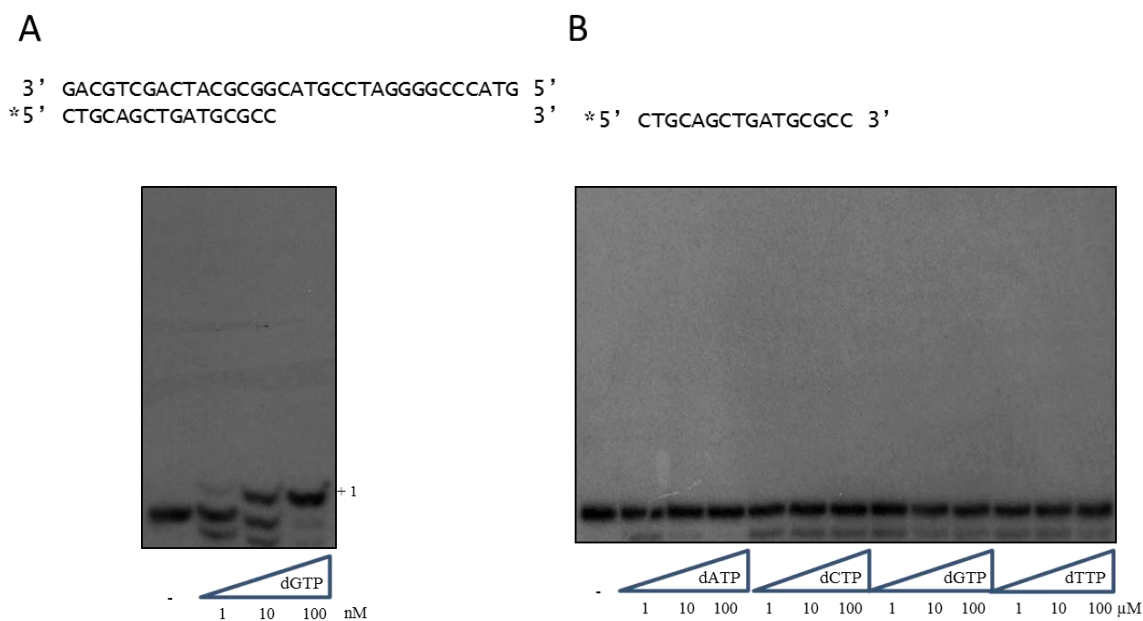


Figura 28. Ausencia de actividad transferasa terminal en *LiPolθ*. **A.** Ensayo de polimerización en un sustrato tipo molde/cebador abierto. **B.** Ensayo de polimerización en un sustrato de cadena sencilla. El ensayo se realizó de acuerdo a como se describe en el apartado 9.8 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 100 μM Mn^{2+} y 200 nM de *LiPolθ*.

LiPolθ es capaz de llevar a cabo la reacción de polimerización en presencia de moléculas de tipo molde/cebador abierto, incorporando el nucleótido complementario a la hebra molde (figura 28A). Sin embargo, no se observó actividad sobre un sustrato de cadena sencilla con ninguno de los 4 nucleótidos (figura 28B), por lo que *LiPolθ* carece de actividad transferasa terminal.

2.3.4 Discriminación del grupo 3' OH del nucleótido entrante.

Para evaluar la capacidad de discriminación entre la presencia o ausencia de un grupo OH en posición 3' de la ribosa del nucleótido entrante por parte de *LiPolθ*, se llevaron a cabo ensayos comparativos de inserción de dGTP y ddGTP.

A

3' GACGTCGACTACGCGGCATGCCTAGGGGCCCATG 5'
* 5' CTGCAGCTGATGCGCC 3'

B

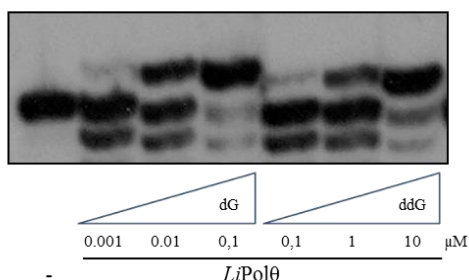


Figura 29. Discriminación a favor de sustratos nucleotídicos con un grupo OH en posición 3' de la ribosa. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de extensión de cebador. El ensayo se realizó tal y como se describe en el apartado 9.9 de Materiales y métodos, utilizando una concentración, 5 nM de ADN, 100 μM Mn²⁺ y 200 nM de *LiPolθ*.

Como se observa en la figura 29, *LiPolθ* muestra una preferencia de aproximadamente 150 veces por la inserción de desoxinucleótidos con respecto a didesoxinucleótidos.

2.3.5 Fidelidad de síntesis de *LiPolθ* en presencia de Mg²⁺ y Mn²⁺.

Para una estimación inicial de la fidelidad de síntesis de *LiPolθ* en ADN no dañado, se utilizaron cuatro híbridos molde/cebador que diferían únicamente en el primer nucleótido no apareado. Los 4 dNTPs fueron empleados individualmente a la misma concentración para analizar la formación de los 16 posibles pares de nucleótidos (4 correctos y 12 incorrectos). El ensayo se realizó en presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺.

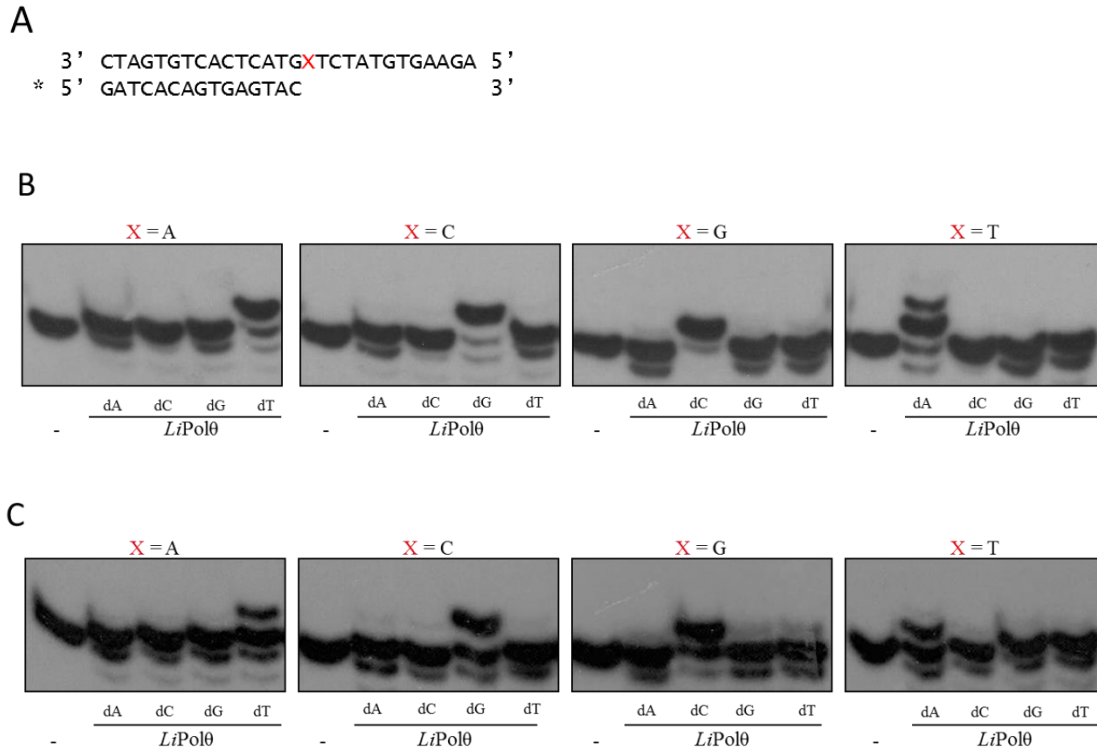


Figura 30. *LiPolθ* introduce preferentemente los nucleótidos complementarios. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Ensayos de extensión de cebador realizados en presencia de 1 mM Mg^{2+} y 100 μM Mn^{2+} respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.10 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN y 200 nM de *LiPolθ*. La concentración de dNTPs utilizada fue 100 nM para el ensayo con Mg^{2+} y 1 nM para el ensayo con Mn^{2+} .

LiPolθ inserta preferentemente el nucleótido correcto tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+} . Con Mg^{2+} como cofactor (figura 30B), prácticamente todo el cebador es convertido en producto +1 cuando el nucleótido complementario a la primera base es suministrado, mientras que no se observa incorporación en ninguno de los 12 casos posibles de apareamiento erróneo. En el caso de la utilización de Mn^{2+} como cofactor (figura 30C), el grado de fidelidad disminuye puesto que a la concentración de dNTPs necesaria para obtener la mayor parte del sustrato extendido con el nucleótido correcto, se produce también cierta inserción de nucleótidos incorrectos. Esta disminución de la fidelidad de síntesis dependiente de la utilización de iones Mn^{2+} como activadores de la polimerización es una característica ampliamente descrita (Beckman y cols., 1985; Pelletier y cols., 1996) A pesar de ello, se puede afirmar que *LiPolθ* inserta

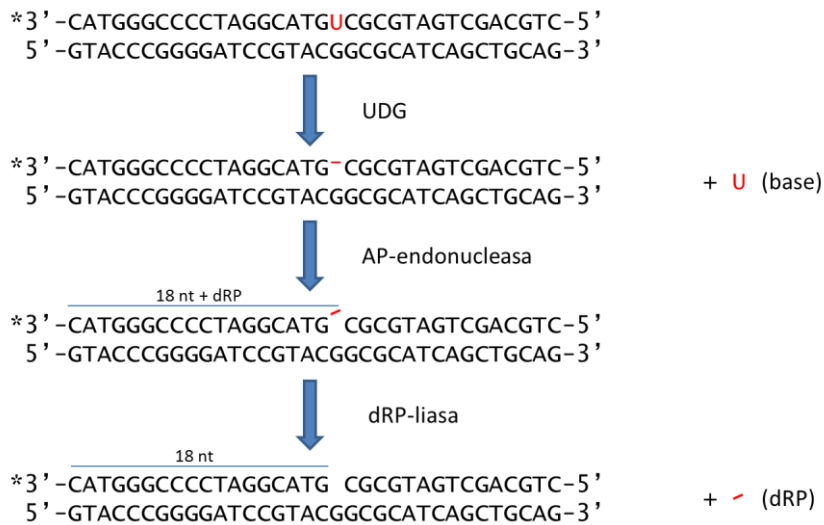
preferentemente el nucleótido correcto independientemente del metal utilizado como cofactor.

2.3.6 Actividad dRP-liasa.

Como se expuso en la introducción, en la ruta de BER de trecho corto puede originarse como producto intermediario un residuo desoxirribosafosfato (dRP), tras la acción de la ADN glicosilasa y AP-endonucleasa correspondientes. Este grupo dRP debe ser escindido mediante una actividad dRP-liasa, la cual está considerada el paso limitante de la ruta y es imprescindible para que se produzca la ligación. Dicha actividad ha sido descrita para la polimerasa θ humana (Prasad y cols., 2009).

Para evaluar la posible actividad dRP-liasa de *LiPol* θ , se empleó un sustrato de ADN de doble cadena de 34 pdb, en el que uno de los oligonucleótidos contiene una base nitrogenada uracilo (en posición 19) frente a una guanina, simulando la situación fisiológica en la que una citosina se desamina, dando lugar a un uracilo. Este sustrato fue tratado inicialmente con uracil ADN glicosilasa (UDG) para eliminar el uracilo (base dañada) y a continuación se incubó con la enzima AP-endonucleasa, la cual produce la escisión del enlace fosfodiéster en posición 5' con respecto al sitio abásico, generándose de este modo un residuo dRP. Este sustrato fue incubado con distintas polimerasas (*hPol* μ , *hPol* λ y *LiPol* θ) para el análisis de actividad dRP-liasa.

A



B

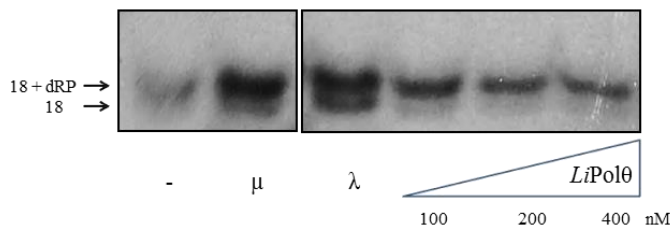


Figura 31. Ausencia de actividad dRP-liasa en *LiPolθ*. **A.** Representación esquemática de las distintas reacciones que tienen lugar durante el ensayo. Las reacciones llevadas a cabo por la UDG y la AP-endonucleasa son necesarias para generar el sustrato del ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de actividad dRP-liasa. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.11 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 100 nM de ADN, 100 nM de *hPolμ* y *hPolλ* y 100 - 400 nM de *LiPolθ*.

En la figura 31B se observa cómo la polimerasa *hPolμ* (control negativo) no es capaz de escindir el residuo dRP. *LiPolθ* a las concentraciones ensayadas (100 - 400 nM) tampoco muestra actividad dRP-liasa. En cambio, *hPolλ* (control positivo) a una concentración de 100 nM y en idénticas condiciones de ensayo, es capaz de escindir aproximadamente el 40% de los residuos dRP. Estos datos parecen indicar que *LiPolθ* o bien carece de actividad dRP-liasa o bien ésta es muy inferior a la de las polimerasas implicadas en reparación por escisión de base (*Polλ* y *Polβ*).

2.3.7 Actividad polimerasa en moléculas tipo *gap* de 1 y 5 nucleótidos.

La ausencia de actividad dRP-liasa detectable en *LiPol* θ sugiere que *a priori* el papel de esta polimerasa *in vivo* no estaría relacionado con el mecanismo de reparación por escisión de base de trecho corto. No obstante, debido a la posibilidad de que durante dicho mecanismo de reparación se genere un *gap* sin que se produzca un grupo dRP intermediario (mediante la actividad AP-liasa de la ADN glicosilasa correspondiente), se evaluó la actividad polimerasa de *LiPol* θ en moléculas tipo *gap* de 1 y 5 nucleótidos.

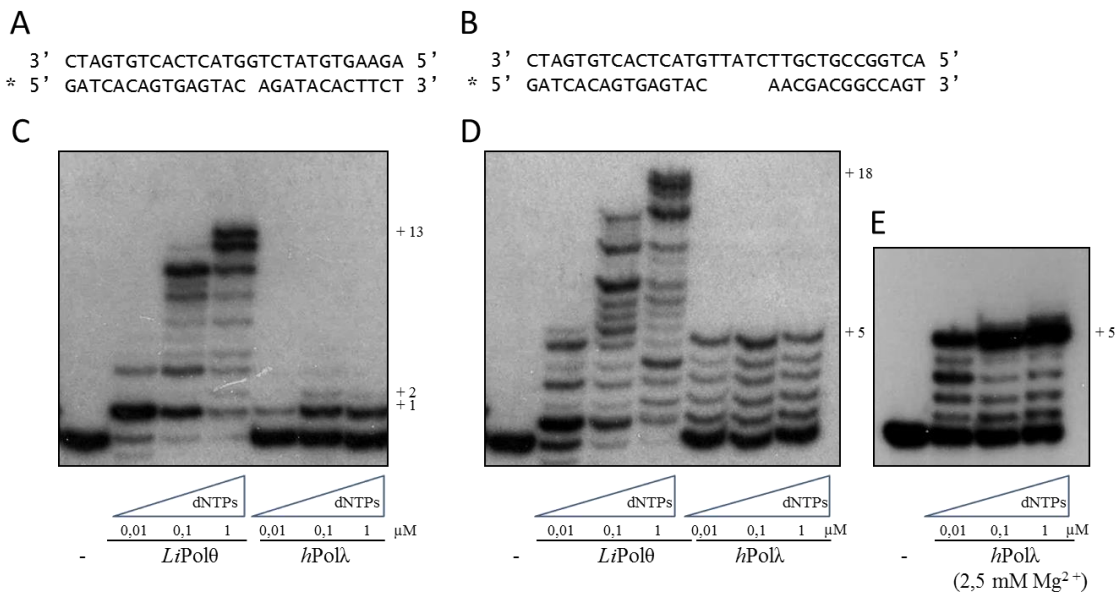


Figura 32. Actividad de *LiPol* θ en un sustrato tipo *gap* de 1 y 5 nucleótidos. A y B. Secuencias de las moléculas de ADN con un *gap* de 1 y 5 nucleótidos respectivamente utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **C.** Ensayos de inserción de nucleótidos en moléculas tipo *gap* de 1 nucleótido. **D y E.** Ensayos de inserción de nucleótidos en moléculas tipo *gap* de 5 nucleótidos. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.12 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPol* θ y 50 nM de *hPol* λ . El cofactor utilizado, salvo que se indique lo contrario, fue 100 μ M Mn^{2+} para *LiPol* θ y 1 mM Mn^{2+} para *hPol* λ .

Como se observa en las figuras 32C y 32D, la síntesis de ADN mediada por *LiPol* θ no está condicionada a los límites del *gap*, alcanzando los productos obtenidos el tamaño correspondiente a la extensión completa del cebador. Por el contrario, la polimerización mediada por *hPol* λ viene determinada por la longitud del *gap*, lo que verifica que el sustrato utilizado en el ensayo ha sido correctamente generado y que la extensión observada en el caso de *LiPol* θ no es producto de una hibridación deficiente del

oligonucleótido *downstream*, sino a la capacidad del enzima de producir un desplazamiento del mismo.

La actividad en moléculas tipo *gap* de algunas polimerasas como *hPolβ* o *hPolλ* puede variar dependiendo de la presencia de un grupo hidroxilo o un grupo fosfato en posición 5' del *downstream* y del cofactor utilizado (García-Díaz y cols., 2002). La capacidad de desplazamiento de banda de *LiPolθ* sin embargo, es independiente del grupo presente en posición 5' del *downstream* así como del metal utilizado como cofactor (figura 33).

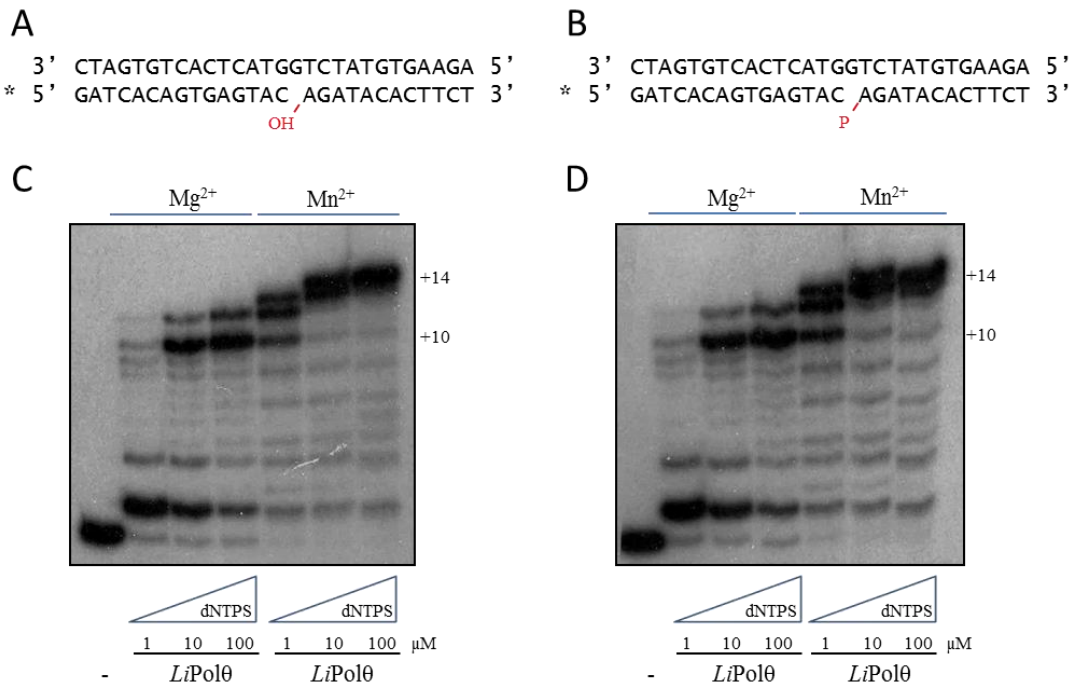


Figura 33. La capacidad de desplazamiento de banda de *LiPolθ* es independiente de la presencia de un grupo fosfato o hidroxilo en posición 5' del oligonucleótido *downstream* y del cofactor empleado. A y B. Secuencias de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **C y D.** Ensayos de inserción de nucleótidos en moléculas tipo *gap* de 1 nucleótido con un grupo hidroxilo o fosfato en posición 5' del oligonucleótido *downstream* respectivamente. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.12 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM Mn²⁺ o 1 mM Mg²⁺.

Como se observa en la figuras 33C y 33D, la presencia de un grupo hidroxilo o un grupo fosfato en posición 5' del oligonucleótido *downstream* no altera la actividad polimerasa de *LiPolθ*. Del mismo modo el empleo de Mg²⁺ o Mn²⁺ como cofactor tampoco modifica la capacidad de desplazamiento de banda de la polimerasa.

2.3.8 Extensión de extremos desapareados.

Durante la replicación y reparación del ADN, las polimerasas insertan, por norma general, el nucleótido complementario a la base molde siguiendo las reglas de Watson y Crick (Watson y Crick, 1953). No obstante, en ocasiones las polimerasas pueden incorporar un nucleótido de forma errónea. En estos casos las polimerasas pueden o bien eliminar el nucleótido insertado mediante actividad correctora 3'-5' (si poseen dicha actividad) e insertar el nucleótido correcto, o bien pueden continuar con la polimerización a partir del nucleótido erróneamente incorporado, fijando de este modo la mutación. La incapacidad para realizar alguno de estos dos mecanismos, conllevaría la parada de la horquilla de replicación. Para evaluar la capacidad de *LiPolθ* de extensión de extremos desapareados se hibridaron 4 cebadores que diferían únicamente en el nucleótido situado en posición 3', con un oligonucleótido molde común.

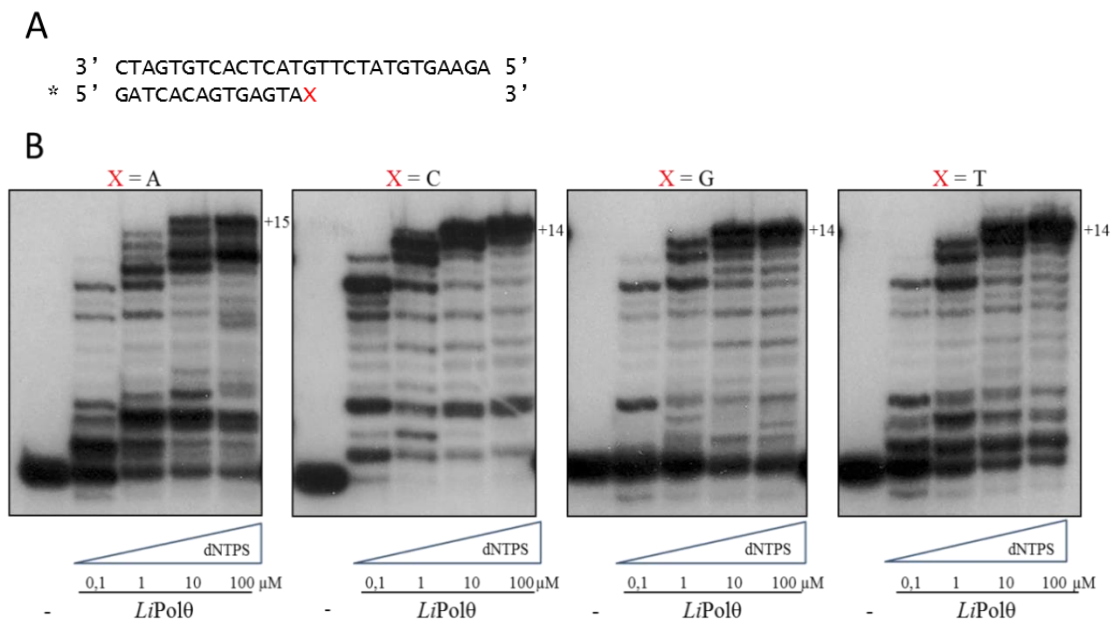


Figura 34. Extensión de extremos desapareados. **A.** Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayos de extensión de desapareamientos. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.13 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM Mn²⁺.

LiPolθ es capaz de llevar a cabo la extensión de los distintos extremos desapareados evaluados (dG.dAMP, dG.dGMP y dG.dTMP). A pesar de la diferencia a nivel de eficiencia de la reacción, el patrón de polimerización observado en los sustratos con extremos desapareados dG.dGMP y dG.dTMP es similar al del sustrato con un extremo apareado (dG.dCMP), observándose en todos los casos una extensión máxima de 14

nucleótidos, correspondiente a la incorporación de 13 nucleótidos dirigida por la hebra molde más la adición de un nucleótido extra, independiente de molde, en el extremo romo. En cambio, la extensión del extremo desapareado dG.dAMP por parte de *LiPolθ* genera un patrón de polimerización diferente al resto, pudiéndose observar la incorporación de hasta 15 nucleótidos en el extremo del cebador (figura 34B).

Debido a la secuencia de la molécula utilizada, *LiPolθ* sólo puede llevar a cabo la extensión de los extremos dG.dCMP, dG.dGMP y dG.dTMP de forma directa, es decir, mediante la incorporación del nucleótido complementario a la primera base molde. Sin embargo, en el sustrato con extremo desapareado dG.dAMP, *LiPolθ* puede producir la dislocación de la hebra molde, del cebador o de ambos, para intentar generar un extremo apareado. Para comprobar si este mecanismo estaba teniendo lugar, se llevó a cabo el ensayo de extensión de los pares incorrectos dG.dAMP y dG.dTMP con los 4 nucleótidos por separado.

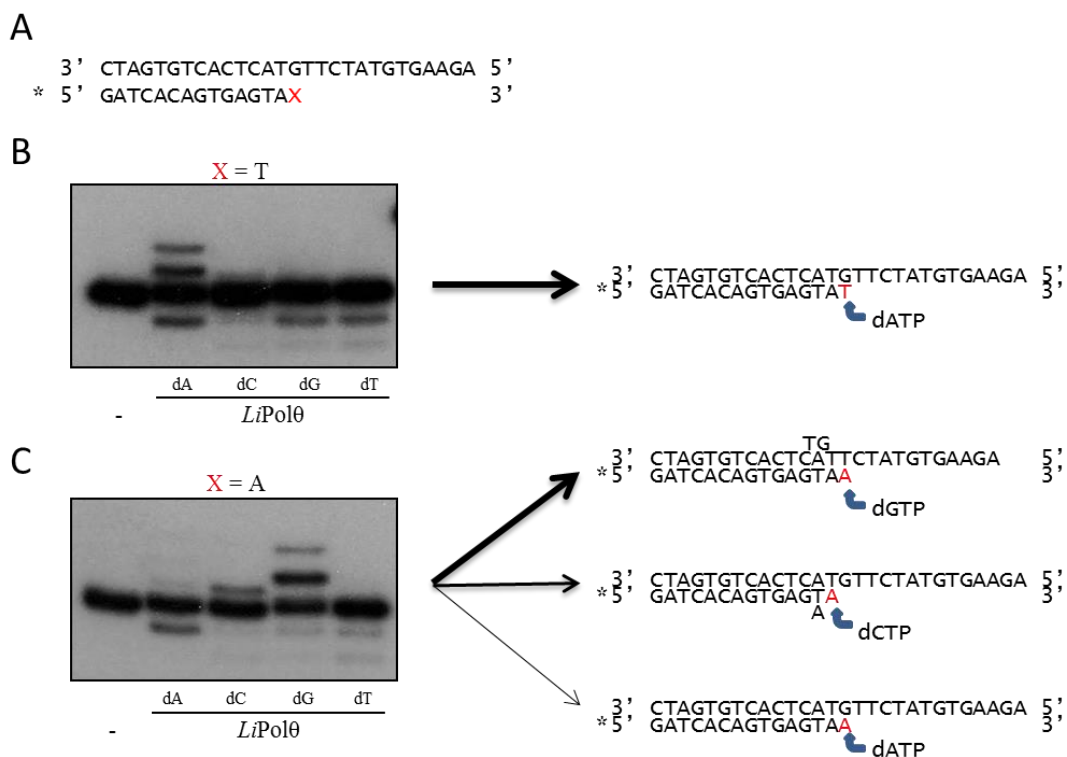


Figura 35. Mecanismos alternativos para la extensión de desapareamientos. **A.** Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Ensayos de extensión de desapareamientos. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.13 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ*, 200 nM de cada uno de los nucleótidos por separado y 100 μM Mn^{2+} . El grosor de las flechas representa la tendencia relativa de *LiPolθ* para realizar el evento de síntesis esquematizado.

En presencia de un desapareamiento dG.dTMP en el extremo del cebador (figura 35B), *LiPolθ* es capaz de llevar a cabo la extensión únicamente de manera directa, incorporando dATP de forma dirigida por las bases dT situadas en posición 5' respecto al par incorrecto. De este modo *LiPolθ* extendería el desapareamiento sin cometer errores adicionales, provocando la fijación de una mutación en el ADN. Este mismo mecanismo de extensión se produciría en el caso del desapareamiento dG.dGMP.

En cambio, en presencia de un desapareamiento dG.dAMP en el extremo del cebador (figura 35C), *LiPolθ* es capaz de utilizar diferentes estrategias para llevar a cabo la extensión. En primer lugar, puede recolocar la cadena molde de tal forma que, situando dos bases (TG) en posición extrahelicoidal consiga un apareamiento perfecto con el cebador. Esto permitiría la entrada de dGTP dirigida por la base molde dC. La segunda inserción de dGTP sería en frente de dT. Este par incorrecto dT.dGMP, a pesar de ser uno de los más eficientemente generados y extendidos por las polimerasas (Joyce y cols., 1992) es probable que *in vivo* no se produjera al estar presentes los 4 dNTPs. Esta recolocación de la hebra molde para generar un extremo apareado supone la formación de un producto final dos nucleótidos más corto que el original.

En segundo lugar, *LiPolθ* puede llevar a cabo la recolocación del cebador, apareando el nucleótido del extremo 3' del cebador con el nucleótido inmediatamente anterior de la hebra molde con lo que se favorece la entrada de dCTP frente a dG. Esta estrategia conlleva la formación de un producto final un nucleótido más largo que el original.

Por último, y con una eficiencia mucho menor, *LiPolθ* es capaz de llevar a cabo la extensión directa del desapareamiento mediante la inserción de dATP.

Por tanto podemos afirmar que la diferencia observada en el patrón de polimerización a partir de la extensión de los diferentes extremos desapareados (figura 34B) se debe a las distintas estrategias empleadas por *LiPolθ* para llevar a cabo dicha extensión.

3. Análisis de la actividad *in-vitro* de *LiPolθ*: Síntesis a través de lesiones.

3.1. Lesión 8oxodG.

El principal producto oxidativo en el ADN es la lesión 8 oxo-7,8 dihidro-2'-desoxiguanina (8oxodG) (Batra y cols., 2010). Este producto se origina como consecuencia tanto de la oxidación directa de desoxiguaninas constituyentes del ADN, como de la oxidación de nucleótidos libres (dGTP) que son posteriormente incorporados durante la síntesis de ADN (Katafuchi y Nohmi, 2010). La molécula 8oxodG posee un marcado carácter mutagénico puesto que es capaz de aparear tanto con citosina como con adenina, dependiendo de si el 8oxodG adopta una conformación anti o sin respectivamente. La presencia de 8oxodG en el ADN supone por lo tanto un riesgo para los organismos debido a su capacidad de generar transversiones G:T (Shibutani y cols., 1991). A pesar de que en las moléculas 8oxodG es la conformación sin la que se encuentra favorecida debido a la repulsión estérica que se produce en conformación anti entre el O8 de la base y la desoxirribosa (Brieba y cols., 2004), la capacidad mutagénica del 8oxodG dependerá en última instancia de la polimerasa que participe en la síntesis a través de lesión y de las interacciones moleculares que se produzcan entre el 8oxodG y el centro activo de dicha polimerasa, las cuales pueden favorecer la estabilización de una conformación u otra (Beard y cols., 2010).

3.1.1. Actividad ADN polimerasa de *LiPolθ* en lesión 8oxodG.

Para determinar si *LiPolθ* es capaz de superar lesiones 8oxodG se llevaron a cabo ensayos de actividad en moléculas tipo molde/cebador abierto, cuya primera base sin aparear del molde fuese dG u 8oxodG, en presencia de los 4 nucleótidos.

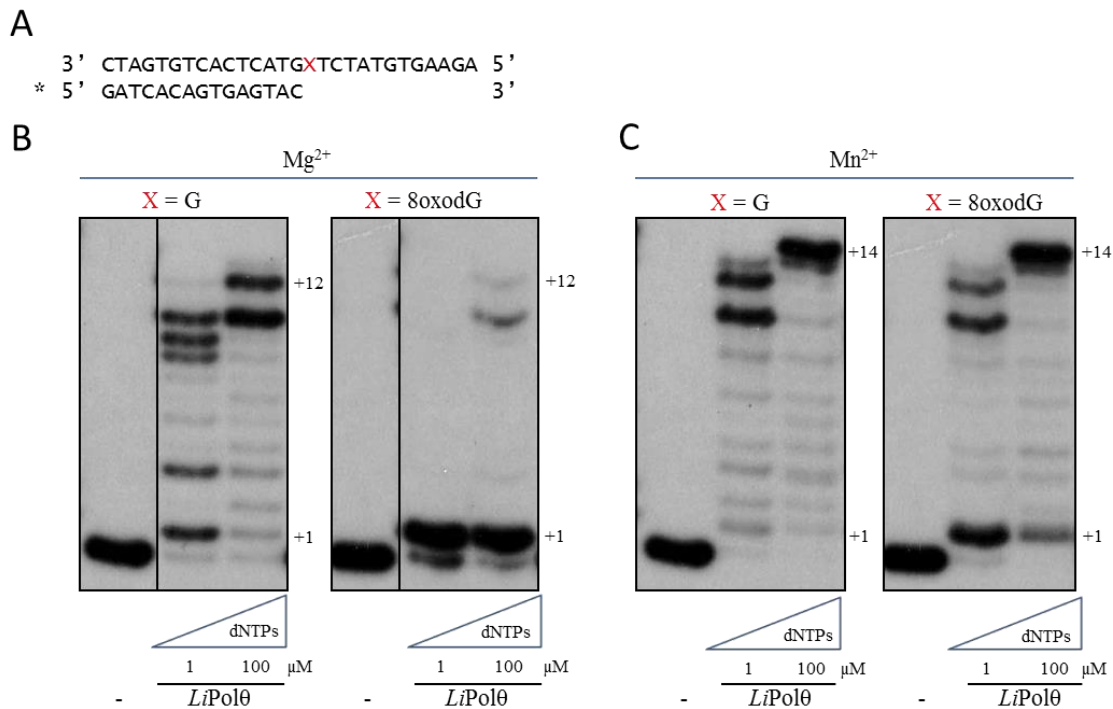


Figura 36. Superación de la lesión 8oxodG por *LiPolθ*. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Ensayo de extensión de cebador realizado en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} respectivamente. El sustrato cuya primera base sin aparear es una guanina se empleó como control de polimerización en molde no dañado. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.14.1 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 1 mM Mg^{2+} o 100 μM Mn^{2+} .

Según lo observado en la figura 36, *LiPolθ* en presencia de Mg^{2+} es capaz de realizar la inserción de un nucleótido frente a 8oxodG, sin embargo no puede llevar a cabo la extensión a partir de dicho nucleótido. Por el contrario, en presencia de Mn^{2+} , *LiPolθ* es capaz de realizar tanto el paso de inserción frente a 8oxodG, como el de extensión.

3.1.2. Síntesis frente a 8oxodG.

Como se comentó anteriormente, la base 8oxodG puede aparear tanto con citosina como con adenina, pudiendo generar en este último caso transversiones G:T. Con el fin de determinar la eficiencia y fidelidad de *LiPolθ* en el proceso de síntesis frente a la lesión 8oxodG, se llevaron a cabo ensayos de actividad polimerasa con moléculas tipo molde/cebador abierto cuya primera base sin aparear fuese dG u 8oxodG, añadiendo por separado diferentes concentraciones de dATP o dCTP a la reacción.

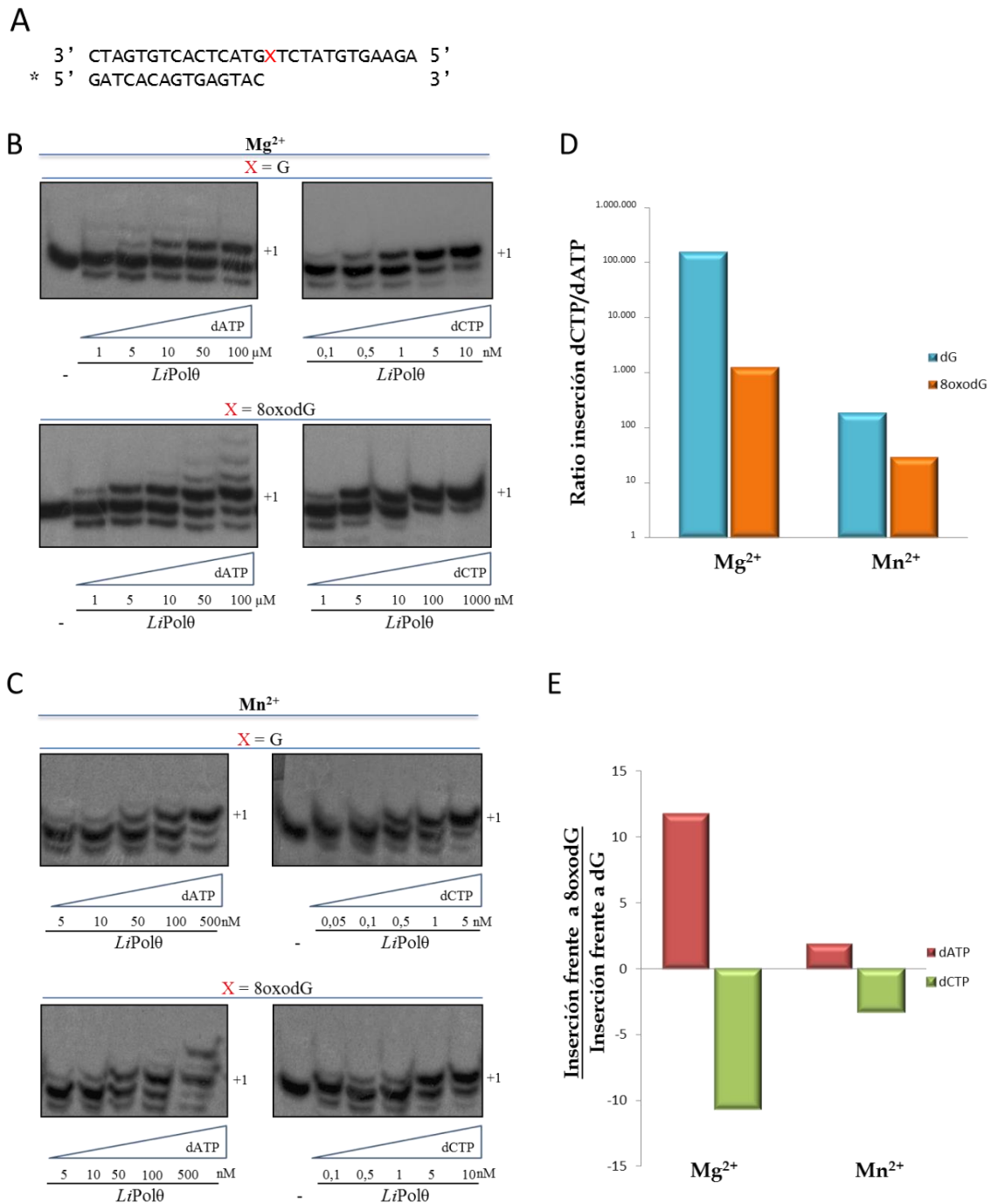


Figura 37. Inserción frente a 8oxodG. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Ensayo de extensión de cebador realizado en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} respectivamente. **D.** Representación de la preferencia de inserción de nucleótido (dCTP / dATP) por parte de *LiPolθ* frente a dG y 8oxodG. **E.** Representación de la eficiencia de inserción de dATP y dCTP frente a 8oxodG con respecto a la inserción frente a la base no dañada (dG). El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.14.1 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 1 mM Mg^{2+} o 100 μM Mn^{2+} . Las figuras D y E se han obtenido a partir del densitometrado de los ensayos de actividad y posterior estimación de la concentración de nucleótidos necesaria en cada caso para obtener un 50% de inserción.

Como se observa en las figuras 37B y 37C, y se representa en la figura 37D, *LiPolθ* incorpora preferentemente dCTP frente a dG y 8oxodG, tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+} . La mayor discriminación entre inserción correcta e incorrecta se produce, como era de esperar, frente a la base molde no modificada (dG) en presencia del cofactor Mg^{2+} . En estas condiciones el factor de discriminación es del orden de $1,5 \times 10^5$, un valor en concordancia con el grado de fidelidad que presentan las polimerasas de la familia A (10^4 - 10^6). Este valor se reduce dos órdenes de magnitud (\approx a $1,2 \times 10^3$) cuando la base molde es 8oxodG debido tanto a una disminución en la eficiencia de inserción de dCTP (\approx 10,5 veces) como a un incremento en la eficiencia de inserción de dATP (11,8 veces), (figura 36E). En presencia del cofactor Mn^{2+} , *LiPolθ* experimenta una disminución en el grado de fidelidad, lo cual le permite llevar a cabo la inserción de dATP con relativa facilidad tanto frente a dG como frente a 8oxodG. Este es el motivo principal de la disminución en el factor de discriminación dCTP/dATP frente a 8oxodG, y no una reducción en la eficiencia de inserción de dCTP, la cual es solo 3,3 veces menor. A pesar de ello, en presencia de Mn^{2+} *LiPolθ* es capaz de mantener una discriminación positiva en favor de la inserción de dCTP frente a 8oxodG con una relación de incorporación dCTP:dATP de 30:1.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que *LiPolθ* es capaz de superar la lesión 8oxodG llevando cabo la inserción de dCTP preferentemente, comportándose de forma no mutagénica tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+} .

3.1.3. Extensión de un par 8oxodG.

Para determinar con mayor exactitud la eficiencia de *LiPolθ* a la hora de extender extremos cuya base molde fuese 8oxodG, se realizaron nuevos ensayos con moléculas tipo molde/cebador abierto cuyo extremo estuviese constituido por 8oxodG apareado con dAMP o dCMP, añadiéndose a la reacción únicamente el nucleótido complementario a la base molde situada en 5' respecto al 8oxodG.

A

3' GACGTCGACTACGCGYCATGCCTAGGGGCCCATG 5'
 * 5' CTGCAGCTGATGCGCX 3'

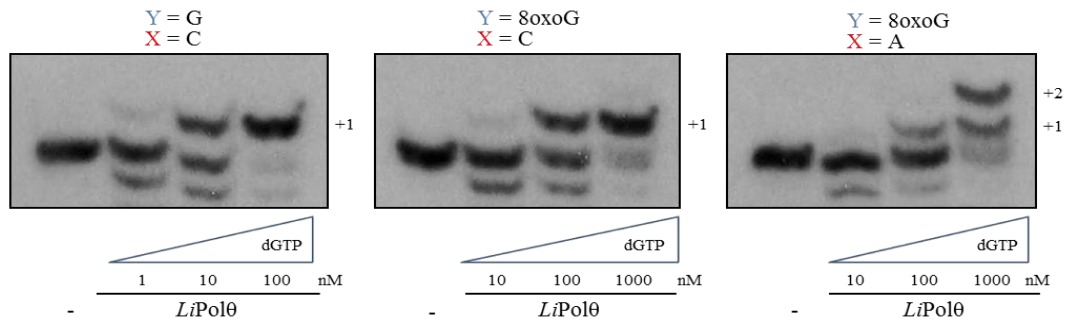
B

Figura 38. Extensión desde pares con la base 8oxodG como molde. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de extensión de los posibles pares formados con dG y 8oxodG como base molde. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.14.2 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM Mn^{2+} .

Como se observa en la figura 38B, *LiPolθ* extiende con mayor eficiencia un par dG.dCMP que los pares con base molde 8oxodG. Por su parte, los pares 8oxodG.dCMP y 8oxodG.dAMP son extendidos aproximadamente con la misma eficiencia, lo que indica que *LiPolθ* no discrimina negativamente la presencia de dAMP frente a 8oxodG durante el paso de extensión. Además, la formación de un par 8oxodG.dAMP estimula la incorporación de nucleótidos erróneos frente a bases moldes situadas en posición 5' con respecto a la lesión, observándose la formación de un producto +2 como consecuencia de la incorporación de dGTP frente a dA. Esta incorporación errónea no parece tener lugar cuando el par formado es 8oxodG.dCMP. Esta característica puede percibirse también en el ensayo anterior (figuras 37 y 37C), donde en sustratos con base molde 8oxodG, la adición de dATP origina una extensión de más de 2 nucleótidos, lo que implica una incorporación errónea de dATP frente a dC. En cambio, en los ensayos con sustratos con base molde dG o en los que se suministra dCTP, únicamente se produce la inserción correcta de un nucleótido, lo que pone de manifiesto que es concretamente la formación de un par 8oxodG.dAMP lo que origina una disminución de la fidelidad de síntesis frente a las bases adyacentes a 8oxodG.

3.1.4. Inserción de 8oxodGTP.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, además de por oxidación directa de dG en el ADN, la lesión 8oxodG puede generarse por la incorporación en el ADN por una ADN polimerasa de dGTP oxidado (8oxodGTP). Esta incorporación de 8oxodGTP puede realizarse frente a dC o dA, pudiendo originar en este último caso transversiones A:C (Sekiguchi y Tsuzuki, 2002). Por norma general, la mayoría de las polimerasas tienden a insertar 8oxodGTP frente a la base adenina (Batra y cols., 2010).

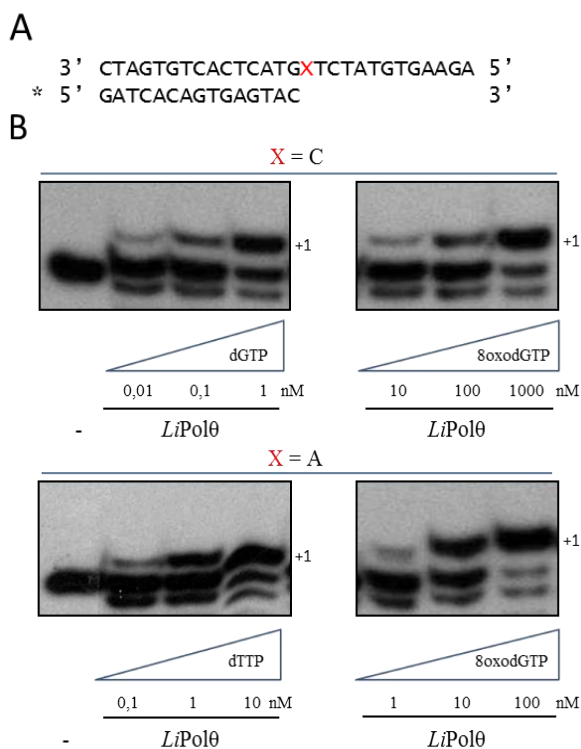


Figura 39. Inserción de 8oxodGTP por *LiPolθ*. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de inserción de 8oxodGTP frente a dC y dA. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.14.3 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μ M Mn^{2+} .

LiPolθ inserta preferentemente 8oxodGTP frente a adenina (\approx 34 veces más eficientemente que frente a citosina). Además, si bien la eficiencia de inserción de 8oxodGTP frente a la base molde dC es baja con respecto a la del nucleótido dGTP (260 veces menor), la inserción de 8oxodGTP es solo 5 veces inferior con respecto a la de dTTP frente a la base molde dA. Por tanto, *LiPolθ* inserta 8oxodGTP de manera errónea frente a adenina con relativa eficiencia, comportándose de forma mutagénica.

3.1.5. Inserción de ribonucleótidos frente a 8oxodG.

Las ADN polimerasas generalmente muestran preferencia por el uso de desoxinucleótidos sobre ribonucleótidos. Sin embargo, algunas polimerasas como *hTdT*

(Boulé y cols., 2001) o *hPolμ* (Ruiz y cols., 2003) insertan ambos sustratos con una eficiencia similar. Además, el hecho de que los ribonucleótidos se encuentren en una mayor concentración celular que los desoxinucleótidos (Traut, 1994) favorece que puedan ser incorporados por algunas ADN polimerasas. Debido a ello, una vez observada la capacidad de *LiPolθ* de insertar desoxinucleótidos (principalmente dCTP) frente a 8oxodG (ver figuras 36 y 37), se decidió evaluar si también era capaz de insertar ribonucleótidos frente a esta lesión.

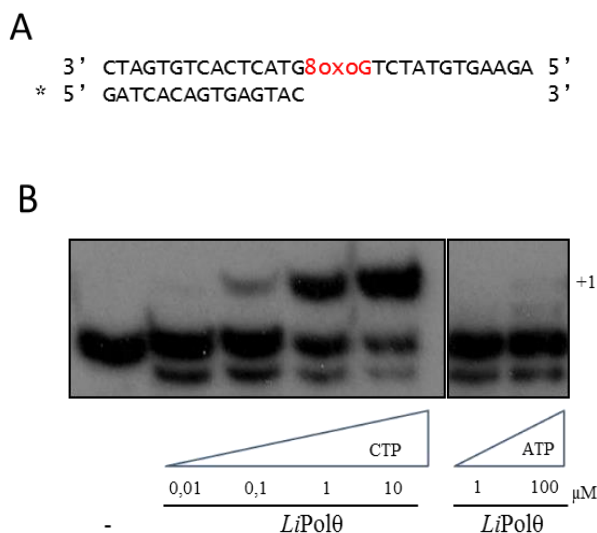


Figura 40. Inserción de ribonucleótidos frente a 8oxodG. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de inserción de ATP y CTP frente a 8oxodG. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.14.4 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM de Mn^{2+} .

LiPolθ incorpora únicamente el ribonucleótido CTP frente a 8oxodG (figura 40), comportándose al igual que con los desoxinucleótidos de manera fiel. No obstante, del mismo modo que ocurre con otras polimerasas (Tabor y Richardson, 1989), la eficiencia de incorporación de CTP sigue siendo muy inferior a la de dCTP (figura 37C), por lo que no es probable que los ribonucleótidos sean empleados *in vivo* por *LiPolθ* para la superación de lesiones 8oxodG.

3.2 Lesión timina glicol (*Tg*).

Timina glicol (5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimina; *Tg*) es el principal producto de oxidación de la timina. Esta lesión se origina a partir de la interacción de los radicales hidroxilo con el doble enlace entre los átomos de carbono 5 y 6 de la timina. La presencia de *Tg* en el ADN produce un fuerte bloqueo de la horquilla de replicación, no solo durante la inserción de nucleótido frente a la lesión sino también, y de un modo muy acusado, en el paso de extensión (Aller y cols., 2007; Yoon y cols., 2010).

3.2.1 Actividad ADN polimerasa de *LiPolθ* en lesión Tg.

Para evaluar la capacidad de síntesis a través de la lesión Tg por parte de *LiPolθ*, se emplearon moléculas tipo molde/cebador abierto, cuya primera base sin aparear fuera T o Tg. El ensayo se realizó en presencia de los 4 desoxinucleótidos.

A

3' CATGGGCCCTAGGCATG^XCGCGTAGTCGACGTC 5'
* 5' GTACCCGGGGATCCGTAC

B

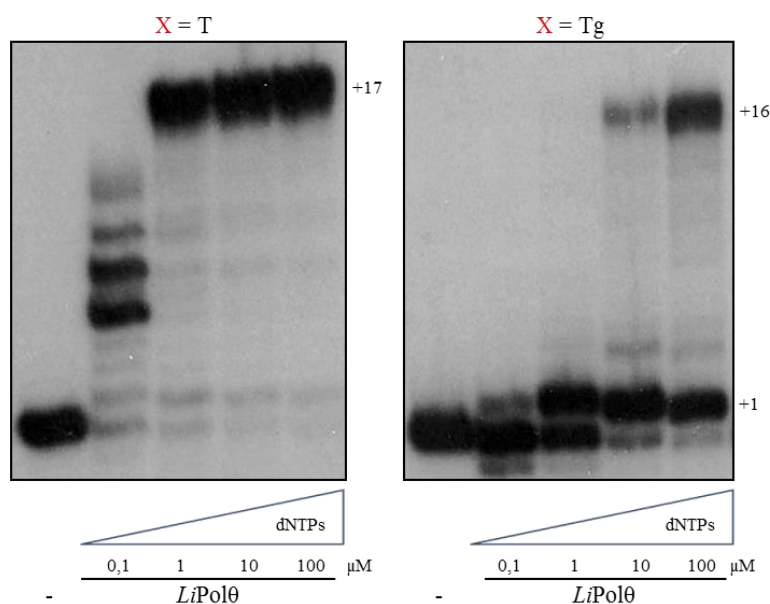


Figura 41. Actividad de *LiPolθ* en lesiones Tg. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. B. Ensayo de superación de lesión Tg. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.15.1 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM de Mn²⁺.

Como se observa en la figura 41B, *LiPolθ* es capaz de llevar a cabo la inserción de un nucleótido frente a la lesión Tg. Además, parte de los nucleótidos incorporados frente a la base Tg son posteriormente extendidos. No obstante, el hecho de que la extensión máxima alcanzada en presencia de la lesión fuese 1 nucleótido más corta que en el sustrato control, sugería que los productos de longitud mayor a 1 nucleótido no eran

consecuencia de la extensión directa de la base insertada frente a la lesión, sino de un mecanismo de dislocación de la hebra molde.

3.2.2 Síntesis frente a Tg.

La base modificada Tg, a pesar de ser considerada poco mutagénica (Basu y cols., 1989), puede promover la inserción de nucleótido erróneo, preferentemente dGTP, por parte de algunas polimerasas (Fischhaber y cols., 2002; Kusumoto y cols., 2002). Para determinar si *LiPolθ* realiza la inserción frente a Tg de forma fiel, o por el contrario muestra preferencia por la incorporación de algún nucleótido incorrecto, se evaluó la inserción frente a Tg con los 4 dNTPs por separado.

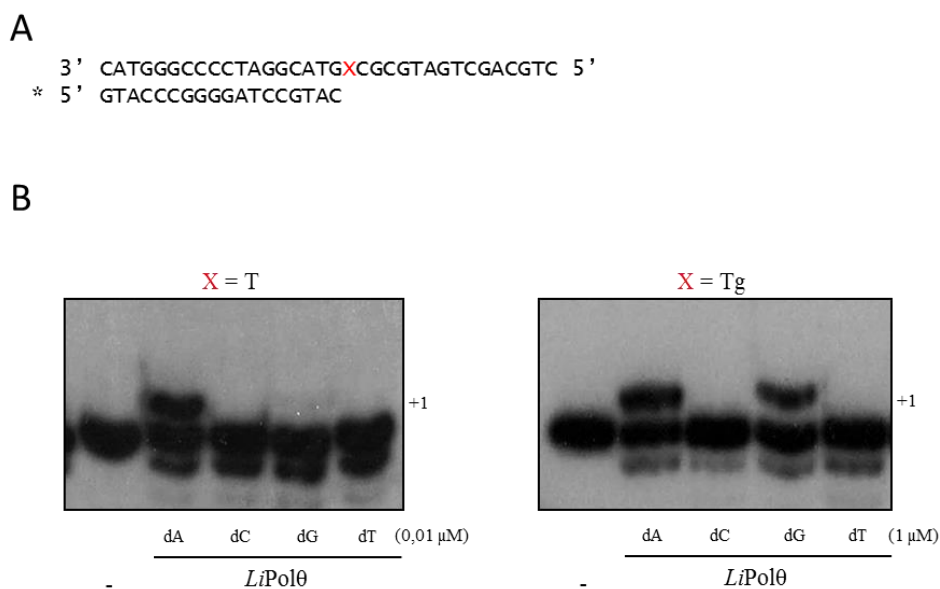
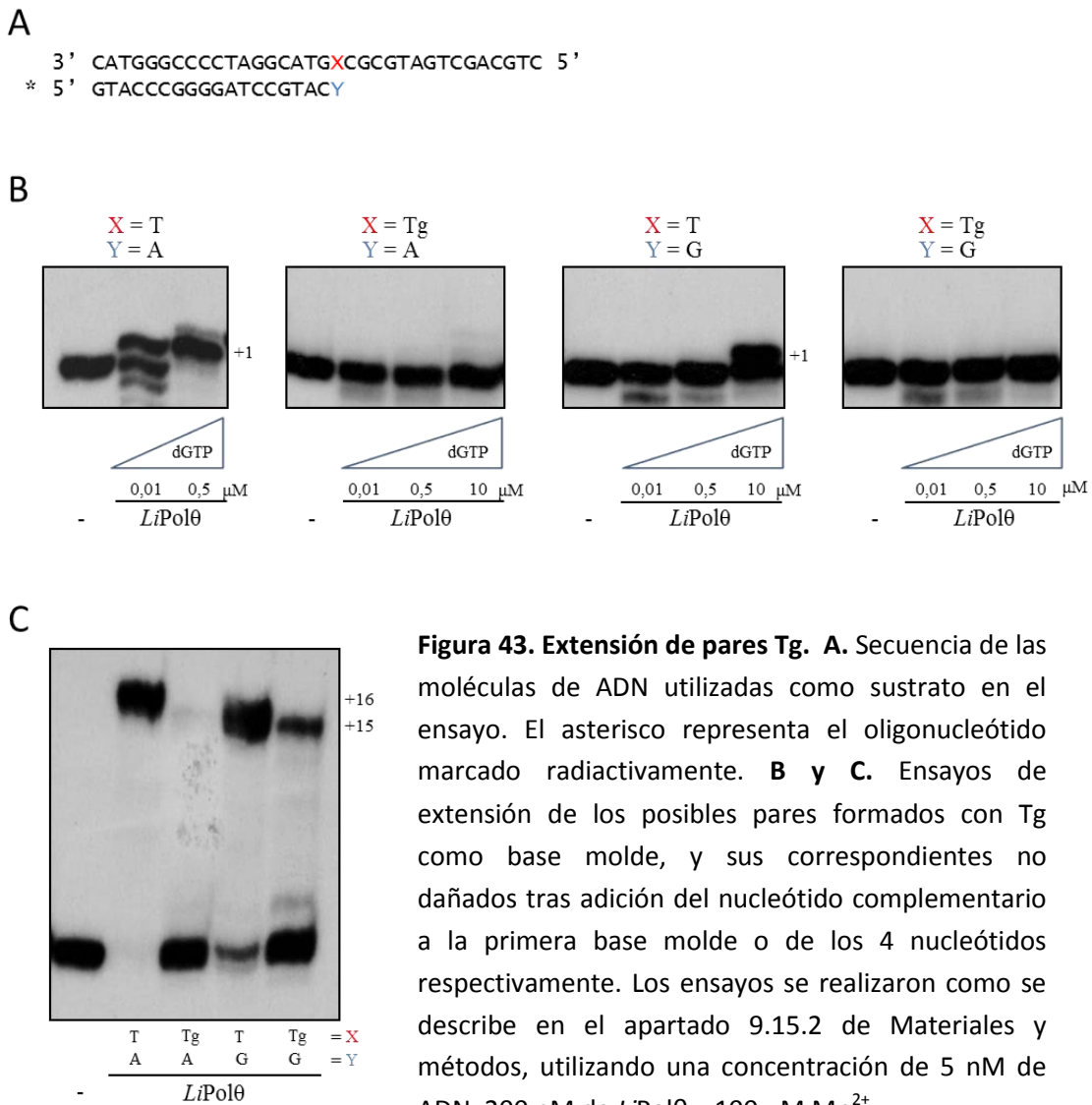


Figura 42. Síntesis frente a Tg. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de inserción de nucleótido frente a la lesión Tg. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.15.1 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM Mn²⁺.

LiPolθ inserta tanto dATP como dGTP frente a Tg (figura 42B). La inserción de dATP ha de ser dirigida por Tg, en cambio, la incorporación de dGTP puede ser el resultado tanto de la inserción frente a Tg como frente a la base adyacente en 5' dC.

3.2.3 Extensión de un par Tg.

Para confirmar que los productos de extensión de longitud superior a +1 observados en la figura 41B eran debidos a un fenómeno de dislocación de la hebra molde y no a extensión directa, se llevaron a cabo ensayos de extensión de los pares Tg:dAMP y Tg:dGMP junto con sus correspondientes no dañados dT:dAMP y dT:dGMP. Las reacciones se llevaron a cabo tanto en presencia de únicamente el nucleótido complementario a la primera base molde (figura 43B), como de los 4 dNTPs (figura 43C).



LiPolθ es capaz de realizar la extensión directa de los pares dT:dAMP y dT:dGMP pero no de los pares cuya base molde es Tg (figura 43B). A pesar de poder llevar a cabo la extensión directa del extremo desapareado dT:dGMP (figura 43B), en presencia de los 4

dNTPs, *LiPolθ* realiza la extensión de este par mediante dislocación de la hebra molde, generando un producto final un nucleótido más corto que el correspondiente a la extensión del par correcto dT:dAMP (figura 43C). Este mecanismo tiene lugar también durante la extensión de un par Tg:dGMP (figura 43C). En ambos casos, la base molde (dT o Tg) incorrectamente apareada con el nucleótido del extremo del cebador (dGMP), se sitúa en posición extrahelicoidal y es la base contigua en 5' (dC) la que aparea con dGMP, formando así un par correcto que puede ser extendido de un modo más eficiente. Por tanto, en base a los resultados anteriores se puede concluir que los pares Tg (Tg:dAMP y Tg:dGMP) no pueden ser extendidos por *LiPolθ* de manera directa, pero sí mediante mecanismos de dislocación de la hebra molde.

3.3 Lesión O⁶-metildesoxiguanina (6mdG).

La formación de la base modificada O⁶-metildesoxiguanina (6mdG) tiene lugar como consecuencia de la acción de diversos agentes alquilantes. Esta lesión supone un fuerte bloqueo para las ADN polimerasas (Dosanjh y cols., 1991; Singh y cols., 1996). Además, la lesión 6mdG es altamente mutagénica puesto que favorece la inserción de timina en lugar de citosina por parte de la mayoría de las polimerasas dando lugar a transiciones G:A. Esto es debido a que el par 6mdG:dT presenta una mayor similitud geométrica con un par canónico de Watson y Crick que el par 6mdG:dC (Spratt y Levy). Por consiguiente, la lesión 6mdG supone un reto para las ADN polimerasas puesto que la síntesis a través de ella suele estar parcialmente inhibida y asociada a errores.

3.3.1 Actividad ADN polimerasa de LiPolθ en lesión 6mdG.

La capacidad de síntesis de *LiPolθ* a través de lesiones 6mdG se evaluó utilizando moléculas tipo molde/cebador abierto cuya primera base sin aparear fuera dG o 6mdG en presencia de los 4 nucleótidos.

A

```

3' GACGTCGACTACGCGXCATGCCTAGGGGCCCATG 5'
*5' CTGCAGCTGATGCGC 3'

```

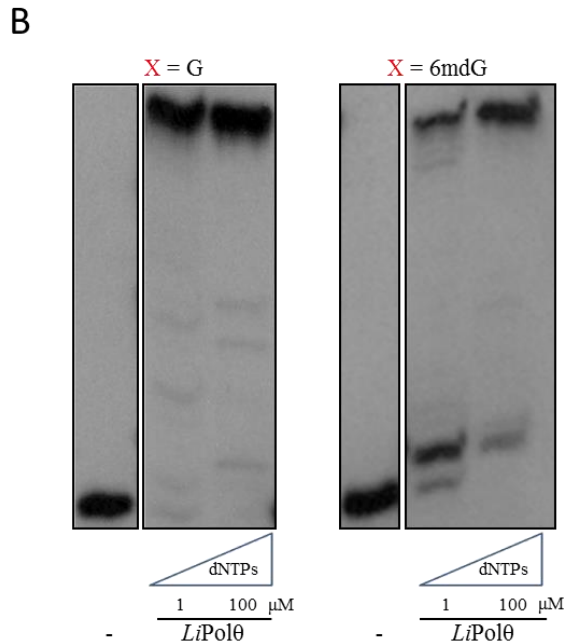


Figura 44. Actividad de *LiPolθ* en lesiones 6mdG. **A.** Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de síntesis a través de la lesión 6mdG. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 9.16 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM Mn^{2+} .

Como se observa en la figura 44B, *LiPolθ* es capaz de llevar a cabo la inserción de un nucleótido frente a la lesión 6mdG y la posterior extensión a partir del mismo, dando lugar a un producto final de igual longitud que con el sustrato no dañado.

3.3.2 Síntesis frente a 6mdG.

Para determinar si *LiPolθ* realiza la superación de la lesión 6mdG libre de errores o por el contrario muestra preferencia por la incorporación de algún nucleótido incorrecto, se evaluó la inserción frente a 6mdG con los 4 dNTPs por separado.

A

3' GACGTCGACTACGCGXCATGCCTAGGGGCCCATG 5'
*5' CTGCAGCTGATGCGC 3'

B

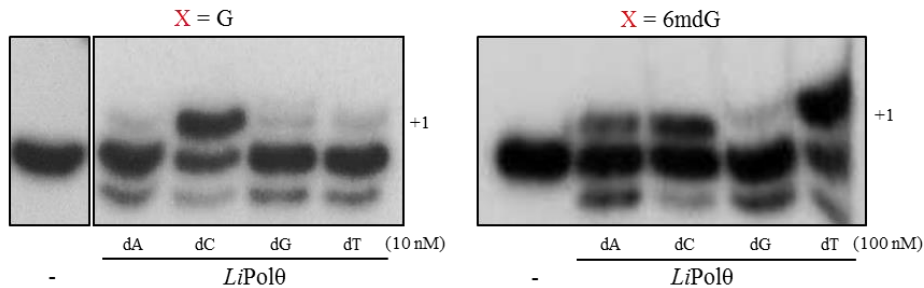


Figura 45. Síntesis frente a 6mdG. A. Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de inserción de nucleótido frente a la lesión 6mdG. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.16 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μ M Mn^{2+} .

LiPolθ, de acuerdo a las reglas de Watson y Crick, inserta preferentemente dCTP frente a dG (Watson y Crick, 1953). En cambio, cuando la base molde es 6mdG, el nucleótido incorporado principalmente por *LiPolθ* es dTTP. Por tanto, al igual que la mayoría de las polimerasas, *LiPolθ* se comporta preferentemente de forma mutagénica durante la síntesis a través de 6mdG.

3.4 Sitios abásicos.

El daño más común en el ADN bajo condiciones fisiológicas consiste en la aparición de sitios abásicos (AP) como consecuencia de la acción de las ADN glicosilasas y de la hidrólisis espontánea del enlace N-glicosídico situado entre el azúcar y la base en el ADN (Lindahl, 1993). Los sitios abásicos, además de producir un fuerte bloqueo de las ADN polimerasas, poseen un elevado potencial mutagénico debido a la ausencia de información genética (Avkin y cols., 2002). En estudios *in vivo* realizados tanto en bacterias (Lawrence y cols., 1990) como en células humanas (Avkin y cols., 2002), se ha observado la inserción preferente de adenina frente a los sitios abásicos. En concordancia con estos resultados, ensayos *in vitro* con diversas polimerasas purificadas (entre ellas la polimerasa θ humana) muestran una incorporación preferencial de

purinas, particularmente adenina, y en menor medida guanina frente a estas lesiones (Randall y cols., 1987; Seki y cols., 2004).

3.4.1 Actividad ADN polimerasa de *LiPolθ* en sitios abásicos.

La actividad de *LiPolθ* frente a sitios abásicos se evaluó empleando moléculas tipo molde/cebador abierto no dañadas o con uno o dos análogos sintéticos de sitios abásicos (tetrahidrofurano).

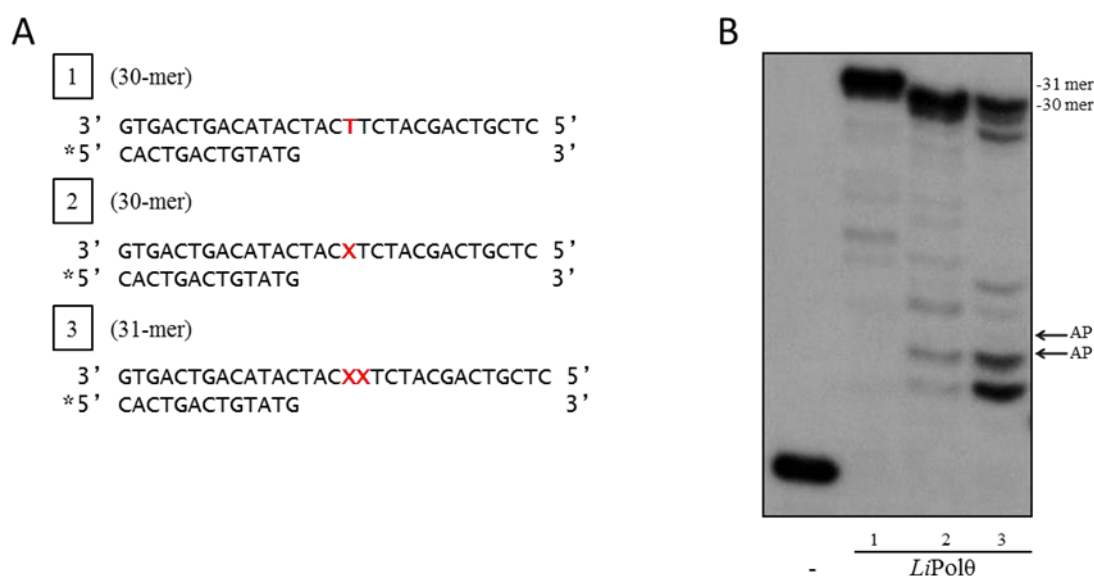


Figura 46. Actividad de *LiPolθ* en sitios abásicos (I). **A.** Secuencias de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa los oligonucleótidos marcados radiactivamente y “X” la posición del sitio abásico. El sustrato número 1 se empleó control de polimerización frente a un molde no dañado. **B.** Ensayo de síntesis a través de sitios abásicos. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.17 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 100 μ M de dNTPs, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μ M Mn^{2+} . AP indica la posición del sitio abásico (en los oligonucleótidos donde esté presente).

LiPolθ es capaz de sintetizar a través de sitios abásicos (Figura 46B). En el sustrato no dañado, que fue empleado como control (sustrato 1 de las figuras 46A y 46B), *LiPolθ* extiende el cebador hasta el final de la hebra molde y posteriormente incorpora un nucleótido de forma no dirigida, para dar lugar un producto de 31 nucleótidos. En cambio, en los sustratos que presentan uno o dos sitios abásicos, *LiPolθ* genera un producto de una extensión máxima uno o dos nucleótidos más corto de lo esperado, respectivamente (sustratos 2 y 3 de las figuras 46A y 46B).

Con el fin de evaluar con mayor detalle la eficiencia de *LiPol* θ para superar la lesión de sitios abásicos, se realizó de nuevo el ensayo de polimerización empleando en esta ocasión varias concentraciones de nucleótidos.

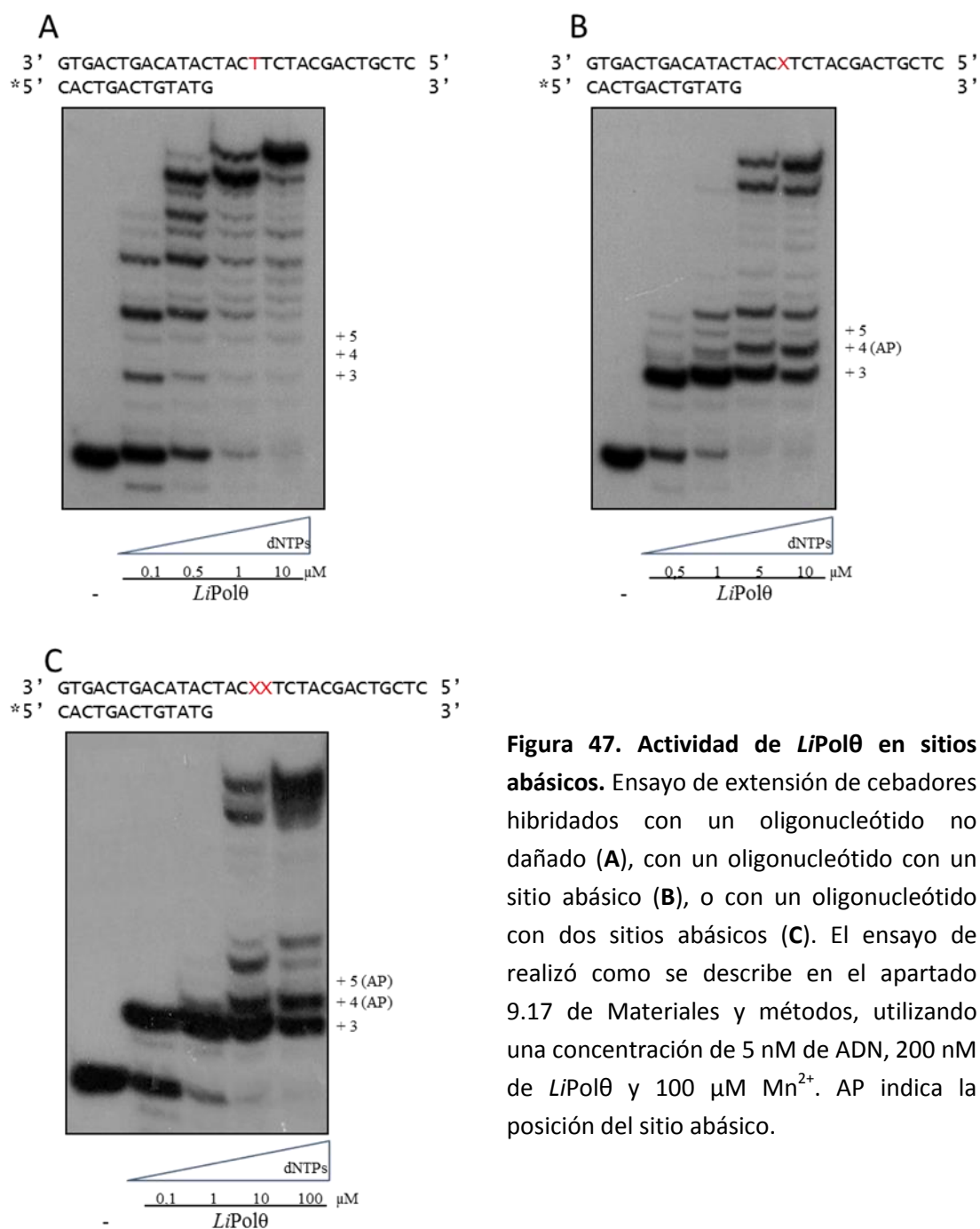


Figura 47. Actividad de *LiPol* θ en sitios abásicos. Ensayo de extensión de cebadores hibridados con un oligonucleótido no dañado (A), con un oligonucleótido con un sitio abásico (B), o con un oligonucleótido con dos sitios abásicos (C). El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.17 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPol* θ y 100 μ M Mn^{2+} . AP indica la posición del sitio abásico.

En el ensayo realizado con el oligonucleótido que contiene un sitio abásico, éste se encuentra en posición +4. Por ello una extensión del cebador de 5 nucleótidos o más es indicativa de que la lesión ha sido superada. Mediante densitometrado se determinó la concentración de nucleótidos necesaria para que el 50% del sustrato se encontrase

extendido como mínimo 5 nucleótidos. Este valor reveló que la eficiencia de polimerización frente a un sitio abásico es 30 veces menor que en un molde no dañado. La presencia de un doble sitio abásico consecutivo produce una mayor disminución de la eficiencia de polimerización. ($\approx 6,5$ veces con respecto a un sitio abásico).

3.4.2 Síntesis frente a un sitio abásico.

LiPol θ es capaz de sintetizar a través de sitios abásicos. No obstante, en comparación con la polimerización llevada a cabo en un sustrato no dañado, *LiPol* θ genera un producto de una extensión máxima uno o dos nucleótidos menor, dependiendo de si la hebra molde posee uno o dos sitios abásicos respectivamente (figura 46B). Un mecanismo que podría explicar estos resultados sería la dislocación por estabilización por dNTPs. En este caso *LiPol* θ produciría la dislocación de los sitios abásicos, situándolos en posición extrahelicoidal entre el nucleótido del extremo del cebador y el nucleótido de la cadena molde situado en 5', el cual pasaría a dirigir la entrada de nucleótido. Para comprobar si este mecanismo estaba teniendo lugar, se llevó a cabo un ensayo de inserción de los 4 nucleótidos por separado frente a un sitio abásico cuya base situada en 5' fuese A, C, G o T.

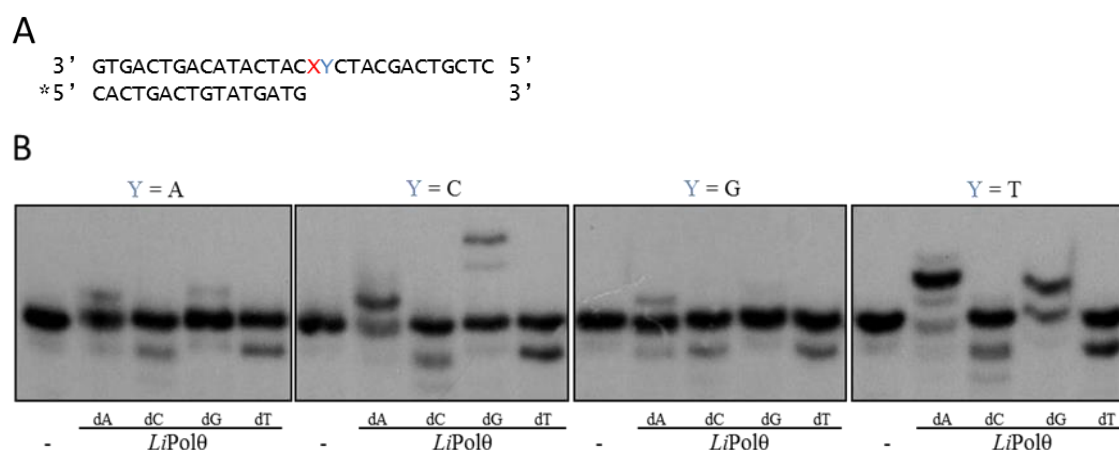


Figura 48. Síntesis frente a un sitio abásico. A. Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. “X” indica la posición del sitio abásico. “Y” representa el nucleótido situado en 5' con respecto al sitio abásico (A, C, G o T). **B.** Ensayo de inserción de nucleótido frente a un sitio abásico. Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 9.17 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 10 μ M de cada dNTP, 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPol* θ y 100 μ M Mn^{2+} .

Como se observa en la figura 48B, *LiPolθ* incorpora dATP y dGTP con independencia de la base situada en posición 5' con respecto al sitio abásico, lo que indica que la inserción de nucleótido no viene dirigida por esta base. Por lo tanto, *LiPolθ* actúa, al igual que la mayoría de las ADN polimerasas, insertando una purina, preferentemente adenina, frente a un sitio abásico. En aquellos casos donde la base situada en 5' del sitio abásico es una adenina o una guanina solo se produce la inserción de un nucleótido (dATP o dGTP) frente al sitio abásico. Si la base situada en 5' con respecto al sitio abásico es una citosina se observa la inserción de un nucleótido dATP adenina (frente al sitio abásico) y de tres nucleótidos dGTP (frente al sitio abásico y las dos citosinas situadas en 5'). Del mismo modo, cuando la base situada en 5' del sitio abásico es una timina, se observa la inserción de nucleótido dGTP (frente al sitio abásico) y de dos nucleótidos dATP (frente al sitio abásico y la timina situada en 5'). En resumen, estos datos indican que *LiPolθ* realiza la inserción de un nucleótido (dATP o dGTP) frente a un sitio abásico y posteriormente lleva a cabo la extensión de ese sitio abásico si dispone de los nucleótidos adecuados para ello. No obstante, en los ensayos realizados en presencia de los 4 nucleótidos el producto de extensión final era uno o dos nucleótidos más corto de lo esperado cuando la hebra molde contenía uno o dos sitios abásicos respectivamente (figura 46B). Esto podría explicarse por el contexto de secuencia de las moléculas utilizadas para realizar dichos ensayos (3'-...CXT...-5' y 3'-...CXXT...-5'). *LiPolθ* en primer lugar insertaría preferentemente dATP frente a un sitio abásico y posteriormente, en lugar de realizar la extensión directa, llevaría a cabo un mecanismo de dislocación de la hebra molde por deslizamiento situando el sitio o sitios abásicos en posición extrahelicoidal y generando un par correcto T:A. Este mecanismo explicaría por qué a pesar de realizar la incorporación frente al sitio abásico con independencia de la base situada en posición 5', se obtienen productos más cortos, y concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en los apartados 2.3.8 y 3.2.3 donde quedaba de manifiesto la preferencia de *LiPolθ* por extender extremos apareados generados mediante dislocación de la hebra molde, antes que realizar la extensión directa de un extremo desapareado. El hecho de que en el ensayo de síntesis frente a un sitio abásico (figura 48B), se observe la incorporación de nucleótidos correcta cuando la base situada en posición 5' del sitio abásico es una citosina o una timina, y el nucleótido añadido es dGTP o dATP respectivamente, en lugar de observarse la incorporación de un nucleótido menos como consecuencia del mecanismo de dislocación de la hebra molde por deslizamiento, puede explicarse por la metodología del ensayo. Al haberse añadido cada nucleótido por separado, llega un momento en el que *LiPolθ* no puede seguir polimerizando por carecer del nucleótido complementario a la base molde y produce la recolocación de la hebra molde, situando nuevamente la adenina o guanina insertada

inicialmente, frente al sitio abásico, pudiendo incorporar un nucleótido más. En presencia de los 4 nucleótidos, *LiPolθ* tras producir la dislocación de la hebra molde y generar un par correcto continuaría polimerizando, por lo que no se produciría la recolocación de la hebra molde, generándose un producto final más corto.

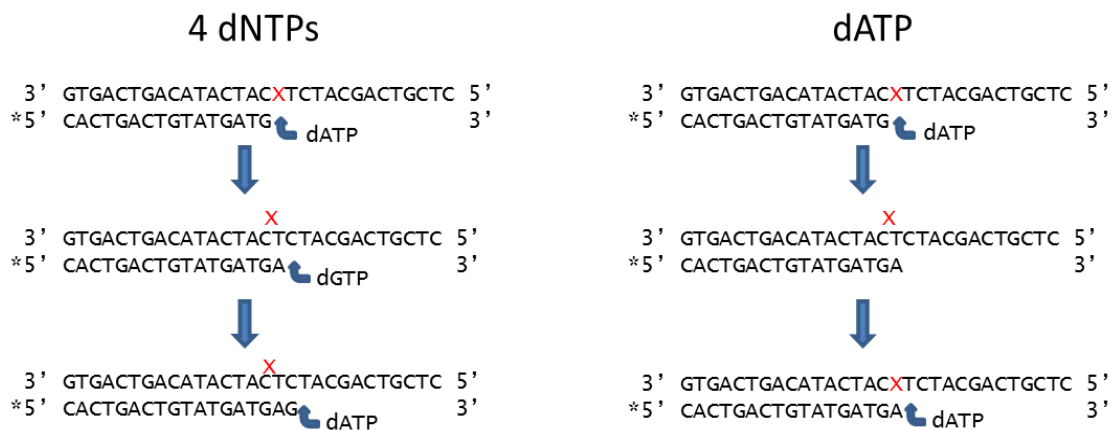


Figura 49. Representación esquemática del mecanismo de superación de un sitio abásico en presencia de dATP o de los 4 dNTPs. X indica la posición del sitio abásico (AP). *LiPolθ* incorpora preferentemente dATP frente al sitio abásico. Posteriormente, en lugar de realizar la extensión directa del extremo AP:A, produce la dislocación de la hebra molde, situando el sitio abásico en posición extrahelicoidal y generando un par correcto T:A. En presencia de los 4 dNTPs, *LiPolθ* realiza la extensión de este par, generando la delección de un nucleótido. Por el contrario, en presencia de únicamente dATP, *LiPolθ* no puede extender el par T:A generado, por lo que recoloca la hebra molde, quedando nuevamente enfrentados el sitio AP y la adenina incorporada inicialmente. A continuación se produciría la inserción de un segundo dATP frente a la timina molde, tras lo cual finaliza el proceso de polimerización. Esta segunda inserción pone de manifiesto que, a pesar de la preferencia por extender a partir de un par correcto, *LiPolθ* también puede extender un extremo AP de forma directa.

3.5 Dímeros de timina (CDP).

La radiación UV induce la formación principalmente de dos tipos de lesiones en el ADN: fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) y dímeros de pirimidinas cis-sin ciclobutano (CPD) (Yoon y cols., 2009). De estas dos lesiones, la más común es el CPD, el cual representa alrededor de tres cuartas partes de los fotoproductos, siendo los más frecuentes los formados entre dímeros de timinas (Gonzalez-Púmariega y cols., 2009). En el daño CPD, la unión covalente de las dos pirimidinas adyacentes impide que la pirimidina 5' del dímero pueda ser posicionada fuera del centro activo de la polimerasa mientras que se produce la inserción de nucleótido frente a la pirimidina 3'. Por lo tanto

la síntesis a través de la lesión CPD solo es posible si ambas pirimidinas pueden ser alojadas simultáneamente en el interior del centro activo. El hecho de que la mayoría de las polimerasas puedan acomodar un solo nucleótido molde en su centro activo es el motivo por el cual esta lesión produce un fuerte bloqueo de la síntesis de ADN (Jonhson y cols., 2005).

3.5.1 Actividad ADN polimerasa de *LiPolθ* en CPD.

La actividad de *LiPolθ* en lesiones CPD se determinó nuevamente empleando moléculas tipo molde/cebador abierto no dañadas y con un daño CPD. El ensayo se realizó en presencia de los 4 dNTPs.

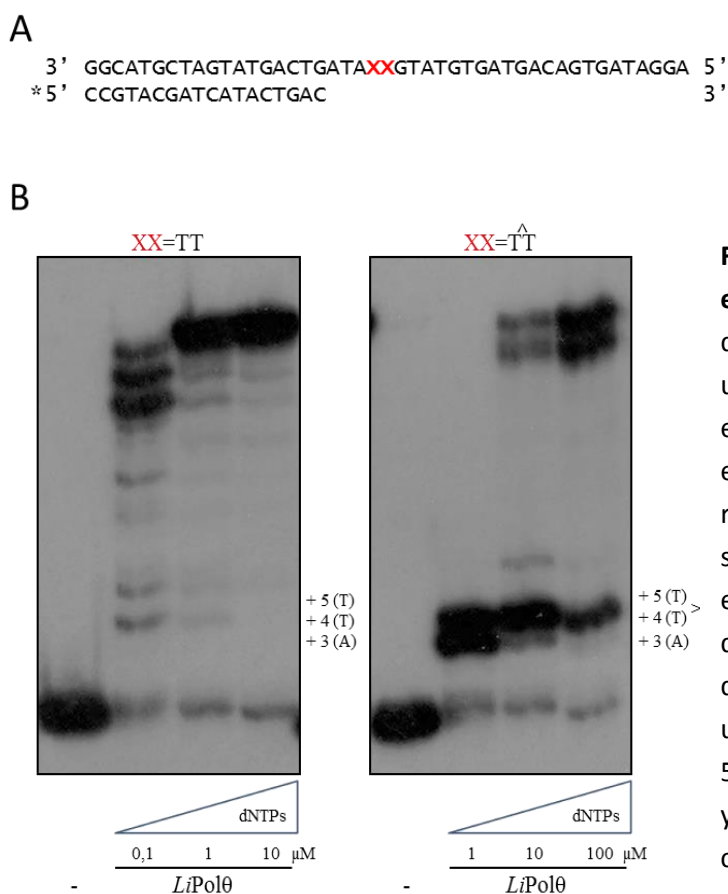


Figura 50. Actividad de *LiPolθ* en lesiones CPD. **A.** Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de superación de daño CPD. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.18.1 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μM Mn²⁺. El acento circunflejo refleja el enlace covalente entre las dos timinas.

Según lo observado en la figura 50B, *LiPolθ* presenta un bloqueo parcial de su actividad durante la síntesis a través de CPD. Esta disminución en la tasa de inserción de

timina del CPD aunque de un modo mucho menos eficiente (la concentración de nucleótidos empleada en el sustrato con daño CPD es 10^3 veces mayor).

Para determinar con mayor precisión la preferencia de incorporación de dATP sobre dGTP frente a la timina 3' de un CPD, se realizó de nuevo un ensayo de incorporación de ambos nucleótidos a diferentes concentraciones.

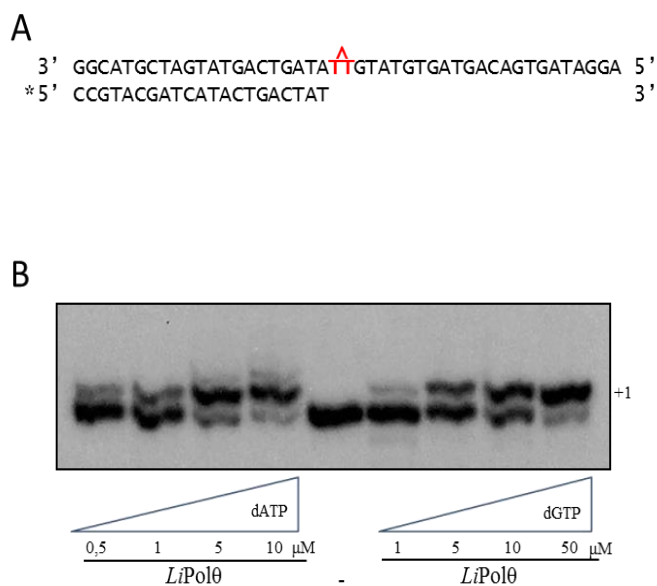


Figura 52. Inserción de dATP y dGTP frente a la timina 3' de la lesión CPD. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente y el acento circunflejo el enlace covalente entre las dos timinas. **B.** Ensayo de inserción de nucleótido frente a la timina 3' del daño CPD. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.18.1 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μ M Mn^{2+} .

LiPolθ inserta dATP con una eficiencia \approx 5 veces mayor que dGTP, lo que indica un cierto grado de fidelidad en este primer paso de superación de la lesión.

Posteriormente se evaluó la inserción frente a la timina 5' del CPD. Para ello se emplearon cebadores que contenían dAMP o dGMP en su extremo 3' de tal forma que apareasen con la timina 3' del CPD, simulando las dos posibles incorporaciones que podría llevar a cabo *LiPolθ*.

A

3' GGCATGCTAGTATGACTGATAXXGTATGTGATGACAGTGATAGGA 5'
 *5' CCGTACGATCATACTGACTATYA 3'

B

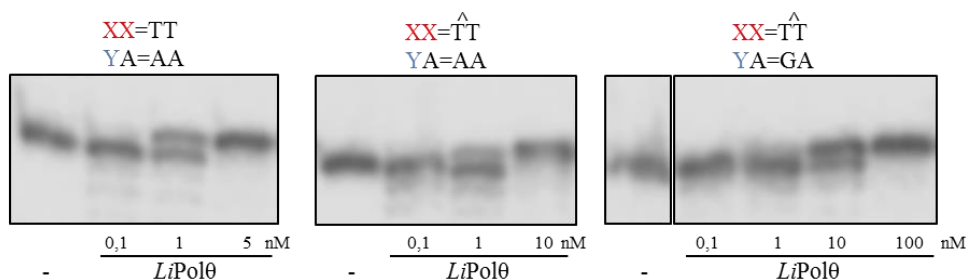


Figura 54. Extensión de un daño CPD. A. Secuencia de las moléculas de ADN utilizadas como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de extensión de un extremo formado por la lesión CPD. El ensayo se realizó como se describe en el apartado 9.18.3 de Materiales y métodos, utilizando una concentración de 5 nM de ADN, 200 nM de *LiPolθ* y 100 μ M Mn^{2+} . El acento circunflejo representa el enlace covalente entre las dos timinas.

LiPolθ realiza la extensión de un extremo CPD de manera relativamente eficiente. En el caso de que haya incorporado previamente dGTP frente a la timina 3', *LiPolθ* extiende el par 5'T:A con una eficiencia aproximadamente 6 veces menor en comparación con el control. Si por el contrario *LiPolθ* ha insertado dATP frente a la timina 3', situación más probable, realiza la extensión del extremo generado con una eficiencia aproximadamente 2 veces menor con respecto al molde no dañado.

3.6. Actividad de *LiPolθ* en TLS.

La actividad de *LiPolθ* en TLS se resume en la siguiente tabla:

Lesión	Inserción	Extensión directa
8oxoG	Sí (eficiente)	Sí
Tg	Sí (ineficiente)	No
6mG	Sí (eficiente)	Sí
AP	Sí (ineficiente)	Sí
CPD	Sí (ineficiente)	Sí

Tabla 2. Tabla resumen de la actividad de *LiPolθ* en TLS. 8oxoG: 8oxo-desoxiguanina. Tg: timina glicol. 6mg: O6-metildesoxiguanina AP: abásico. CPD: dímero de pirimidinas cis-sin ciclobutano.

4. Análisis de la actividad *in-vivo* de LiPolθ.

4.1. Implicación de LiPolθ en la tolerancia frente a agentes genotóxicos.

Tras llevar a cabo un estudio previo de la actividad polimerasa de LiPolθ *in vitro*, se evaluó su posible función *in vivo*. Para ello se generó una línea de transfectantes estables de *Leishmania* capaz de sobre-expresar LiPolθ. Esta herramienta permitió la realización de un estudio comparativo de tolerancia a distintos agentes genotóxicos entre las poblaciones de parásitos silvestres (*wild-type*) y transfectados. Una mayor tolerancia por parte de los parásitos transfectados podría ser indicativo de la función de LiPolθ *in vivo*.

4.1.1 Obtención de una línea de transfectantes estables de Leishmania con capacidad de sobre-expresión de la proteína LiPolθ.

Para la obtención de una línea estable de parásitos que sobre-expresase LiPolθ, se llevó a cabo la transfección de promastigotes de *L. infantum* y *L. major* con la construcción pTEX - LiPolθ. El empleo de *L. major* fue debido al alto grado de similitud entre los ortólogos LiPolθ y LmPolθ (91% de identidad) y a la mayor eficiencia de transfección mostrada por *L. major* con respecto a *L. infantum* (Quijada y cols., 2003). Los transfectantes se seleccionaron mediante la adición de concentraciones crecientes de geneticina (ver apartado 10.1 de Materiales y métodos). La sobre-expresión de LiPolθ se confirmó mediante *Western blot* a partir de extractos proteicos de promastigotes silvestres y transfectados de ambas especies de *Leishmania*.

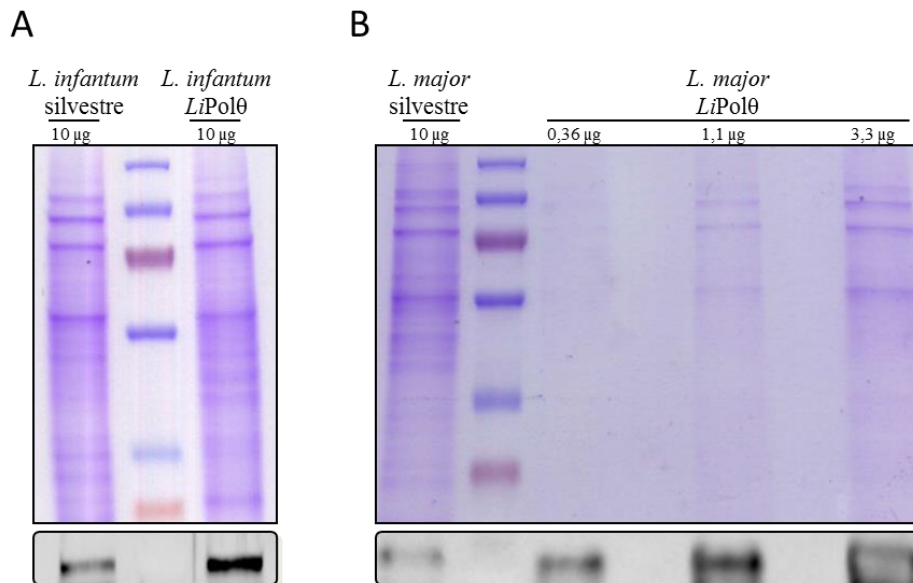


Figura 55. Niveles de expresión de *LiPolθ* en parásitos silvestres y transfectados. A. *Leishmania infantum*. B. *Leishmania major*. Diferentes cantidades de extractos proteicos (10 µg en el caso de *L. infantum* silvestre, *L. infantum* transfectada y *L. major* silvestre, y 0,36-3,3 µg en el caso de *L. major* transfectada) fueron analizadas por duplicado mediante SDS-PAGE. Uno de los gels fue empleado como control de carga tras tinción con azul de Coomassie, el otro fue analizado mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-*LiPolθ*.

Como se observa en la figura 55, los transfectantes de ambas especies de *Leishmania* son capaces de sobre-expresar *LiPolθ*, si bien esta sobre-expresión es más acentuada en el caso de *L. major*. Esta mayor expresión puede justificarse por el grado de adaptación que mostraron los promastigotes a la adición creciente de antibiótico, siendo en el caso de *L. major* resistentes a niveles de 100 µg/ml de G418, mientras que los transfectantes de *L. infantum* se mantuvieron a 50 µg/ml de G418. No obstante, estudios iniciales de sensibilidad a distintos agentes genotóxicos mostraron que las poblaciones de promastigotes silvestres y transfectantes presentaban un comportamiento similar con independencia de la especie de *Leishmania*. Por todo ello se decidió emplear los promastigotes de *L. major* en los subsiguientes ensayos de actividad *in vivo*.

4.1.2 Estudio del patrón de crecimiento de los transfectantes estables de *L. major*.

Una vez comprobada la sobre-expresión de *LiPolθ* por los transfectantes, se realizó una curva de crecimiento de los promastigotes silvestres y transfectados para evaluar el efecto de la sobre-expresión de la proteína en la tasa de crecimiento del parásito.

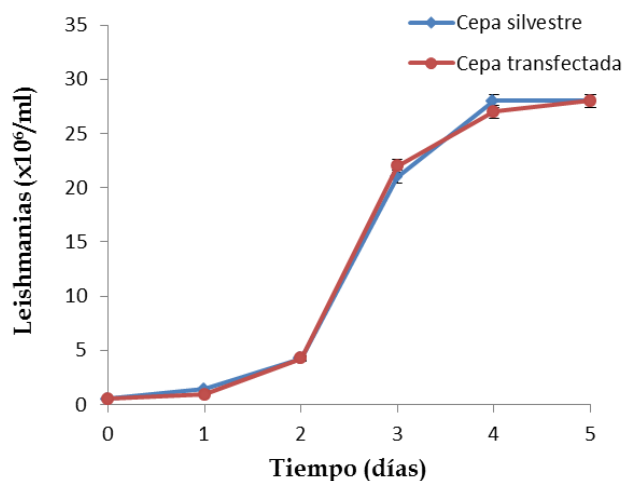


Figura 56. Curva de crecimiento de promastigotes silvestres y transfectados de *L. major*. Curva de crecimiento media de tres cultivos. Los promastigotes fueron cultivados en medio 199 suplementado con 20% suero. En el caso de los transfectantes se añadió G418 a una concentración de 100 µg/ml.

Según lo observado en la figura 56, tanto los promastigotes transfectados como los silvestres muestran una tasa de proliferación y una densidad celular final similar, por lo que se concluye que la sobre-expresión de *LiPolθ* no altera la curva de crecimiento del parásito.

4.1.3 Participación de *LiPolθ* en la resistencia al daño oxidativo.

Para determinar si *LiPolθ* podía participar en la tolerancia al daño oxidativo *in vivo*, se evaluó la proliferación de parásitos silvestres y transfectados en presencia de concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), agente oxidativo capaz de generar múltiples bases oxidadas en el ADN, incluido 8oxodG.

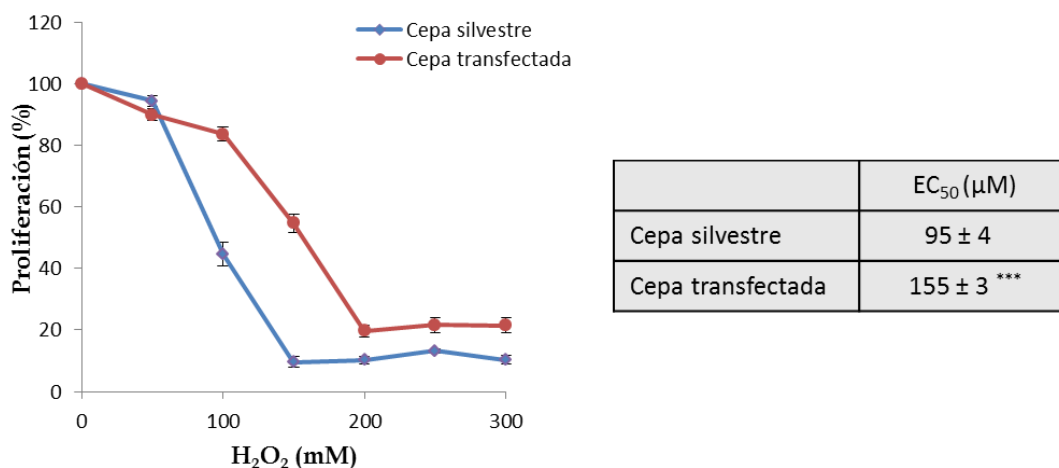


Figura 57. Inhibición de la capacidad proliferativa de promastigotes silvestres y transfectados en presencia de H₂O₂. Promastigotes silvestres y transfectados recogidos en fase logarítmica tardía fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂ durante 72h. El porcentaje de promastigotes viables se determinó mediante MTT (ver apartado 10.3 de Materiales y métodos). En la gráfica se observa la diferente sensibilidad de los promastigotes silvestres y transfectados al H₂O₂. En la tabla están representados los valores de concentración de H₂O₂ necesaria para causar una inhibición de la tasa de crecimiento del 50% (EC₅₀) en cada una de las líneas celulares. El signo (***) indica una diferencia significativa con respecto al control silvestre (p<0,001).

Los promastigotes que sobre-expresan la proteína *LiPolθ* muestran una mayor resistencia a la toxicidad producida por el H₂O₂ en comparación con los promastigotes silvestres (figura 57). Este resultado sugiere una posible participación de *LiPolθ* en la tolerancia al daño oxidativo.

4.1.4 Participación de *LiPolθ* en la resistencia a uniones intercatenarias.

Los agentes alquilantes bifuncionales y algunos compuestos de platino poseen la habilidad de generar diversos tipos de aductos en el ADN, incluyendo uniones intracatenarias e intercatenarias (*interstrand crosslink*; ICL). Aunque ambos tipos de uniones interfieren con el metabolismo celular, los ICL son particularmente citotóxicos, puesto que impiden la separación de las hebras de ADN, imposibilitando procesos esenciales como la transcripción y la replicación. Por ello, aunque los ICL típicamente constituyen un bajo porcentaje de todos los aductos formados, se consideran los principales responsables de la citotoxicidad de estos compuestos. (Ho y Schärer, 2010)

Para evaluar la posible participación de *LiPolθ* en la tolerancia-reparación de ICL, se evaluó la tasa de proliferación de promastigotes silvestres y transfectados en presencia de los compuestos antineoplásicos cisplatino y mitomicina C. El cisplatino induce la formación de ICL entre los átomos N7 de dos residuos de guanina en el surco mayor del ADN. La mitomicina C en cambio, genera ICL en el surco menor del ADN, entre los grupos 2-amino de dos bases guanina (Ho y Schärer, 2010; Kuwabara y cols., 2003).

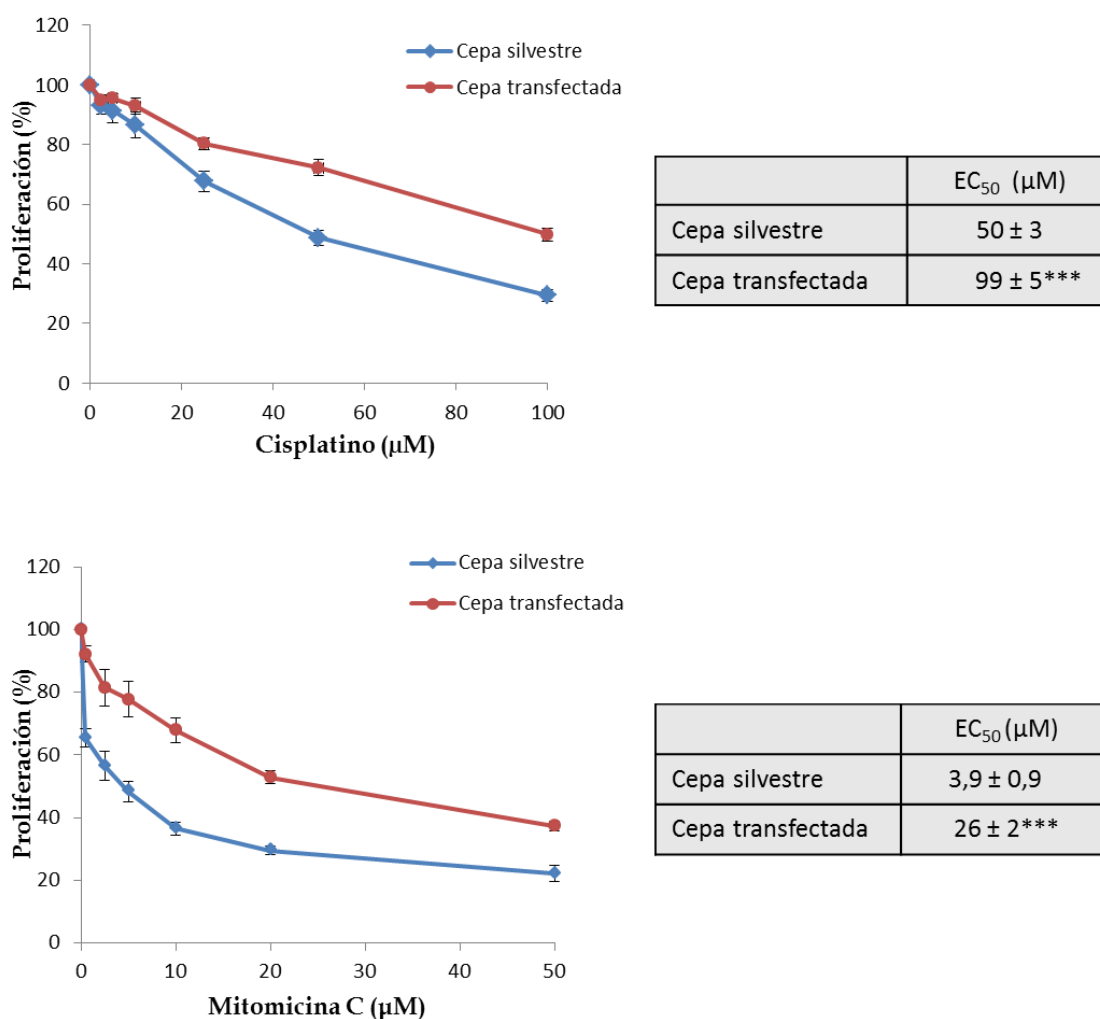


Figura 58. Inhibición de la capacidad proliferativa de promastigotes silvestres y transfectados en presencia de cisplatino o mitomicina C (MMC). Promastigotes silvestres y transfectados recogidos en fase logarítmica tardía fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de cisplatino o MMC durante 72h. El porcentaje de promastigotes viables se determinó mediante MTT (ver apartado 10.3 de Materiales y métodos). En las gráficas se observa la diferente sensibilidad de los promastigotes silvestres y transfectados al cisplatino y la MMC. En las tablas se encuentran representados los valores EC₅₀ (concentración necesaria para producir una inhibición de la tasa de crecimiento del 50%) de los distintos agentes de ICL para cada una de las líneas celulares. El signo (***) indica una diferencia significativa con respecto al control silvestre ($p < 0,001$).

Los promastigotes transfectados, que sobre-expresan la proteína *LiPolθ*, muestran una mayor resistencia a la toxicidad de los compuestos cisplatino y mitomicina C (figura 58). Por consiguiente, los datos anteriores sugieren la participación de *LiPolθ* en la tolerancia-reparación de ICL.

4.1.5 Participación de *LiPolθ* en la resistencia a radiación UV.

La radiación UV genera múltiples lesiones en el ADN, principalmente dímeros de pirimidina unidos covalentemente por un anillo de ciclobutano y fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona. Para comprobar si *LiPolθ* podía tener un papel en la tolerancia a los daños producidos por luz UV se evaluó la proliferación celular de parásitos silvestres y transfectados tras ser expuestos a diferentes dosis de radiación UV.

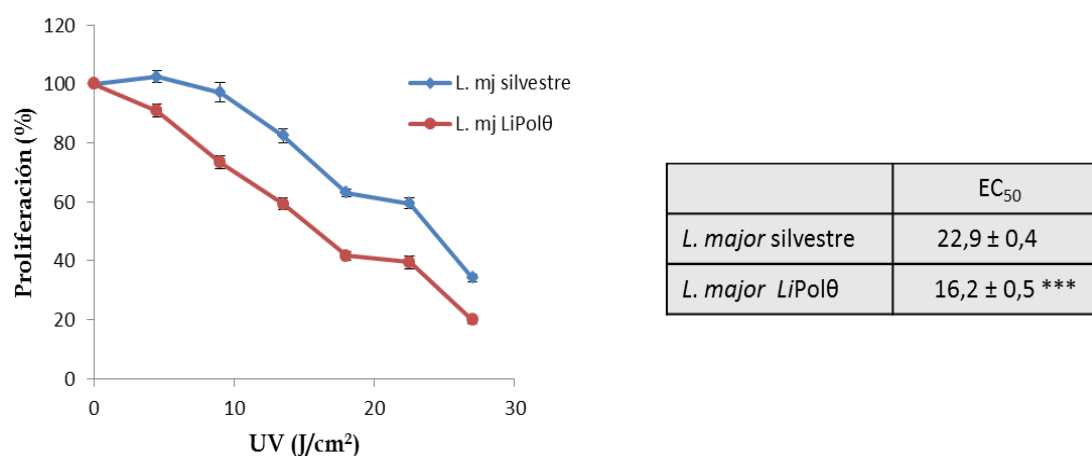


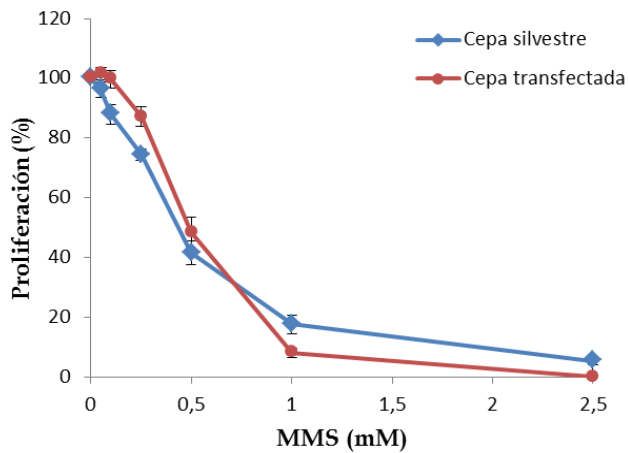
Figura 59. Inhibición de la capacidad proliferativa de promastigotes silvestres y transfectados tras exposición a radiación ultravioleta. Promastigotes silvestres y transfectados recogidos en fase logarítmica tardía fueron expuestos distintos tiempos a radiación UV. El porcentaje de promastigotes viables se determinó mediante MTT (ver apartado 10.3 de Materiales y métodos). En la gráfica se observa la diferente sensibilidad de los promastigotes silvestres y transfectados a radiación UV. En la tabla están representados los valores de radiación UV necesaria para producir una inhibición de la tasa de crecimiento del 50% (EC₅₀) en cada una de las líneas celulares. El signo (***) indica una diferencia significativa con respecto al control silvestre (p<0,001).

En la figura 59 se observa como los parásitos silvestres muestran una mayor resistencia al daño producido por radiación UV en comparación con los transfectados. Según este resultado, podría interpretarse que *LiPolθ* puede participar en la tolerancia al daño generado por radiación UV aunque de manera poco eficiente. Al encontrarse sobre-expresada, *LiPolθ* debe haber competido y desplazado a otra polimerasa más eficiente en la reparación de este tipo de lesiones (probablemente *LiPolη*) provocando la disminución en la tasa de proliferación.

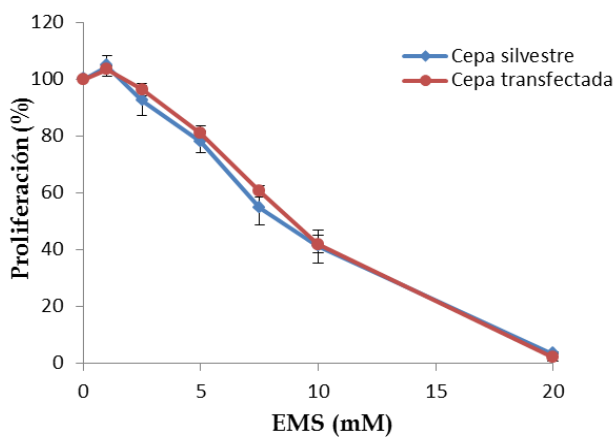
4.1.6 Participación de LiPolθ en la resistencia al daño alquilante.

La actividad de *LiPolθ* frente al daño alquilante fue evaluada mediante la exposición de promastigotes silvestres y transfectados a tres agentes alquilantes: metil metanosulfonato, etil metanosulfonato (EMS) y etil nitrosourea (ENU) (figura 60). Los compuestos MMS y EMS alquilan principalmente los átomos de nitrógeno de las bases del ADN, mientras que ENU induce preferentemente la alquilación de los átomos de oxígeno. Los principales aductos generados por el MMS son: N7-metilguanina (82%), N-3 metiladenina (11%) y N7-metiladenina (1,8%) (Wyatt y Pittman, 2006). El EMS induce principalmente la formación de N7-etilguanina (61%), enlaces etil fosfotriéster (12%) y N3-etiladenina (4,5%) (Gocke y cols., 2009). La ENU induce mayoritariamente la formación de enlaces etil fosfotriéster (56%), N7-etilguanina (11,5%), O6-etilguanina (8,5%), O2-etilimina (7,6%) y N3-etiladenina (4,2%) (Doak y cols., 2007).

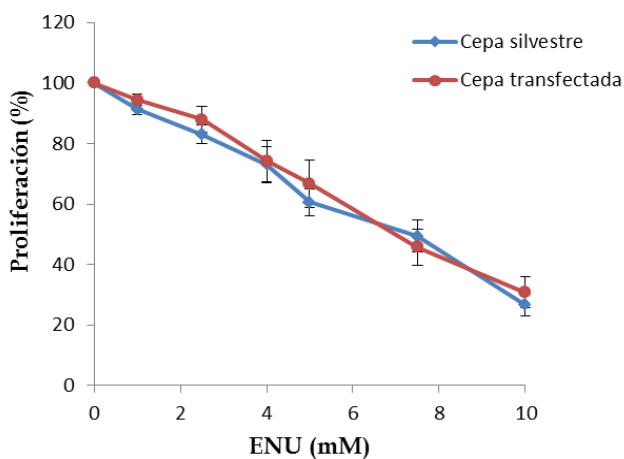
Debido a que las lesiones N7-alquilguanina y los enlaces alquil fosfotriéster no poseen por sí mismos efectos mutagénicos ni citotóxicos (Doak y cols., 2007; Shrivastav y cols., 2010; Wyatt y Pittman, 2006), se considera que las lesiones N3-alquiladenina, en el caso del MMS y EMS, y O6-etilguanina, en el caso de ENU, son las principales responsables de la toxicidad de estos compuestos (Brennand y Margison, 1986; Fronza y Gold, 2004; Plosky y cols., 2008; York y Modrich, 2006).



	EC ₅₀ (mM)
Cepa silvestre	0,47 ± 0,04
Cepa transfectada	0,51 ± 0,04



	EC ₅₀ (mM)
Cepa silvestre	9,0 ± 0,8
Cepa transfectada	9,1 ± 0,3



	EC ₅₀ (mM)
Cepa silvestre	6,8 ± 0,7
Cepa transfectada	6,9 ± 0,8

Figura 60. Inhibición de la capacidad proliferativa de promastigotes silvestres y transfectados en presencia de MMS, EMS o ENU. Promastigotes silvestres y transfectados recogidos en fase logarítmica tardía fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de MMS, EMS o ENU durante 72h. El porcentaje de promastigotes viables se determinó mediante MTT (ver apartado 10.3 de Materiales y métodos). En las gráficas se observa la sensibilidad de los parásitos frente a cada uno de los compuestos. La tablas muestran el valor EC₅₀ (concentración necesaria para producir una inhibición de la tasa de crecimiento del 50%) de los distintos agentes alquilantes para cada una de las líneas celulares.

Como se observa en la figura 60, la sobre-expresión de *LiPolθ* no conlleva un incremento de la resistencia frente a ninguno de los agentes alquilantes monofuncionales ensayados, independientemente del mecanismo de acción de estos compuestos. Las diferencias entre los valores de EC_{50} obtenidos para los compuestos MMS y EMS, es consecuencia no solo del mayor porcentaje de lesiones N3-alquiladenina generado por el MMS, sino también de la mayor reactividad de los agentes metilantes con respecto a los etilantes, puesto que los grupos alquilo de menor longitud son transferidos con mayor eficiencia (Doak y cols., 2007). Los resultados anteriores sugieren que *LiPolθ* no debe participar en la tolerancia al daño alquilante *in vivo*.

4.2. Participación de *LiPolθ* en el proceso de infección.

Los promastigotes de *Leishmania spp.* tras ser inoculados en el hospedador vertebrado a través de la picadura del insecto vector, serán fagocitados por las células del sistema fagocítico-mononuclear (macrófagos principalmente). Estos macrófagos van a liberar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno como mecanismo de defensa. El desarrollo o no de la enfermedad dependerá inicialmente de si el parásito es capaz de resistir el ataque de estas especies reactivas y diferenciarse en el estadio amastigote.

Debido a la mayor resistencia al peróxido de hidrógeno (una de las principales especies reactivas de oxígeno liberadas por los macrófagos) mostrada por los transfectantes que sobre-expresan *LiPolθ* (ver resultado 4.1.3), se decidió evaluar si la presencia de esta proteína confería cierta ventaja durante el proceso de infección. Para ello se llevaron a cabo ensayos de infección de macrófagos RAW con promastigotes de *L. major* silvestres y transfectados.

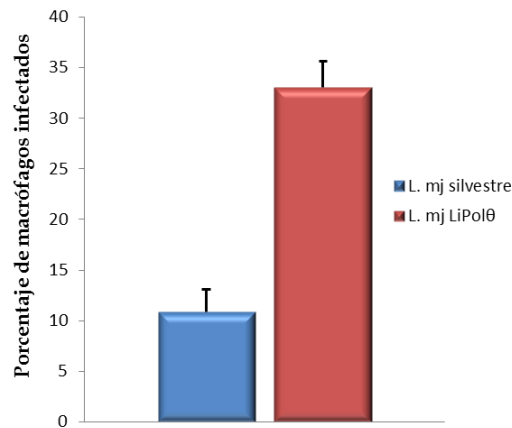


Figura 61. Ensayo de infección de macrófagos RAW con promastigotes silvestres y transfectados. Los promastigotes metacíclicos de ambas líneas de *Leishmania* (silvestre y transfectada) fueron aislados mediante PNA y co-incubados en una placa de 24 pocillos con macrófagos RAW en una proporción 4:1 durante 4 horas a 32 °C. Tras la infección se realizaron lavados para retirar los promastigotes libres y se continuó la incubación de los macrófagos a 32 °C durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con tinción May-Grünwald-Giemsa (ver apartado 11 de Materiales y métodos). Representación esquemática del número de macrófagos infectados por los promastigotes silvestres y transfectados. Las flechas señalan la posición de los amastigotes en el interior de los macrófagos. El signo (***) indica una diferencia significativa con respecto al control silvestre ($p < 0,001$).

Tal y como se muestra en la figura 61, la tasa de infección de los promastigotes silvestres fue del 11% mientras que la de los promastigotes que sobre-expresan *LiPolθ* fue del 33%. Esta diferencia significativa ($p < 0,001$) puede deberse o bien a una mayor capacidad para infectar o a una mayor resistencia a los mecanismos leishmanicidas del macrófago por parte de los promastigotes transfectados. La capacidad de *LiPolθ* de superar *in vitro* lesiones 8oxodG de forma no mutagénica así como la mayor tolerancia de las leishmanias transfectadas al H_2O_2 sugieren que la función desempeñada por *LiPolθ* puede estar relacionada con la resistencia a los mecanismos de defensa del macrófago.

5

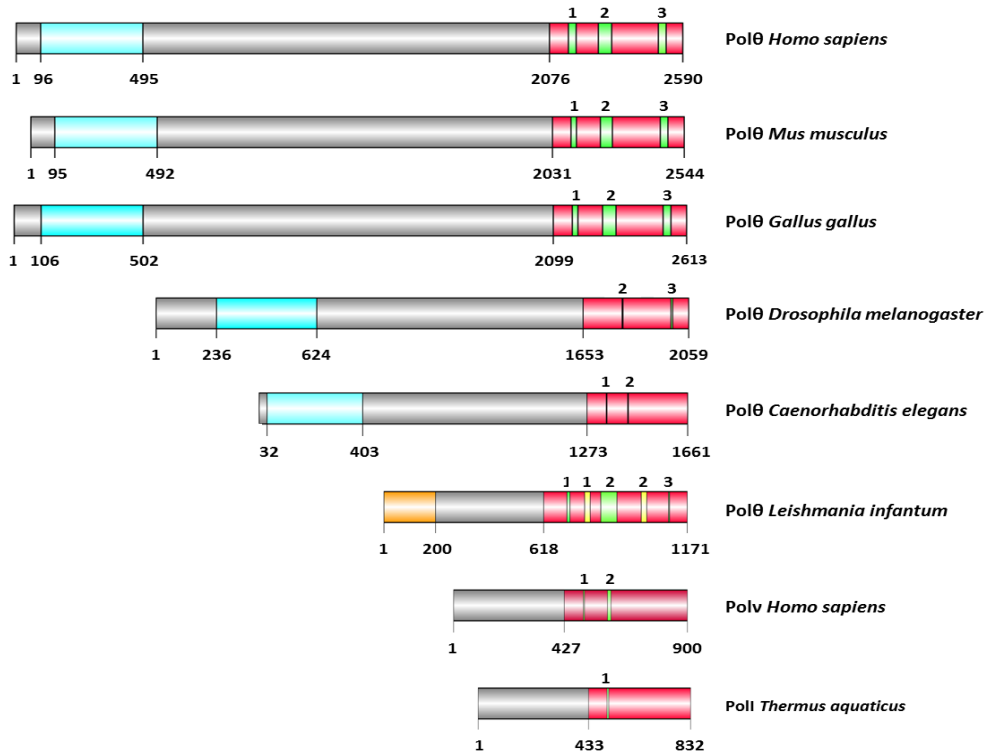
Discusión

1. Relación estructural entre las ADN polimerasa θ de diferentes organismos.

La información genética de los diferentes organismos se encuentra almacenada en sus moléculas de ADN, las cuales son replicadas y reparadas por las ADN polimerasas. En tripanosomátidos, a partir de la secuenciación del genoma de diversas especies (Berriman y cols., 2005; Ivens y cols., 2005; Peacock y cols., 2007), el número de ADN polimerasas identificadas se ha incrementado en gran medida, siendo actualmente 16 las ADN polimerasas anotadas. Dichas enzimas se agrupan en 5 familias: A, B, X, Y y RT (ver tabla 1). Dentro de la familia A se encuentran clasificadas las ADN polimerasas PolIA, PolIB, PolIC, PolID y Pol θ . Mientras que las cuatro primeras han comenzado a estudiarse en *T. brucei* y se ha descrito que pueden estar implicadas en reparación y replicación del ADN mitocondrial (Bruhn y cols., 2010; Klingbeil y cols., 2002), la ADN polimerasa θ aún no ha sido caracterizada en ningún tripanosomátido.

La ADN polimerasa θ fue identificada inicialmente en *D. melanogaster* (Harris y cols., 1996). Esta enzima presenta un tamaño aproximado de 229 kDa y consta de un dominio helicasa en su extremo amino terminal, una región separadora central y un dominio ADN polimerasa en su extremo C-terminal. Posteriormente fue identificada y clonada la ADN polimerasa θ humana (Seki y cols., 2003). Esta polimerasa presenta un tamaño aproximado de 290 kDa y una disposición de dominios similar a *DmPol θ* . Sin embargo, *hPol θ* consta de 3 insertos, entre los motivos conservados del dominio polimerasa, los cuales están prácticamente ausentes en *D. melanogaster* (Seki y cols., 2004). Por su parte, la ADN polimerasa θ de *L. infantum*, *LiPol θ* , presenta un peso molecular aproximado de 125 kDa. El menor tamaño de la proteína se debe principalmente a que en tripanosomátidos (y ciertos invertebrados), a diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores, la polimerasa θ carece de un dominio helicasa en su extremo N-terminal (figura 62A). Por el contrario, *LiPol θ* presenta en dicho extremo una región rica en residuos prolina, serina y treonina que constituye una zona con un gran número de sitios predichos de fosforilación, por lo que este dominio podría regular de algún modo la actividad de *LiPol θ* en respuesta a modificaciones postraduccionales. *LiPol θ* posee los 6 motivos característicos de las polimerasas de la familia A, incluyendo todos los residuos esenciales para la catálisis (ver figura 9; (Loh y Loeb, 2005), y presenta los tres 3 insertos propios de las polimerasas θ , si bien la longitud de estos difiere con respecto a los de vertebrados superiores (figura 62B). Además *LiPol θ* posee dos insertos adicionales compartidos exclusivamente con polimerasas θ de tripanosomátidos.

A



B

Especie	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	
<i>Homo sapiens</i> (Polθ)	22	52	33	Vertebrados
<i>Mus musculus</i> (Polθ)	22	51	33	
<i>Gallus gallus</i> (Polθ)	22	52	33	
<i>Drosophila melanogaster</i> (Polθ)	0	7	7	Invertebrados
<i>Culex quinquefasciatus</i> (Polθ)	0	7	7	
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Polθ)	4	3	0	
<i>Caenorhabditis remanei</i> (Polθ)	4	3	0	
<i>Leishmania infantum</i> (Polθ)	13	63	5	
<i>Homo sapiens</i> (Polv)	6	15	1	
<i>Thermus aquaticus</i> (Poll)	7	0	0	

Figura 62. Relación estructural entre diversas ADN polimerasas de la familia A. A. Comparación estructural entre ADN polimerasas de la familia A de diferentes organismos. Las regiones azul y rojo se corresponden con los dominios helicasa y polimerasa respectivamente. En naranja se representa la región rica en prolina, serina y treonina de *LiPolθ*. Los números en la parte inferior indican la posición aminoacídica. Los números en la parte superior señalan cada uno de los insertos. Los tres insertos característicos de *hPolθ* se muestran en verde, mientras que los dos insertos propios de *LiPolθ* se muestran en amarillo. B. Longitud de los tres insertos propios de *hPolθ* en distintas polimerasas de la familia A.

Estudios genotóxicos realizados con diferentes compuestos, muestran un grado variable de sensibilidad asociado a la ausencia de Pol θ en los distintos organismos. Se ha sugerido que la diferente longitud del dominio central así como de los insertos en el dominio polimerasa de la Pol θ , podría ser la causa de estas diferencias. Por tanto, es posible que Pol θ pueda desempeñar distinta función dependiendo del organismo al que pertenezca. No obstante, ésta no debe ser la única causa, puesto que también se han observado diferencias entre organismos cuyas ADN polimerasas θ presentan una región central e insertos de similar longitud. En este sentido cabe destacar que en vertebrados superiores está presente Pol ν , una polimerasa ortóloga de Pol θ . Sin embargo, Pol ν está ausente en invertebrados, por lo que es posible que Pol θ pueda tener un papel más multipotencial en estos organismos.

En la figura 63 se muestra las relaciones filogenéticas entre algunos miembros conocidos o predichos de ADN polimerasas de la familia A pertenecientes a diferentes organismos. El árbol filogenético se realizó empleando tres segmentos cortos y muy conservados del sitio activo de polimerización (motivos 3, 4 y 5), con el fin de evitar que la presencia de inserciones o deleciones interfiriese en el análisis.

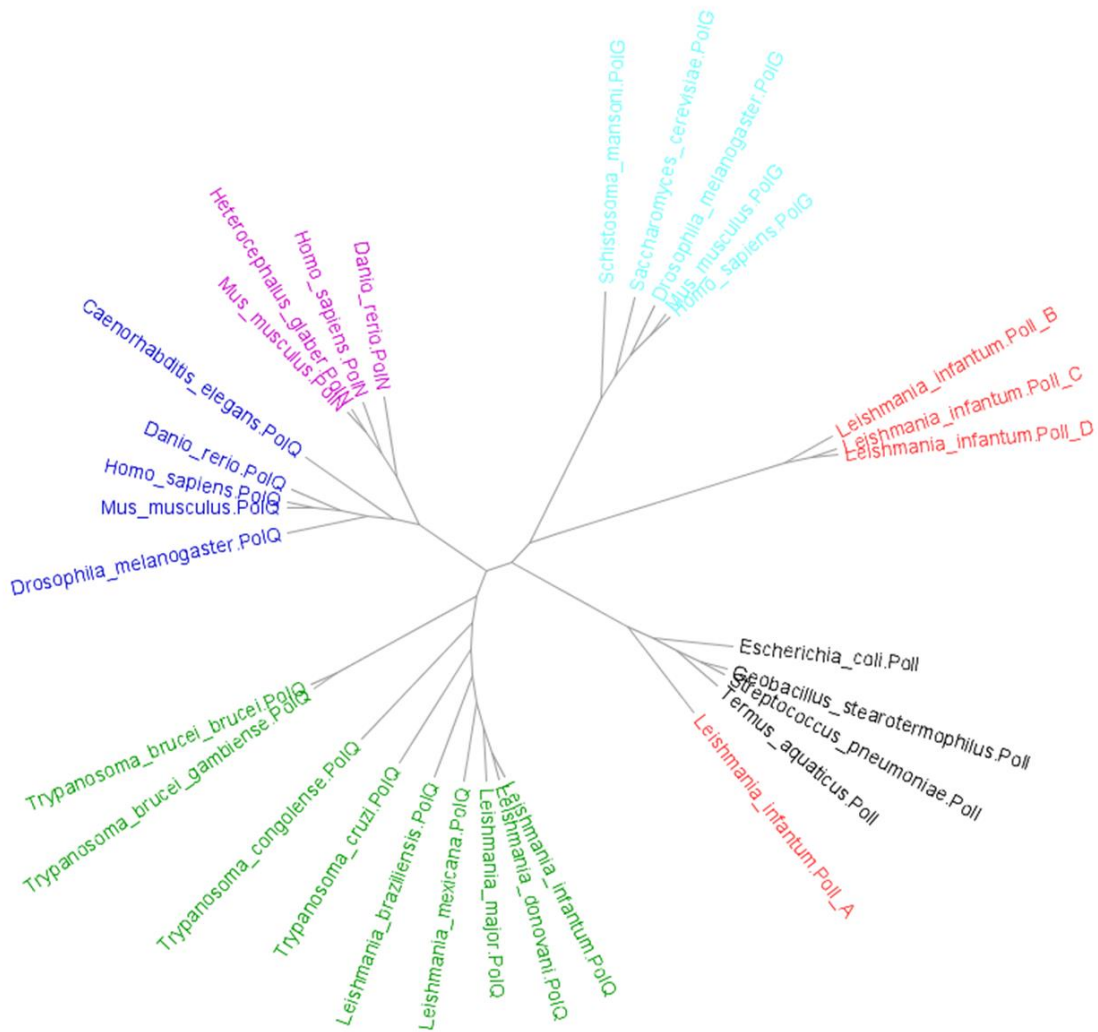


Figura 63. Relación evolutiva entre diversas ADN polimerasas de la familia A. Árbol filogenético que representa las distancias evolutivas entre distintos miembros de la familia A. Las ADN polimerasas se agrupan en diferentes subfamilias: Polθ de tripanosomátidos (verde), Polθ de eucariotas multicelulares (azul oscuro), Polv (fucsia), Poly (azul claro), polimerasas tipo I mitocondriales de *L. infantum* (rojo) y polimerasas tipo I bacterianas (negro).

Como se observa en la figura 63, las polimerasas θ de tripanosomátidos se encuentran alejadas evolutivamente de las polimerasas encargadas de replicación mitocondrial, como son Poly o PolIB, PolIC y PolID. A su vez, las polimerasas θ de tripanosomátidos comparten, como era de esperar, una mayor relación con sus ortólogas de eucariotas superiores (Polθ y Polv) que con las polimerasas de tipo I bacterianas. No obstante, las polimerasas θ de tripanosomátidos conforman un grupo claramente diferenciado, por lo que podrían presentar características propias.

2. Niveles de expresión endógena y localización subcelular de LiPol θ .

En *Leishmania*, al igual que en otros organismos (Lemée y cols., 2010; Pang y cols., 2005), la polimerasa θ presenta una localización subcelular mayoritariamente nuclear, por lo que su función principal debe ser la reparación del ADN de este compartimento celular. No obstante, una pequeña fracción de LiPol θ se encuentra también presente en la mitocondria por lo que puede desarrollar un papel minoritario en la reparación del ADN del kinetoplasto. Es posible que la localización subcelular nuclear de LiPol θ se deba a la presencia de la secuencia KRLLRSRQRHRRR (residuos 512-527) que actuaría como señal dirigiendo a la proteína al núcleo. En cambio, la localización minoritaria de LiPol θ en la mitocondria podría estar mediada por el extremo amino terminal rico en residuos serina, prolina y treonina. Esta región es susceptible de sufrir modificaciones postraduccionales (como ya se ha indicado, posee un gran número de sitios de fosforilación), las cuales pueden modificar la localización subcelular original de las proteínas (Blenis y Resh, 1993).

LiPol θ mostró un nivel de expresión similar a lo largo de la curva de crecimiento de los promastigotes, no observándose diferencias significativas entre promastigotes procíclicos en los distintos días de la curva o entre promastigotes procíclicos y metacíclicos. Este resultado contrasta con lo observado en estudios previos de análisis del perfil de expresión génica mediante *microarrays*, en los cuales se detectó una mayor expresión del gen que codifica para LiPol θ en promastigotes metacíclicos con respecto a promastigotes procíclicos (Alcolea y cols., 2009). Estos datos indican que la sobre-expresión génica en promastigotes metacíclicos no se traduce en una mayor expresión proteica y que por tanto la regulación de la expresión de LiPol θ tiene lugar, al igual que ocurre con la mayoría de las proteínas (Clayton, 2002), a nivel post-transcripcional. En las formas *amastigotes-lik*, en cambio, se observa una disminución en el nivel de expresión de LiPol θ con respecto a los promastigotes. Este resultado concuerda con la menor actividad traductora descrita en amastigotes con respecto a promastigotes (Cloutier y cols., 2012). No obstante, este resultado habría de ser corroborado en amastigotes intracelulares debido a que, aunque los *amastigotes-like* resultan una herramienta ampliamente utilizada para el estudio del estadio intracelular de *Leishmania*, pueden existir algunas diferencias entre ambas formas.

3. Caracterización bioquímica de *LiPolθ*.

LiPolθ es una ADN polimerasa dependiente de molde que realiza la incorporación de nucleótidos con baja procesividad, por lo que debe ser requerida para la síntesis de fragmentos cortos de ADN y no para la replicación del genoma. Al igual que la mayoría de las ADN polimerasas, *LiPolθ* lleva a cabo la incorporación preferentemente del nucleótido complementario a la base molde, siguiendo las reglas de Watson y Crick. En presencia de Mn^{2+} , *LiPolθ* muestra un incremento en la eficiencia de polimerización pudiendo observarse la incorporación adicional, no dirigida por molde, de un nucleótido en extremos romos, de forma similar a como ocurre con otras polimerasas de la familia A, incluida *hPolθ* (Seki y cols., 2004).

El ensayo de la actividad de la proteína completa *LiPolθ* y tres formas truncadas de la misma mostró que, para la conservación de la actividad polimerasa, además del dominio polimerasa es requerido parte del dominio N-terminal. Este resultado también ha sido observado para *hPolθ* donde, aunque existen discrepancias sobre el tamaño mínimo necesario para su actividad, parece que se requiere la presencia al menos 300 aminoácidos de la región central para la funcionalidad del enzima (Hogg y cols., 2011; Prasad y cols., 2009).

LiPolθ discrimina muy eficientemente la naturaleza del azúcar del nucleótido, favoreciendo en gran medida la incorporación en el ADN de dNTPs sobre ddNTPs, contribuyendo a la estabilidad genómica (Tabor y Richardson, 1995). La discriminación entre dNTPs y ddNTPs, se ha descrito para varias polimerasas de la familia A que recae en un residuo situado en el motivo B (Tabor y Richardson, 1995). Dicho residuo puede consistir en una fenilalanina (asociado a discriminación de ddNTPs) o una tirosina (asociado a baja discriminación de ddNTPs). *LiPolθ* posee un residuo de tirosina en esa posición (Y974) por lo que cabría esperar una incorporación relativamente eficiente de ddNTPs. Sin embargo, *LiPolθ* al igual que ocurre en el caso de *CePolθ* (Asagoshi y cols., 2011), a pesar de poseer un residuo de tirosina es capaz de discriminar en gran medida a favor de los dNTPs.

LiPolθ es capaz de extender extremos de cebadores desapareados respecto a la cadena molde, empleando para ello múltiples estrategias. Por un lado, *LiPolθ* puede realizar la extensión de dichos desapareamientos de forma directa, catalizando la incorporación del nucleótido complementario a la base molde situada en 5'. No obstante, *LiPolθ* también puede, si el contexto de secuencia lo permite, llevar a cabo la dislocación de la

hebra molde o del cebador para generar un par correcto a partir del cual realizar la extensión. En función de la estrategia utilizada, la extensión de extremos desapareados por parte de *LiPol* θ puede ocasionar sustituciones de base (por extensión directa) o inserciones y deleciones (por reordenamiento de alguna de las dos hebras del ADN). Los resultados obtenidos sugieren que *LiPol* θ tiende a generar un par correcto siempre que sea posible favoreciendo por tanto la aparición de inserciones y deleciones.

LiPol θ , al igual que Polv (Takata y cols., 2006) posee actividad de desplazamiento de banda en ausencia de factores, la cual es independiente del grupo presente en posición 5' del *downstream* así como del metal utilizado como cofactor. Esta capacidad de insertar nucleótidos de forma acoplada a un desplazamiento de banda puede ser relevante en la reparación de uniones intercatenarias o en la reparación por escisión de base de trecho largo. En este sentido cabe destacar que la ausencia de Pol θ en *D. melanogaster* está asociada a hipersensibilidad a agentes causantes de uniones intercatenarias (Boyd y cols., 1990), mientras que en células DT40 de pollo está relacionada con una disminución de los niveles de reparación por escisión de base, especialmente en la vía de trecho largo (Yoshimura y cols., 2006). Por tanto, es factible que *LiPol* θ pueda participar en ambas vías.

Se ha descrito que *hPol* θ posee actividad dRP-liasa. La región que comprende dicha función se ha delimitado a un fragmento de 24 kDa que contiene los tres motivos conservados A, B y C de todas las polimerasas de la familia A y B, y se ha propuesto que el residuo encargado de llevar a cabo tal actividad sea la Lys2383 al tratarse de un residuo conservado en las polimerasas θ de vertebrados así como en otras polimerasas de la familia A (Prasad y cols., 2009). Dicho residuo se encuentra también presente en *LiPol* θ (Lys970), sin embargo, no se ha detectado tal actividad. Es posible que *LiPol* θ presente una actividad menor que su ortóloga humana y por ello no haya sido detectada. No obstante, como se comentó en el párrafo anterior, *LiPol* θ posee una gran actividad de desplazamiento de banda, por lo que no parece una buena candidata para participar en reparación por escisión de base de trecho corto, vía en la que es requerida la actividad dRP-liasa. En este sentido cabe resaltar que *LiPol* β , también de localización nuclear, presenta actividad dRP-liasa y se ha demostrado que es capaz de completar *in vitro* el proceso de reparación por escisión de base de trecho corto (Alonso y cols., 2006), por lo que probablemente sea la responsable de realizar también dicho proceso *in vivo*.

4. *LiPolθ* y los mecanismos de tolerancia al daño.

4.1 Daño oxidativo.

LiPolθ frente a la base dañada 8oxodG es capaz de llevar a cabo la inserción de un nucleótido, preferentemente dCTP, superando la lesión de forma no mutagénica. Este hecho es destacable puesto que la mayoría de las ADN polimerasas tienden a insertar dATP frente a la lesión (Pastor-Palacios y cols., 2010; Picher y Blanco, 2007; Zhang y cols., 2000). En *T. cruzi* se han descrito dos polimerasas (*TcPolη*, de localización nuclear, y *TcPolκ*, de localización mitocondrial) capaces de llevar a cabo la inserción de un nucleótido frente a la lesión, pero la fidelidad del proceso no ha sido evaluada (de Moura y cols., 2009; Rajão y cols., 2009).

En presencia de cofactor Mn^{2+} , *LiPolθ* puede realizar además el paso de extensión del nucleótido insertado de manera relativamente eficiente. Dicha extensión es llevada a cabo con similar eficiencia para el par correcto 8oxodG:dCMP (situación más probable si la inserción frente a 8oxodG ha sido llevada a cabo por *LiPolθ*) y el par incorrecto 8oxodG:dAMP. No obstante, la presencia de un par 8oxodG:dAMP estimula la incorporación de nucleótidos erróneos frente a bases moldes situadas en posición 5' con respecto a la lesión. El bajo grado de discriminación en la extensión de un par correcto 8oxodG:dCMP con respecto a un par incorrecto 8oxodG:dAMP, así como el incremento de mutagénesis causado por la presencia de este último, indican que la fidelidad del proceso de síntesis a través de la lesión 8oxodG por parte de *LiPolθ* recae principalmente en el paso de inserción.

Además de integrada en la hebra de ADN molde, la lesión 8oxodG puede encontrarse en forma de nucleótido libre (8oxodGTP). Por lo general, las polimerasas implicadas en la replicación cromosómica (Familia A y B) son resistentes a la incorporación de 8oxodGTP, mientras que las polimerasas implicadas en reparación y/o TLS (Familia X e Y) incorporan 8oxodGTP de un modo relativamente eficiente y preferentemente en frente de dAMP en lugar de dCMP (Katafuchi y Nohmi, 2010). *LiPolθ* incorpora 8oxodGTP preferentemente frente a dAMP con respecto a dCMP en un ratio aproximado de 34:1. Dicha incorporación de 8oxodGTP frente a dAMP es realizada además con un alto grado de eficiencia (20% de eficiencia de la inserción de dTTP normal). Estos valores se relacionan más con una polimerasas de TLS de la familia Y que con una polimerasa replicativa de la familia A.

El daño oxidativo puede afectar también a las pirimidinas, siendo en este caso la formación de timina glicol (Tg), la lesión más frecuente. *LiPolθ* puede incorporar un nucleótido frente a la lesión Tg, preferentemente dATP, pero no puede llevar a cabo su extensión de forma directa. Este hecho contrasta con los resultados obtenidos *in vitro* para la *hPolθ* y su paróloga *hPolv* siendo ambas capaces de realizar la inserción frente a Tg y su posterior extensión directa (Seki y cols., 2004; Takata y cols., 2006). Experimentos *in vivo* realizados con células humanas han sugerido un papel combinado de *hPolk* y *hPolζ* en la superación de esta lesión (Yoon y cols., 2010). Según esta hipótesis, *hPolk* sería la encargada de insertar dATP frente a la lesión Tg, mientras que *hPolζ* llevaría a cabo el paso de extensión. Es posible que en *Leishmania* *LiPolθ* sea la encargada de sustituir a *hPolk* en el paso inicial de inserción frente a la lesión Tg.

En los ensayos realizados *in vivo*, se observó una mayor resistencia al H₂O₂ por parte de los transfectantes estables de *Leishmania* que sobre-expresan *LiPolθ* con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados apoyan la hipótesis de una posible participación de *LiPolθ* en la resistencia frente al daño oxidativo.

4.2 Daño alquilante.

El EMS, el MMS y la ENU inducen daño en el ADN por un mecanismo directo, generando nucleótidos alquilados (Gocke y cols., 2009; Shibuya y Morimoto; Wyatt y Pittman). Dicha alquilación puede tener lugar en varias localizaciones en las bases de los nucleótidos, dependiendo de las propiedades físico químicas del agente. Aquellos compuestos que presentan una constante de Swain-Scott elevada como el MMS y el EMS actúan en gran medida en centros nucleofílicos, como los átomos de nitrógeno N7-guanina o N3-adenina. Por el contrario, compuestos con bajos valores para la constante de Swain-Scott como la ENU, no discriminan entre centros de alta o baja nucleofilidad y por ello son capaces de alquilar átomos de oxígeno mucho más eficientemente (Gocke y cols., 2009). Debido a ello, las principales lesiones responsables de la toxicidad de estos compuestos son N3-alquiladenina, en el caso del MMS y el EMS, y O6-etilguanina, en el caso de la ENU.

La línea de transfectantes estables de *Leishmania* que sobre-expresa la ADN polimerasa *LiPolθ*, no mostró diferencia alguna en los niveles de resistencia frente a ninguno de

estos tres compuestos alquilantes con respecto a los promastigotes silvestres. La similar respuesta observada frente a MMS concuerda con los estudios genotóxicos realizados previamente con células DT40 de pollo (Yoshimura y cols., 2006) y larvas de *D. melanogaster* (Boyd y cols., 1990) donde los *knock out* para Pol θ no mostraban diferencias en la sensibilidad frente a este compuesto. Del mismo modo, la ausencia de una respuesta diferencial frente a ENU concuerda con la baja fidelidad de LiPol θ observada en los ensayos *in vitro* frente a 6mdG, en los cuales LiPol θ muestra una preferencia por la inserción errónea de dTTP. Debido a que la superación de la lesión 6mdG por parte de LiPol θ conllevaría la aparición de mutaciones, no parece probable que esta sea una de sus funciones *in vivo*.

4.3 Rotura del enlace glicosídico (sitios abásicos).

Los sitios abásicos pueden generarse debido a la pérdida hidrolítica de bases, sobretodo de purinas y especialmente de guaninas o como intermediarios de la reparación por escisión de base mediante la acción de una ADN glicosilasa. Las polimerasas por lo general incorporan preferentemente dATP frente a un sitio abásico, fenómeno conocido como “regla de la A” (Strauss, 2002). LiPol θ al igual que hPol θ incorpora preferentemente dATP y dGTP frente al sitio abásico con independencia de cuál sea el nucleótido situado en posición 5' con respecto a la lesión y es capaz de llevar a cabo la extensión de forma directa. Sin embargo, LiPol θ muestra una eficiencia mucho menor en comparación con hPol θ , la cual se ha descrito que inserta dATP frente a un sitio abásico con una eficiencia del 22% con respecto a la incorporación frente a dTMP, y realiza el paso de extensión de forma similar al de un extremo correctamente apareado (Seki y cols., 2004). Se ha sugerido que los insertos 2 y 3 de hPol θ pueden ser relevantes para la superación de sitios abásicos (Hogg y cols., 2011). Estos insertos están presentes en LiPol θ , no obstante la longitud del inserto 3 es mucho menor que en el caso de hPol θ (figura 62B). Este podría ser el motivo del diferente comportamiento entre las dos polimerasas en la síntesis frente a un sitio abásico.

La actividad de LiPol θ , al igual que la de hPol θ , será libre de errores siempre y cuando el sitio abásico haya sido generado como consecuencia de un paso intermedio en la reparación por escisión de base de un dUTP incorporado. Si por el contrario el sitio abásico surgió a partir de hidrólisis espontánea, la inserción de dATP tendrá un carácter mutagénico.

4.4 Daño por radiación ultravioleta.

LiPolθ muestra una baja eficiencia en el paso de incorporación frente a las timinas de un CPD, de manera similar a lo que se observa en otras polimerasas de la familia A como *hPolθ* (Seki y cols., 2004), *hPolv* (Takata y cols., 2006) o la polimerasa I del fago T7 (Li y cols., 2004) y contrasta con la alta eficiencia de *Polη*, una ADN polimerasa especializada en la superación de este tipo de daño (Kusumoto y cols., 2002).

En algunas ADN polimerasas como la Pol I del fago T7 (Li y cols., 2004) o Dpo4 de arqueas (Johnson y cols., 2005) se ha propuesto que la inserción frente a la primera timina del CPD tenga lugar vía un intermediario de tipo abásico, con el fotoproducto fuera del sitio activo, de tal forma que la entrada de nucleótido no venga dirigida por la timina 3' sino de acuerdo a la regla de la A. De esta forma el nucleótido insertado preferentemente sería dATP y en menor medida dGTP. En cambio, la incorporación de nucleótido frente a 5'T tendría lugar con el fotoproducto dentro del sitio activo, dirigiendo por tanto la 5'T la entrada de nucleótido que sería exclusivamente dATP. Es posible que este mecanismo sea el que opere también en el caso de *LiPolθ*.

En los ensayos realizados *in vivo*, se observó una mayor sensibilidad a la radiación UV por parte de los transfectantes estables de *Leishmania* que sobre-expresan *LiPolθ* con respecto a la cepa silvestre. En base a la baja eficiencia mostrada en la superación de CPD *in vitro*, una posible explicación es que *LiPolθ*, al encontrarse sobre-expresada, compita por el ADN con *LiPolη*, lo que dificultaría la reparación de la lesión y explicaría la menor tasa de supervivencia observada.

4.5 Uniones intercatenarias

Aunque los ICL son a menudo considerados como un tipo de daño en el ADN, son estructuralmente diversos y es posible que sean múltiples las ADN polimerasas de TLS implicadas en su reparación. En este sentido, se ha propuesto que en el ser humano, *hPolv* podría participar en la reparación de ICL en el surco mayor del ADN mientras que *hPolk* podría ser necesaria para la reparación de ICL en el surco menor (Minko y cols., 2008; Yamanaka y cols., 2010). Sin embargo, en *Leishmania*, *Polv* no está presente y *Polk* probablemente se halle localizada en la mitocondria (Rajão y cols., 2009), por lo

que otra u otras polimerasas deben ser las encargadas de la reparación de ICL en el núcleo. Las polimerasas Pol η o Pol ζ también se han asociado a reparación de ICL (Sarkar y cols., 2006; Zheng y cols., 2003).

La participación de Pol θ en reparación de ICL no está clara. Mientras que en *D. melanogaster* y *C. elegans*, la ausencia de Pol θ confiere hipersensibilidad a diversos agentes de ICL como cisplatino, nitrógeno mostaza o DEB (Boyd y cols., 1990; Muzzini y cols., 2008), en vertebrados se han descrito resultados contradictorios (Li y cols., 2011; Yoshimura y cols., 2006). La posible participación *in vivo* de LiPol θ en el procesamiento de ICL fue evaluada mediante ensayos genotóxicos con los agentes mitomicina C y cisplatino. El cisplatino induce la formación de ICL en el surco mayor de ADN al reaccionar preferentemente con los átomos N7 de dos residuos de guanina de una secuencia GC (Ho y cols., 2011). Mitomicina C en cambio, genera ICL en el surco menor del ADN al reaccionar con los grupos 2 amino de dos bases de guanina en una secuencia GC (Minko y cols., 2008).

La mayor resistencia a mitomicina C y cisplatino por parte de los transfectantes estables de *Leishmania* que sobre-expresan LiPol θ con respecto a la cepa silvestre, apoya la hipótesis de que LiPol θ , al igual que otras polimerasas θ de invertebrados, pueda participar en la reparación de ICL.

El menor valor EC₅₀ para la mitomicina C en comparación con el cisplatino puede ser debido a su mayor capacidad de generar ICL. No obstante, se ha descrito que en *Leishmania*, la mitomicina C puede poseer un papel adicional como inhibidor competitivo de la enzima tripanotión reductasa (Shukla y cols., 2011). Debido a ello es posible que la toxicidad de la mitomicina C no esté mediada solo por la generación de ICL, sino también por un incremento del estrés oxidativo en el parásito, ante el cual LiPol θ , como se ha descrito anteriormente, puede tener también un papel protector.

5. Actividad de LiPol θ durante la infección de Leishmania.

Los datos obtenidos a partir de los experimentos *in vitro* de superación de la lesión 8oxodG así como de los experimentos *in vivo* de resistencia a peróxido de hidrógeno, sugerían que LiPol θ podía actuar frente al daño oxidativo. Este hecho es especialmente relevante en *Leishmania* al tratarse de un parásito que desarrolla parte de su ciclo

biológico en el interior de los macrófagos del hospedador vertebrado, los cuales emplean como primer mecanismo de defensa el daño oxidativo (Gantt y cols., 2001b).

En respuesta a la perturbación de la membrana plasmática, los fagocitos mononucleares producen diferentes especies reactivas de oxígeno (Murray, 1981). La activación del macrófago conlleva un incremento en la actividad de la enzima NADPH oxidasa que transfiere un electrón desde el NADPH al oxígeno molecular, produciendo el radical superóxido (O_2^-) (Gantt y cols., 2001a). A partir del O_2^- tiene lugar la formación espontánea o enzimática de otras especies como hidrógeno peróxido (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^-) hipoclorito (OCl^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (Van Assche y cols., 2011). Diferentes estudios han sugerido que el principal producto del estallido respiratorio que media la actividad leishmanicida del macrófago es el H_2O_2 (Murray, 1981; Van Assche y cols., 2011).

Para evaluar si *LiPolθ* podía participar en la resistencia frente al estrés oxidativo que sufre el parásito durante la entrada en las células fagocíticas, se llevó a cabo la infección *in vitro* de macrófagos RAW con promastigotes silvestres y transfectados que sobre-expresan la proteína *LiPolθ*. Los resultados obtenidos mostraron una tasa de infección tres veces mayor para las leishmanias que sobre-expresan *LiPolθ*. Estos datos apoyan la hipótesis de un papel protector de *LiPolθ* frente al daño oxidativo en general y frente al colapso respiratorio de las células fagocíticas en particular.

LiPolθ, como se ha comentado anteriormente, muestra un nivel de expresión menor en el estadio amastigote con respecto al promastigote. Este dato puede parecer contradictorio con un posible papel protector de la enzima frente al daño oxidativo generado por el macrófago. Sin embargo, hay que tener en cuenta varios aspectos. En primer lugar, una menor expresión de la proteína no conlleva necesariamente una menor actividad. Un ejemplo de ello es la polimerasa *LiPolβ*, la cual presenta unos niveles de expresión inferiores en el estadio amastigote con respecto al promastigote y sin embargo, su actividad es mayor en el estadio intracelular (Alonso y cols., 2006). Además, cabe recordar la mayor actividad mostrada por *LiPolθ* a 37 °C con respecto a 27 °C (ver figura 27). En segundo lugar, la respuesta oxidativa por parte del macrófago va a tener lugar en los primeros 30-60 min de infección (Gantt y cols., 2001) y, aunque ambos estadios del parásito inducen la producción por parte del macrófago de O_2^- , el colapso oxidativo es sustancialmente diferente, siendo la respuesta mucho mayor para los promastigotes en comparación con los amastigotes (Channon y cols., 1984; Van Assche y cols., 2011). Esta menor respuesta oxidativa frente a la entrada de amastigotes

se ha asociado en *L. pifanoi* a la sobre-expresión de la proteína hemo oxigenasa 1 que degrada los grupos hemo, los cuales son necesarios para la maduración de la proteína gp91phox, integrante del complejo NADPH oxidasa (Pham y cols., 2005). No obstante, es posible que la causa de este menor colapso respiratorio frente a amastigotes difiera dependiendo de la especie de *Leishmania* (Channon y cols., 1984; Pham y cols., 2005). Por todo ello, *LiPolθ* puede mediar en la resistencia del promastigote durante el proceso de infección al daño oxidativo generado por el macrófago. Posteriormente, tras la diferenciación al estadio amastigote, los niveles de *LiPolθ* disminuirían, pero esto no repercutiría en la supervivencia de los amastigotes tras un nuevo proceso de infección ya que estos se verán expuestos a una respuesta oxidativa menor.

6

Conclusiones

- 1- Se ha llevado a cabo la caracterización del producto del gen LinJ.24.0910 de *L. infantum*, el cual corresponde a la proteína *LiPolθ*, una ADN polimerasa perteneciente a la familia A.
- 2- *LiPolθ* es una enzima altamente conservada en tripanosomátidos. A diferencia de sus homólogas de eucariotas superiores, *LiPolθ* carece de un dominio helicasa en el extremo N-terminal presentando en su lugar una región rica en aminoácidos prolina, serina y treonina susceptible de sufrir modificaciones post-traduccionales que regulen su actividad.
- 3- La proteína *LiPolθ* posee una localización principalmente nuclear y es expresada a lo largo de todo el ciclo del parásito, siendo sus niveles más elevados en el estadio promastigote que en el amastigote.
- 4- *LiPolθ* posee una actividad ADN polimerasa intrínseca. Para el desarrollo de dicha actividad, además del dominio polimerasa es requerido parte del extremo N-terminal.
- 5- *LiPolθ* es activa en presencia de los cofactores Mg^{2+} y Mn^{2+} , llevando a cabo la síntesis de ADN siguiendo las reglas de apareamiento de Watson y Crick. En condiciones óptimas *LiPolθ* puede realizar la adición no dirigida por molde de un nucleótido en extremos romos de forma similar a otras polimerasas de la familia A.
- 6- *LiPolθ* es capaz de realizar la extensión de extremos desapareados ya sea de manera directa o mediante la dislocación de alguna de las dos hebras del ADN.
- 7- Los experimentos *in vivo* e *in vitro* sugieren que *LiPolθ* no participa en la resistencia a daño alquilante ni UV.
- 8- *LiPolθ*, a diferencia de *hPolθ*, muestra una baja eficiencia en la superación *in vitro* de sitios abásicos y timina glicol por lo que no parece probable que la síntesis a través de estas lesiones sea una de las funciones desempeñadas *in vivo*.
- 9- Los promastigotes que sobre-expresan *LiPolθ* muestran una mayor resistencia frente a los compuestos cisplatino y mitomicina C, lo que sugiere que, al igual que en otros organismos, *LiPolθ* participa en la reparación de uniones intercatenarias.

Esta hipótesis es apoyada por la gran capacidad de desplazamiento de banda de *LiPolθ* observada en experimentos *in vitro*.

- 10- *LiPolθ* es capaz de utilizar como molde la base 8oxodG, una de las lesiones más frecuentes en la célula mostrando una inserción eficiente y libre de error. Asimismo, la sobre-expresión de *LiPolθ* en promastigotes conlleva un incremento significativo de la resistencia frente al H₂O₂ y de la tasa de infección de macrófagos. Esto último probablemente como consecuencia de una mayor resistencia al colapso respiratorio generado por la célula hospedadora. Por todo ello es muy probable que *LiPolθ* participe en la resistencia a daño oxidativo favoreciendo la capacidad de infección del parásito.

7

Bibliografía

Ajdary S, Alimohammadian M, Eslami M, Kemp K, Kharazmi A (2000) Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and immunity* **68**: 1760-1764

Alcolea P, Alonso A, Sánchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gómez M, Ramos I, Parro V, Larraga V (2009) Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics* **93**: 551-564

Alexander B, Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* **17**: 1-18

Alexander J, Satoskar A, Russell D (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* **112**: 2993-3002

Alonso A, Terrados G, Picher A, Giraldo R, Blanco L, Larraga V (2006) An intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in DNA polymerase beta from *Leishmania infantum* supports a role in DNA repair. *DNA Repair* **5**: 89-101

Alvar J, Croft S, Olliaro P (2006) Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Advances in Parasitology* **61**: 223-274

Aller P, Rould M, Hogg M, Wallace S, Doublé S (2007) A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol. *PNAS* **104**: 814-818

Andrade P, Martín M, Juárez R, López de Saro F, Blanco L (2009) Limited terminal transferase in human DNA polymerase μ defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. *PNAS* **106**: 16203-16208

Antoine J, Prina E, Courret N, Lang T (2004) *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Advances in Parasitology* **58**: 1-68

Antunes C, Mayrink W, Magalhaes P, Costa C, Melo M, Dias M, Michalick M, Williams P, Lima A, Vieira J (1986) Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *International journal of epidemiology* **15**: 572-580

Arana M, Seki M, Wood R, Rogozin I, Kunkel T (2008) Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. *Nucleic Acids Research* **36**: 3847-3856

Armijos R, Weigel M, Romero L, Garcia V, Salazar J (2003) Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last? *The Journal of Infections Diseases* **187**: 1959-1961

Arnesen S, Eriksen S, Olsen J, Jensen B (1998) Increased production of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of Tween 80. *Enzyme and Microbial Technology* **23**: 249-252

Asagoshi K, Lehmann W, Braithwaite E, Santana-Santos L, Prasad R, Freedman J, Van Houten B, Wilson S (2011) Single-nucleotide base excision repair DNA polymerase activity in *C. elegans* in the absence of DNA polymerase β . *Nucleic Acids Research* **40**: 670-681

Augusto-Pinto L, Bartholomeu D, Teixeira S, Pena S, Machado C (2001) Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene* **272**: 323-333.

Avkin S, Adar S, Blander G, Livneh Z (2002) Quantitative measurement of translesion replication in human cells: evidence for bypass of abasic sites by a replicative DNA polymerase. *PNAS* **99**: 3764-3769

Awasthi A, Mathur R, Saha B (2004) Immune response to Leishmania infection. *The indian journal of medical research* **119**: 238-258

Basselin M, Denise H, Coombs G, Barrett M (2002) Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 3731-3738

Basu A, Loechler E, Leadon S, Essigmann J (1989) Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *PNAS* **86**: 7677-7681

Batra V, Beard W, Hou E, Pedersen L, Prasad R, Wilson S (2010) Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site. *Nature Structural and Molecular Biology* **17**: 889-890

Beard W, Batra V, Wilson S (2010) DNA polymerase structure-based insight on the mutagenic properties of 8-oxoguanine. *Mutation Research* **703**: 18-23

Beckman R, Mildvan A, Loeb L (1985) On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry* **24**: 5810-5817

Belkaid Y, Butcher B, Sacks D (1998) Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European journal of immunology* **28**: 1389-1400

Bell J, Harvey T, Sims A, McCulloch R (2004) Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology* **51**: 159-173

Bell J, McCulloch R (2003) Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 45182-45188

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu D, Lennard N, Caler E, Hamlin N, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett M, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark U, Arrowsmith C, Atkin R, Barron A, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Davies R, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field M, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris B, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou A, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney P, Moule S, Martin D, Morgan G, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock C, Peterson J, Quail M, Rabbinowitsch E, Rajandream M, Reitter C, Salzberg S, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson A, Tallon L, Turner C, Tait A, Tivey A, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams M, Embley T, Gull K, Ullu E, Barry J, Fairlamb A, Opperdoes F, Barrell B, Donelson J, Hall N, Fraser C, Melville S, El-Sayed N (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**: 416-422.

Bertocci B, De Smet A, Weill J, Reynaud C (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases μ , λ , and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity* **25**: 31-41

Besteiro S, Williams R, Coombs G, Mottram J (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology* **37**: 1063-1075

Bhattacharyya M, Norris D, Kumar N (2004) Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. *Infection genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **4**: 91-98

Bottrel R, Dutra W, Martins F, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida R, Mayrink W, Locksley R, Gollob K (2001) Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity* **69**: 3232-3239

Boulé J, Rougeon F, Papanicolaou C (2001) Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 31388-31393

Boyd J, Sakaguchi K, Harris P (1990) *mus308* mutants of *Drosophila* exhibit hypersensitivity to DNA cross-linking agents and are defective in a deoxyribonuclease. *Genetics* **125**: 813-819

Brennand J, Margison G (1986) Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the *Escherichia coli* alkyltransferase gene. *PNAS* **83**: 6292-6296

Breton M, Tremblay M, Ouellette M, Papadopoulou B (2005) Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* **73**: 6372-6382

Briebe L, Eichman B, Kokoska R, Doublie S, Kunkel T, Ellenberger T (2004) Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase. *The EMBO Journal* **23**: 3452-3461

Brittingham A, Morrison C, McMaster W, McGwire B, Chang K, Mosser D (1995) Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of immunology* **155**: 3102-3111

Brittingham A, Mosser D (1996) Exploitation of the complement system by Leishmania promastigotes. *Parasitology Today* **12**: 444-447

Bruhn D, Mozeleski B, Falkin L, Klingbeil M (2010) Mitochondrial DNA polymerase POLIB is essential for minicircle DNA replication in African trypanosomes. *Molecular Microbiology* **75**: 1414-1425

Cano M, Dungan J, Agabian N, Blackburn E (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *PNAS* **96**: 3616-3621.

Carrera L, Gazzinelli R, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks D (1996) Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *The journal of experimental medicine* **183**: 515-526

Clark J (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic acids research* **16**: 9677-9686.

Clark J, Joyce C, Beardsley G (1987) Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of Escherichia coli. *Journal of molecular biology* **198**: 123-127

Clayton C (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The Embo Journal* **15**: 1881-1888

Clayton C, Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and biochemical parasitology* **156**: 93-101

Cloutier S, Laverdière M, Chou M, Boilard N, Chow C, Papadopoulou B (2012) Translational Control through eIF2alpha Phosphorylation during the Leishmania Differentiation Process. *PLOS ONE* **7**: 1-11

Coler R, Reed S (2005) Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends in parasitology* **21**: 244-249

Conway C, McCulloch R, Ginger M, Robinson N, Browitt A, Barry J (2002) Ku is important for telomere maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes, in African trypanosomes. *The Journal of biological chemistry* **277**: 21269-21277

Córdoba-Cañero D, Morales-Ruiz T, Roldán-Arjona T, Ariza R (2009) Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. *the Plant journal: for cell and molecular biology* **60**: 716-728

Croft S, Sundar S, Fairlamb A (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews* **19**: 111-126

Croft S, Yardley V (2002) Chemotherapy of leishmaniasis. *Current pharmaceutical design* **8**: 319-342

Cruz I, Morales M, Nogueira I, Rodríguez A, Alvar J (2002) Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* **359**: 1124-1125

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J (2006) Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian Journal Medical Research* **123**: 357-388

Cunningham A (2002) Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental and Molecular Pathology* **72**: 132-141

Chan S, Yu A, McVey M (2010) Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila*. *PLOS Genetics* **6**: 1-12

Channon J, Roberts M, Blackwell J (1984) A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology* **53**: 345-355

Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F (2010) The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**: 1-8

Chen L, Zhang Z, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo F (2005) The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania* major infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitology international* **54**: 109-118

de Moura M, Schamber-Reis B, Passos Silva D, Rajão M, Macedo A, Franco G, Pena S, Teixeira S, Machado C (2009) Cloning and characterization of DNA polymerase eta from *Trypanosoma cruzi*:

roles for translesion bypass of oxidative damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **50**: 375-386

de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Aït-Yahia S, Banchereau J, Liu Y, Lebecque S, Caux C (1998) The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *Journal of immunology* **15**: 1666-1676

Debrabant A, Joshi M, Pimenta P, Dwyer D (2004) Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *International Journal for Parasitology* **34**: 205-217

DeFazio L, Stansel R, Griffith J, Chu G (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The Embo journal* **21**: 3192-3200

Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering* **3**: 461-467

Descoteaux A, Turco S (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1455**: 341-352

Desjeux P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**: 239-243

Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **27**: 305-318

Dey A, Singh S (2006) Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**: 165-170

Doak S, Jenkins G, Johnson G, Quick E, Parry E, Parry J (2007) Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Research* **67**: 3904-3911

Domínguez M, Moreno I, López-Trascasa M, Toraño A (2002) Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *The Journal of Experimental Medicine* **195**: 451-459

Dosanjh M, Galeros G, Goodman M, Singer B (1991) Kinetics of extension of O6-methylguanine paired with cytosine or thymine in defined oligonucleotide sequences. *Biochemistry* **30**: 11595-11599

Doublíé S, Sawaya M, Ellenberger T (1999) An open and closed case for all polymerases. *Structure* **7**: R31-R35

Encinas J, Fernández F, Lasheras M, Barbas F (2006) Leishmaniosis canina y humana: una visión de conjunto. *Profesión Veterinaria* **16**: 28-33

Figueiró-Filho E, Duarte G, El-Beitune P, Quintana S, Maia T (2004) Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **12**: 31-40

Fischhaber P, Gerlach V, Feaver W, Hatahet Z, Wallace S, Friedberg E (2002) Human DNA polymerase kappa bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 37604-37611

Fronza G, Gold B (2004) The biological effects of N3-methyladenine. *Journal of Cellular Biochemistry* **91**: 250-257

Gantt K, Goldman T, McCormick M, Miller M, Jeronimo S, Nascimento E, Britigan B, Wilson M (2001a) Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Immunology* **167**

Gantt K, Goldman T, McCormick M, Miller M, Jeronimo S, Nascimento E, Britigan B, Wilson M (2001b) Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Journal of immunology* **167**: 893-901

García-Díaz M, Bebenek K, Sabariego R, Domínguez O, Rodríguez J, Kirchhoff T, García-Palomero E, Picher A, Juárez R, Ruiz J, Kunkel T, Blanco L (2002) DNA polymerase lambda, a novel DNA repair enzyme in human cells. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 13184-13191

Giraldo R, Andreu J, Díaz-Orejas R (1998) Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *The EMBO Journal* **17**: 4511-4526

Glover L, McCulloch R, Horn D (2008) Sequence homology and microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. *Nucleic acids research* **36**: 2608-2618

Gocke E, Bürgin H, Müller L, Pfister T (2009) Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicology Letters* **190**: 254-265

Gonzalez-Púmariega M, Vernhes M, Sánchez-Lamar A (2009) La radiación ultravioleta su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria* **18**: 69-80

Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson T, Mann M, Lieber M (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492-495

Green S, Meltzer M, Jr. HJ, Nacy C (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* **144**: 278-283

Hanawalt P (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* **21**: 8949-8956

Handman E (1999) Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* **44**: 1-39

Handman E (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews* **14**: 229-243

Harris P, Mazina O, Leonhardt E, Case R, Boyd J, Burtis K (1996) Molecular cloning of *Drosophila* mus308, a gene involved in DNA cross-link repair with homology to prokaryotic DNA polymerase I genes. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 5764-5771

Ho T, Guainazzi A, Derkunt S, Enoiu M, Schärer O (2011) Structure-dependent bypass of DNA interstrand crosslinks by translesion synthesis polymerases. *Nucleic Acids Research* **39**: 7455-7464

Ho T, Schärer O (2010) Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **51**: 552-566

Hogg M, Seki M, Wood R, Doublé S, Wallace S (2011) Lesion bypass activity of DNA polymerase Θ (POLQ) is an intrinsic property of the pol domain and depends on unique sequence inserts. *Journal of Molecular Biology* **405**: 642-652

Hubscher U, Spadari S, Villani G, Maga G (2010) *DNA Polymerases : Discovery, Characterization and Functions in Cellular DNA Transactions*.

Inan M, Meagher M (2001) Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 585-589

Ivens A, Peacock C, Worthey E, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley S, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi C, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson R, Cronin A, Cruz A, Davies R, De Gaudenzi J, Dobson D, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch A, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram J, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl T, Price C, Purnelle B, Quail M, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz J, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz D, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C,

Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith D, Blackwell J, Stuart K, Barrell B, Myler P (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436-442.

Janzen C, Lander F, Dreesen O, Cross G (2004) Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research* **32**: 6575-6584

Jha T, Sundar S, Thakur C, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J (1999) Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine* **341**: 1795-1800

Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett M, Madhubala R (2009) Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology* **164**: 111-117

Johnson P, Kooter J, Borst P (1987) Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* **51**: 273-281

Johnson R, Prakash L, Prakash S (2005) Distinct mechanisms of cis-syn thymine dimer bypass by Dpo4 and DNA polymerase ϵ . *PNAS* **102**: 12359-12364

Joyce C, Sun X, Grindley N (1992) Reactions at the polymerase active site that contribute to the fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *The Journal of biological chemistry* **267**: 24485-24500

Kamhawi S (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* **22**: 439-445

Kane M, Mosser D (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *Journal of immunology* **166**: 1141-1147

Kapotas N, Bellofatto V (1993) Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research* **21**: 4067-4072

Katafuchi A, Nohmi T (2010) DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: Their efficiency and template base preference. *Mutation Research* **703**: 24-31

Kawamura K, Bahar R, Seimiya M, Chiyo M, Wada A, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Kimura H, Watanabe S, Honda I, Sakiyama S, Tagawa M, O-Wang J (2004) DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. *International Journal of Cancer* **109**: 9-16

Kelly J (1995) Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. *Parasitology Today* **11**: 447-451

Kelly J, Ward H, Miles M, Kendall G (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Research* **20**: 3963-3969

Khalil E, El Hassan A, Zijlstra E, Mukhtar M, Ghalib H, Musa B, Ibrahim M, Kamil A, Elsheikh M, Babiker A, Modabber F (2000) Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* **356**: 1565-1569.

Khalil E, Musa A, Younis B, Elfaki M, Zijlstra E, Elhassan A (2011) Blindness following visceral leishmaniasis: a neglected post-kala-azar complication. *Tropical Doctor* **41**: 139-140

Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F (2006) Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *The indian journal of medical research* **123**: 423-438

Klingbeil M, Motyka S, Englund P (2002) Multiple mitochondrial DNA polymerases in *trypanosoma brucei*. *Molecular Cell* **10**: 175-186

Krauth-Siegel R, Meiering S, Schmidt H (2003) The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*. *Biological Chemistry* **384**: 539-549

Kumar D, Minocha N, Rajanala K, Saha S (2009) The distribution pattern of proliferating cell nuclear antigen in the nuclei of *Leishmania donovani*. *Microbiology* **155**: 3748-3757

Kusumoto R, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F (2002) Translesion synthesis by human DNA polymerase η across thymine glycol lesions. *Biochemistry* **41**: 6090-6099

Kuwabara T, Noda T, Ohtake H, Ohtake T, Toyama S, Ikariyama Y (2003) Classification of DNA-binding mode of antitumor and antiviral agents by the electrochemiluminescence of ruthenium complex. *Analytical Biochemistry* **314**: 30-37

Lawrence C, Borden A, Banerjee S, LeClerc J (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Research* **18**: 2153-2157

LeBowitz J, Smith H, Rusche L, Beverley S (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes and development* **7**: 996-1007

Lee J, Jung H, Günzl A (2009) Transcriptionally active TFIID of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. *Nucleic acids research* **37**: 3811-3820

Lehman I, Zimmerman S, Adler J, Bessman M, Simms E, Kornberg A (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. V. Chemical composition of enzymatically synthesized deoxyribonucleic acid. *PNAS* **44**: 1191-1196

Lemée F, Bergoglio V, Fernandez-Vidal A, Machado-Silva A, Pillaire M, Bieth A, Gentil C, Baker L, Martin A, Leduc C, Lam E, Magdeleine E, Filleron T, Oumouhou N, Kaina B, Seki M, Grimal F, Lacroix-Triki M, Thompson A, Roché H, Bourdon J, Wood R, Hoffmann J, Cazaux C (2010) DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *PNAS* **107**: 13390-13395

Li Y, Dutta S, Doublé S, Bdour H, Taylor J, Ellenberger T (2004) Nucleotide insertion opposite a cis-syn thymine dimer by a replicative DNA polymerase from bacteriophage T7. *Nature Structural and Molecular Biology* **11**: 784-790

Li Y, Gao X, Wang J (2011) Comparison of two PolQ mutants reveals that a polymerase-inactive PolQ retains significant function in tolerance to etoposide and γ -irradiation in mouse B cells. *Genes to Cells* **16**: 973-983

Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis A, Yang D, Hew C (2001) Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* **21**: 438-445

Liang X, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic cell* **2**: 830-840

Liew F, Millott S, Parkinson C, Palmer R, Moncada S (1990) Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* **144**: 4794-4797

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715

Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D (1999) Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *The Journal of Infectious Diseases* **180**: 564-567

Liu D (2012) Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens.

Lodge R, Descoteaux A (2006) Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *European journal of immunology* **36**: 2735-2744

Loh E, Loeb L (2005) Mutability of DNA polymerase I: implications for the creation of mutant DNA polymerases. *DNA Repair* **4**: 1390-1398

Lopes DO, Schamber-Reis B, Regis-da-Silva C, Rajão M, Darocha W, Macedo A, Franco G, Nardelli S, Schenkman S, Hoffmann J, Cazaux C, Pena S, Teixeira S, Machado C (2008) Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. *DNA Repair* **7**: 1882-1892

Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes F (2000) Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology* **111**: 1-14

Ma Y, Lu H, Schwarz K, Lieber M (2005) Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell cycle* **4**: 1193-2000

Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman M, Shimazaki N, Koiwai O, Hsieh C, Schwarz K, Lieber M (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell* **16**: 701-713

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber M (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **198**: 781-794.

Machado-Silva A, Teixeira S, Franco G, Macedo A, Pena S, McCulloch R, Machado C (2008) Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. *Gene* **411**: 19-26

Machado C, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira S (2006) DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutation research* **612**: 40-57

Malkova A, Ivanov E, Haber J (1996) Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *PNAS* **93**: 7131-7136.

Martomo S, Saribasak H, Yokoi M, Hanaoka F, Gearhart P (2008) Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *DNA Repair* **7**: 1603-1608

Masuda K, Ouchida R, Takeuchi A, Saito T, Koseki H, Kawamura K, Tagawa M, Tokuhisa T, Azuma T, O-Wang J (2005) DNA polymerase theta contributes to the generation of C/G mutations during somatic hypermutation of Ig genes. *PNAS* **27**: 13986-13991

McConville M, Turco S, Ferguson M, Sacks D (1992) Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO Journal* **11**: 3593-3600

McKean P, Keen J, Smith D, Benson F (2001) Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. *Molecular and biochemical parasitology* **115**: 209-216.

Melby P, Chandrasekar B, Zhao W, Coe J (2001) The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *Journal of immunology* **166**: 1912-1920

Minko I, Harbut M, Kozekov I, Kozekova A, Jakobs P, Olson S, Moses R, Harris T, Rizzo C, Lloyd R (2008) Role for DNA polymerase kappa in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 17075-17081

Molina R, Jiménez M, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology* **190**: 268-271

Moreno I, Molina R, Toraño A, Laurin E, García E, Domínguez M (2007) Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of *Leishmania infantum* promastigotes derived from axenic culture or from *Phlebotomus perniciosus*. *Microbes and Infection* **9**: 1574-1580

Moser M, Murphy K (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nature immunology* **1**: 199-205

Mottram J, Murphy W, Agabian N (1989) A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* hsp83 gene cluster. *Molecular and biochemical parasitology* **37**: 115-127

Murray H (1981) Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* **153**: 1302-1315

Murray H (2000) Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *International journal of infectious diseases* **4**: 158-177

Muzzini D, Plevani P, Boulton S, Cassata G, Marini F (2008) *Caenorhabditis elegans* POLQ-1 and HEL-308 function in two distinct DNA interstrand cross-link repair pathways. *DNA Repair* **7**: 941-950

Myler P, Fasel N (2008) *Leishmania: After the Genome*.

Nassif N, Penney J, Pal S, Engels W, Gloor G (1994) Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Molecular and cellular biology* **14**: 1613-1625

Neal J, Meek K (2011) Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutation research* **711**: 73-86

Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith P, Moulton L, Nasser K, Sharifi I, Khalil E, Bernal I, Antunes C, Kieny M, Tanner M (2008) First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* **26**: 6759-6767

OMS (2010) Control de las leishmaniasis.

Palatnik-de-Sousa C (2008) Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* **26**: 1709-1724

Pang M, McConnell M, Fisher P (2005) The *Drosophila* mus 308 gene product, implicated in tolerance of DNA interstrand crosslinks, is a nuclear protein found in both ovaries and embryos. *DNA Repair* **4**: 971-982

Pastor-Palacios G, Azuara-Liceaga E, Brieba L (2010) A nuclear family A DNA polymerase from *Entamoeba histolytica* bypasses thymine glycol. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **4**: 1-11

Patel P, Suzuki M, Adman E, Shinkai A, Loeb L (2001) Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *Journal of Molecular Biology* **308**: 823-837

Peacock C, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz J, Quail M, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream M, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf S, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge D, Oyola S, Hilley J, Brito L, Tosi L, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, M. B (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics* **39**: 839-847

Pelletier H, Sawaya M, Wolfle W, Wilson S, Kraut J (1996) A structural basis for metal ion mutagenicity and nucleotide selectivity in human DNA polymerase beta. *Biochemistry* **35**: 12762-12777.

Pham N, Mouriz J, Kima P (2005)

Leishmania pifanoi amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infection and Immunity* **73**: 8322-8333

Picher A, Blanco L (2007) Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA Repair* **6**: 1749-1756

Plosky B, Frank E, Berry D, Vennall G, McDonald J, Woodgate R (2008) Eukaryotic Y-family polymerases bypass a 3-methyl-2'-deoxyadenosine analog in vitro and methyl methanesulfonate-induced DNA damage in vivo. *Nucleic Acids Research* **36**: 2152-2162

Prasad R, Longley M, Sharief F, Hou E, Copeland W, Wilson S (2009) Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair in vitro. *Nucleic Acids Research* **37**: 1868-1877

Puentes S, Da Silva R, Sacks D, Hammer C, Joiner K (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology* **145**: 4311-4316

Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena J (2003) High-efficiency plating method for *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **130**: 139-141

Rajão M, Passos-Silva D, DaRocha W, Franco G, Macedo A, Pena S, Teixeira S, Machado C (2009) DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. *Molecular Microbiology* **71**: 185-197

Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen B (1996) Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The journal of membrane biology* **152**: 65-75

Ramos I, Alonso A, Marcen J, Peris A, Castillo J, Colmenares M, Larraga V (2008) Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* **17**: 333-344

Ramos I, Alonso A, Peris A, Marcen J, Abengozar M, Alcolea P, Castillo J, Larraga V (2009) Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* **27**: 6695-6703

Randall S, Eritja R, Kaplan B, Petruska J, Goodman M (1987) Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesions in DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 6864-6870

Reardon J, Mu D, Sancar A (1996) Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease. *The Journal of biological chemistry* **27**: 19451-19456.

Regis-da-Silva C, Freitas J, Passos-Silva D, Furtado C, Augusto-Pinto L, Pereira M, DaRocha W, Franco G, Macedo A, Hoffmann J, Cazaux C, Pena S, Teixeira S, Machado C (2006) Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular and biochemical parasitology* **149**: 191-200

Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J (1990) Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **65**: 111-125

Rogers M, Bates P (2007) Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS pathogens* **3**: 0818-0825

Rosenzweig D, Smith D, Myler P, Olafson R, Zilberstein D (2008) Post-translational modification of cellular proteins during Leishmania donovani differentiation. *Proteomics* **8**: 1843-1850

Rougeron V, De Meeûs T, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls A (2010) "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in Leishmania after two decades of laboratory and field analyses. *PLOS Pathogens* **6**: 1-5

Ruiz J, Juárez R, García-Díaz M, Terrados G, Picher A, González-Barrera S, Fernández de Henestrosa A, Blanco L (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Research* **31**: 4441-4449

Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco S, Zilberstein D (1998) Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of Leishmania donovani. *Molecular and biochemical parasitology* **95**: 9-20

Sacks D, Hieny S, Sher A (1985) Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *The Journal of Immunology* **135**: 564-569

Sacks D, Perkins P (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* **223**: 1417-1419

Salas M (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annual review of biochemistry* **60**: 39-71

Sarkar S, Davies A, Ulrich H, McHugh P (2006) DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. *The EMBO Journal* **25**: 1285-1294

Satthaporn S, Eremin O (2001) Dendritic cells (I): Biological functions. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh* **46**: 9-19

Saxowsky T, Choudhary G, Klingbeil M, Englund P (2003) Trypanosoma brucei has two distinct mitochondrial DNA polymerase β enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 49095-49101

Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers J, Egly J (1994) The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *The Embo journal* **13**: 2388-2392

Schamber-Reis B, Nardelli S, Régis-Silva C, Campos P, Cerqueira P, Lima S, Franco G, Macedo A, Pena S, Cazaux C, Hoffmann J, Motta M, Schenkman S, Teixeira S, Machado C (2012) DNA polymerase beta from Trypanosoma cruzi is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. *Molecular and Biochemical Parasitology* **183**: 122-131

Scharton-Kersten T, Afonso L, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of immunology* **15**: 5320-5330

Schofield M, Hsieh P (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology* **57**: 579-608.

Secundino N, Eger-Mangrich I, Braga E, Santoro M, Pimenta P (2005) Lutzomyia longipalpis peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of Medical Entomology* **42**: 928-938

Seki M, Marini F, Wood R (2003) POLQ (Pol θ), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Research* **31**: 6117-6126

Seki M, Masutani C, Yang L, Schuffert A, Iwai S, Bahar I, Wood R (2004) High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q. *The EMBO Journal* **23**: 4484-4494

Seki M, Wood R (2008) DNA polymerase θ (POLQ) can extend from mismatches and from bases opposite a (6-4) photoproduct. *DNA Repair* **7**: 119-127

Sekiguchi M, Tsuzuki T (2002) Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* **21**: 8895-8904

Shibutani S, Takeshita M, Grollman A (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434

Shibuya T, Morimoto K (1993) A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutation Research* **297**: 3-38

Shrivastav N, Li D, Essigmann J (2010) Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **31**: 59-70

Shukla A, Patra S, Dubey V (2011) Evaluation of selected antitumor agents as subversive substrate and potential inhibitor of trypanothione reductase: an alternative approach for chemotherapy of Leishmaniasis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **352**: 261-270

Siegel T, Tan K, Cross G (2005) Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical biology* **25**: 9586-9594.

Sindermann H, Croft S, Engel K, Bommer W, Eibl H, Unger C, Engel J (2004) Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology* **193**: 173-180

Singh J, Su L, Snow E (1996) Replication across O6-methylguanine by human DNA polymerase beta in vitro. Insights into the futile cytotoxic repair and mutagenesis of O6-methylguanine. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 28391-28398

Singh N, Kumar M, Singh R (2012) Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **5**: 485-497

Spratt T, Levy D (1997) Structure of the hydrogen bonding complex of O6-methylguanine with cytosine and thymine during DNA replication. *Nucleic acids research* **25**: 3354-3361.

Stanley A, Engwerda C (2007) Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology ad cell biology* **85**: 138-147

Steitz T (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**: 231-232

Steitz T (1999) DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 17395-17398

Strauss B (2002) The "A" rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity. *DNA Repair* **28**: 125-135

Suárez B, Isidoro B, Santos S, Sierra M, Molina R, Astray J, Amela C (2012) Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Revista Española de Salud Pública* **86**: 555-564

Sudhandiran G, Shaha C (2003) Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 25120-25132

Sundar S, Jha T, Thakur C, Sinha P, Bhattacharya S (2007) Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *The New England journal of medicine* **356**: 2571-2581

Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia M, Goyal A, Mandal A, Voss A, Hilgard P, Murray H (1998) Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* **352**: 1821-1823

Sutterwala F, Noel G, Salgame P, Mosser D (1998) Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *The journal of experimental medicine* **188**: 217-222

Symmers W (1960) Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *The Lancet* **1**: 127-132

Szostak J, Orr-Weaver T, Rothstein R, Stahl F (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35

Tabor S, Richardson C (1989) Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and Escherichia coli DNA polymerase I. *PNAS* **86**: 4076-4080

Tabor S, Richardson C (1995) A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *PNAS* **92**: 6339-6343

Takata K, Shimizu T, Iwai S, Wood RD (2006) Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 28445-28455

Taladriz S, Hanke T, Ramiro M, García-Díaz M, García De Lacoba M, Blanco L, Larraga V (2001) Nuclear DNA polymerase beta from Leishmania infantum. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucleic acids research* **29**: 3822-3834.

Tang J, Hwang B, Ford J, Hanawalt P, Chu G (2000) Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Molecular cell* **5**: 737-744

Tibayrenc M (1992) Leishmania: sex, karyotypes and population genetics. *Parasitology Today* **8**: 305-306

Torri A, Carpenter L, Englund P (1996) Kinetoplast DNA replication. In *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, 40 pp 1029-1042.

Torri A, Englund P (1992) Purification of a mitochondrial DNA polymerase from *Crithidia fasciculata*. *The Journal of biological chemistry* **267**: 4786-4792

Torri A, Englund P (1995) A DNA polymerase β in the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 3495-3497

Traut T (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and cellular biochemistry* **140**: 1-22

Van Assche T, Deschacht M, da Luz R, Maes L, Cos P (2011) Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine* **51**: 337-351

van den Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly J, van Cappellen W, Hoeijmakers J, Houtsmuller A, Vermeulen W (2004) DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *The Journal of cell biology* **166**: 27-36

Vélez I, Gilchrist K, Arbelaez M, Rojas C, Puerta J, Antunes C, Zicker F, Modabber F (2005) Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **99**: 593-598

Verma N, Singh G, Dey C (2007) Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Experimental parasitology* **116**: 1-13

Wanderley J, Moreira M, Benjamin A, Bonomo A, Barcinski M (2006) Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *Journal of immunology* **176**: 1834-1839

Watson J, Crick F (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738

Williams B, Lustig A (2003) The paradoxical relationship between NHEJ and telomeric fusion. *Molecular Cell* **11**: 1125-1126

Wyatt M, Pittman D (2006) Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology* **19**: 1580-1594

Wyllie S, Cunningham M, Fairlamb A (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 39925-39932

Xu D, Liew F (1994) Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* **12**: 1534-1536

Yamanaka K, Minko I, Takata K, Kolbanovskiy A, Kozekov I, Wood R, Rizzo C, Lloyd R (2010) Novel enzymatic function of DNA polymerase nu in translesion DNA synthesis past major groove DNA-peptide and DNA-DNA cross-links. *Chemical Research in Toxicology* **23**: 689-695

Yoon J, Bhatia G, Prakash S, Prakash L (2010) Error-free replicative bypass of thymine glycol by the combined action of DNA polymerases kappa and zeta in human cells. *PNAS* **107**: 14116-14121

Yoon J, Prakash L, Prakash S (2009) Highly error-free role of DNA polymerase eta in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *PNAS* **106**: 18219-18224

York S, Modrich P (2006) Mismatch repair-dependent iterative excision at irreparable O6-methylguanine lesions in human nuclear extracts. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 22674-22683

Yoshimura M, Kohzaki M, Nakamura J, Asagoshi K, Sonoda E, Hou E, Prasad R, Wilson S, Tano K, Yasui A, Lan L, Seki M, RD. W, Arakawa H, Buerstedde J, Hocheegger H, Okada T, Hiraoka M, Takeda S (2006) Vertebrate POLQ and POL β cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage. *Molecular Cell* **24**: 115-125

Yousefzadeh MJ, Wood RD (2013) DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA Repair* **12**: 1-9

Yu A, McVey M (2010) Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic acids research* **38**: 5706-5717

Zan H, Shima N, Xu Z, Al-Qahtani A, Evinger Iii A, Zhong Y, Schimenti J, Casali P (2005) The translesion DNA polymerase theta plays a dominant role in immunoglobulin gene somatic hypermutation. *The Embo Journal* **24**: 3757-3769

Zhang Y, Yuan F, Wu X, Wang M, Rechkoblit O, Taylor J, Geacintov N, Wang Z (2000) Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase kappa in vitro. *Nucleic Acids Research* **28**: 4138-4146.

Zheng H, Wang X, Warren A, Legerski R, Nairn R, Hamilton J, Li L (2003) Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 754-761

