

Determinación del interactoma proteico de PUF1 y su posible papel en la regularización postranscripcional en *Leishmania*

Darío López García

Máster en Microbiología



MÁSTERES
DE LA UAM
2019 – 2020

Facultad de Ciencias

Máster en Microbiología

Título: Determinación del interactoma proteico de PUF1 y su posible papel en la regulación postranscripcional en *Leishmania*

Autor: Darío López García

Beneficiario de Ayudas para el Fomento de la Investigación en Estudios de Máster-UAM 2019.

Director: Jose María Requena Rolania. Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias (UAM).

Lugar de realización: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO). Laboratorio 302.



ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. Obtención de datos del interactoma proteico de PUF1 en <i>Leishmania major</i> Friedlin. 7	
3.1.1. Interpretación de los datos proteómicos.....	8
3.2. Búsqueda de información bibliográfica en las bases de datos	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1. Interactoma proteico de la proteína PUF1 de <i>L. major</i> (<i>LmPUF1</i>).....	12
4.2. <i>LmPUF1</i> se encuentra asociada con importantes componentes de <i>P-bodies</i> (PB), gránulos de estrés (SG) y maquinaria de exportación de mRNAs al citoplasma.....	13
4.2.1. <i>LmPUF1</i> y PB.....	14
4.2.2. <i>LmPUF1</i> y SG	16
4.2.3. RNA helicasas con caja DEAD presentes en el interactoma de <i>LmPUF1</i>	18
4.2.4. Asociación de <i>LmPUF1</i> con proteínas implicadas en la maduración y exportación al citoplasma de mRNAs.....	20
4.3. Posible interacción de <i>LmPUF1</i> con las chaperonas HSP70 y cochaperonas HSP40. 22	
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	25
6. REFERENCIAS.....	27
7. APÉNDICE	30

Palabras clave: *Leishmania*, *Trypanosoma*, tripanosomátidos, regulación postranscripcional, PUF, proteínas de unión a RNA (RBPs), gránulos ribonucleoproteicos (RNPs), gránulos de estrés (SG), *P-bodies* (PB), mRNA, transporte nucleocitoplasmático, chaperonas moleculares.

1. RESUMEN/ABSTRACT

Resumen. Los parásitos del género *Leishmania* tienen ciclos de vida en los que alternan entre un insecto poiquilotérmico y un hospedador mamífero. Debido a esto, sufren continuos episodios de estrés (térmico, nutricional y oxidativo) por lo que requieren una regulación rápida de la expresión génica para adaptarse a cada condición. *Leishmania* carece de regulación transcripcional, regula su expresión mediante mecanismos postranscripcionales en los que las proteínas de unión a RNA (RBPs) ejercen un papel esencial, modulando la traducción, estabilidad, degradación y transporte de mRNAs. Entre las diferentes familias de RBPs se encuentran las proteínas PUF, que han sido poco estudiadas en *Leishmania*, a pesar de ser un grupo numeroso. En este trabajo, mediante espectrometría de masas, hemos analizado el interactoma proteico de PUF1 en *Leishmania major* (*LmPUF1*), con un paso encaminado a deducir procesos biológicos en los que esta proteína interviene. Se han identificado 90 proteínas asociadas a *LmPUF1* de forma específica. Entre estas, encontramos componentes de *P-bodies*, gránulos de estrés, helicasas con caja DEAD y componentes de la maquinaria de maduración y exportación de mRNAs al citoplasma. Estos elementos están implicados en la regulación postranscripcional, participando en degradación, almacenaje, transporte y traducción de mRNAs. Asimismo, hemos identificado la asociación de *LmPUF1* a chaperonas HSP70 y cochaperonas HSP40, componentes esenciales en la proteostasis en *Leishmania*. Estas evidencias permiten proponer a *LmPUF1* como un regulador del destino de los mRNAs a los que se une, ejerciendo un papel esencial en la regulación postranscripcional en *Leishmania*.

Abstract. Parasites of the genus *Leishmania* have life cycles in which they alternate between a poikilothermic insect and a mammalian host. Consequently, they suffer continuous episodes of stress (thermal, nutritional and oxidative) and therefore require rapid regulation to adapt to each condition. *Leishmania* lacks transcriptional regulation. It regulates its expression through post-transcriptional mechanisms in which RNA-binding proteins (RBPs) play an essential role in modulating translation, stability, degradation and transport of mRNAs. Within the different families of RBPs, we find PUF proteins, which have barely been studied in *Leishmania*. By mass spectrometry, we have analysed the protein interactome of PUF1 in *L. major* (*LmPUF1*), in order to deduce biological processes in which it could participate. We have identified 90 proteins associated with *LmPUF1* specifically. Among these, we find components of P-bodies, stress granules, DEAD box RNA helicases and components of the machinery for maturation and export of mRNAs to the cytoplasm, elements of great importance in post-transcriptional regulation by participating in the degradation, storage, transport and translation of mRNAs. We have also identified the association of *LmPUF1* with HSP70 chaperones and HSP40 cochaperones, key components in proteostasis in *Leishmania*. This evidences allows us to propose *LmPUF1* as a regulator of the fate of the mRNAs it binds to, playing an essential role in post-transcriptional regulation in *Leishmania*.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Leishmania* incluye una serie de especies de parásitos protozoos, clasificados dentro de la clase Kinetoplastea, orden de los tripanosomátidos (Trypanosomatida) y familia Trypanosomatidae. Los tripanosomátidos son un grupo de parásitos muy exitosos, incluyendo organismos con una enorme importancia médica y económica [1]. Así, *Leishmania* es el agente etiológico de un espectro de enfermedades que afectan al ser humano conocidas como leishmaniasis. Se han descrito hasta 53 especies diferentes dentro del género *Leishmania*, de las cuales 20 son patogénicas para el hombre. Los cánidos y roedores actúan de reservorios de algunas de estas especies, y la transmisión al ser humano se produce mediante la picadura de los insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* (Eurasia y África) y *Lutzomyia* (América) [1].

La leishmaniasis es una enfermedad olvidada, por afectar principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico, aunque está ampliamente distribuida en 88 países en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Más de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer leishmaniasis, y aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas [2]. Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por un espectro diverso de manifestaciones, que van desde una úlcera cutánea de curación espontánea hasta una enfermedad visceral grave. En base a los síntomas clínicos, se han establecido tres categorías: la leishmaniasis cutánea (LC), la leishmaniasis visceral (LV) y la leishmaniasis mucocutánea (LM) [2, 3].

Leishmania posee un ciclo de vida muy complejo, alternando entre dos hospedadores (insectos y vertebrados) y adoptando diferentes formas de vida (promastigotes extracelulares en el intestino del insecto y amastigotes intracelulares en el mamífero) (Fig. 1). En cada momento del ciclo de vida, debe activar diferentes programas genéticos adaptados a cada condición. Los tripanosomátidos han evolucionado de forma que no requieren de una regulación de la expresión génica a nivel transcripcional. Tienen una organización genómica muy particular, con decenas o centenares de genes codificantes que no mantienen una relación funcional y están organizados en agrupaciones presentes en la misma hebra. Estas agrupaciones están separadas por secuencias cortas de pocas kilobases denominadas regiones de cambio de hebra (SSRs, del inglés *strand-switch regions*), en las que la transcripción converge o diverge [4]. La transcripción se inicia en SSRs divergentes y finaliza en SSRs convergentes, sin existir promotores individuales, y procede generando transcritos policistrónicos denominados

unidades transcripcionales policistrónicas (PTUs, del inglés *polycistronic transcription units*). Estas PTUs son procesadas en mRNAs monocistrónicos maduros por los mecanismos de *trans-splicing* y poliadenilación [5].

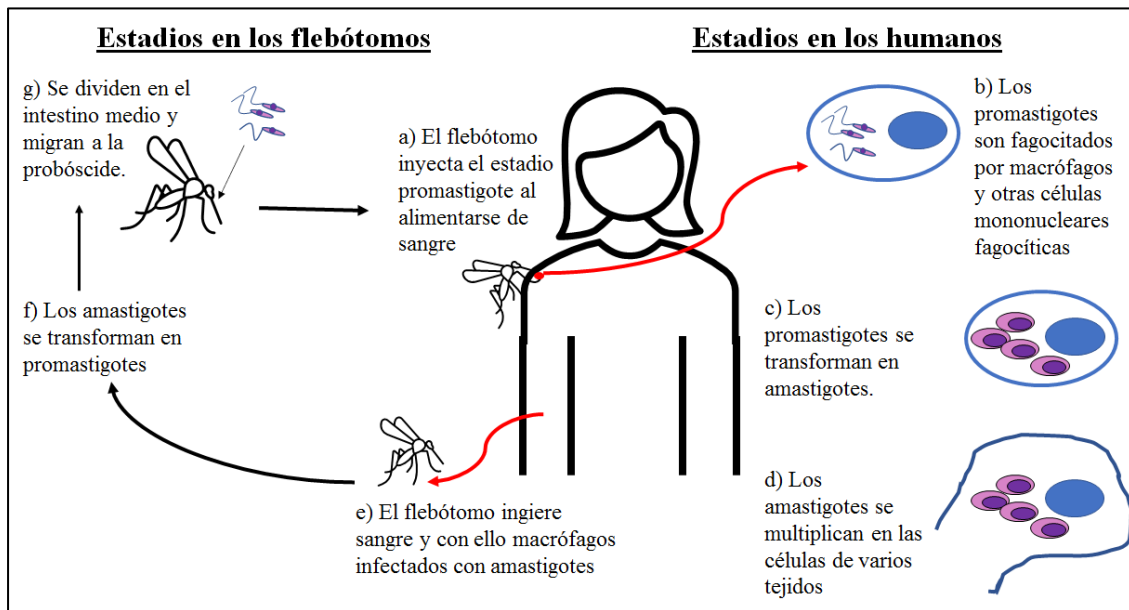


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. La leishmaniasis es transmitida por la picadura de los flebótomos. a) Los flebótomos inyectan el estadio infectante, promastigote metacíclico, cuando se alimentan de sangre. b) Los promastigotes son fagocitados por macrófagos y células de Langerhans principalmente y c) se transforman en amastigotes. d) Los amastigotes se multiplican en las células infectadas; tras la lisis de la célula hospedadora, los amastigotes se liberan e infectan nuevas células. Diferentes tejidos van a ser afectados en función de la especie infectante y esto se asocia a las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. e) El flebótomo adquiere el parásito al alimentarse de la sangre del hospedador infectado, donde hay fagocitos infectados con amastigotes. f) En el intestino del insecto, los amastigotes se diferencian a promastigotes procíclicos, g) los cuales se multiplican y migran hacia la probóscide al tiempo que experimentan la metaciclogénesis, generando de nuevo promastigotes metacíclicos infectivos.

Debido a esta ausencia de regulación transcripcional, los tripanosomátidos regulan la expresión casi exclusivamente por mecanismos postranscripcionales [4-6]. Los mRNAs maduros contienen motivos reguladores, situados con frecuencia en sus regiones no traducidas 3'-UTR, sobre los que las proteínas de unión a RNA (RBPs, del inglés *RNA-binding proteins*) van a unirse, controlando su transporte, estabilidad, destino subcelular y eficiencia de traducción [4, 5]. Las RBPs, se asocian con grupos de mRNAs que codifican proteínas relacionadas funcionalmente, generando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) llamados "operones postranscripcionales" [5, 7]. De esta forma, los mRNAs no traducidos se almacenan en grandes complejos RNPs sin membrana, donde distintas proteínas cooperan para regular el destino de dichos mRNAs. Esto supone un modelo atractivo para entender cómo determinados grupos de genes son preferencialmente expresados en un determinado estadio de vida sin necesidad de regulación transcripcional. Diferentes señales extracelulares como cambios de pH,

temperatura o metabolitos, podrían estar regulando la activación y función de las RBPs, las que a su vez actuarán remodelando el proteoma celular [5].

Se han descrito una gran cantidad de RBPs codificadas por los genomas de los tripanosomátidos, su número es mayor que en muchos otros eucariotas [5]. Entre estas, podemos destacar las proteínas de la familia PUF, que contiene 10 miembros en tripanosomátidos tales como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* [8]. Las proteínas PUF, constituyen un grupo evolutivamente conservado presente en todos los filos eucariotas. Son capaces de unirse a los motivos de secuencia en el 3'-UTR de mRNAs específicos y controlan su localización, estabilidad y traducción. Generalmente presentan una función de represores traduccionales, aunque también se ha descrito su capacidad de llevar a cabo una regulación positiva [9]. La característica distintiva de las proteínas PUF es el dominio de unión a RNA conocido como dominio de homología a Pumilio (PUM-HD), una estructura con forma de arco que se compone de varias repeticiones consecutivas (típicamente ocho) de alrededor de 36-40 aminoácidos (repeticiones PUM, cada una compuesta por tres α -hélices) [8, 10]. Como vemos en la Figura 2, por la parte cóncava interaccionan con el RNA de forma que cada una de las repeticiones se une a un único nucleótido de la zona 3'-UTR del mRNA, mientras que la parte convexa sirve de lugar de interacción con otras proteínas [10, 11].

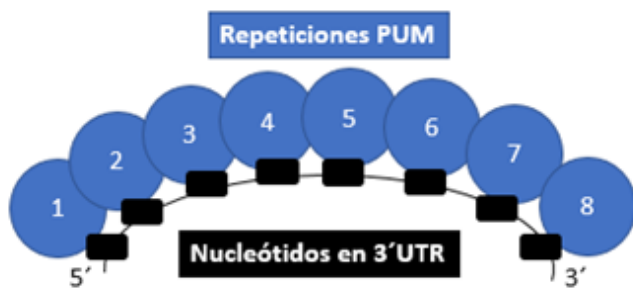


Figura 2. Modelo estructural del dominio PUM-HD. PUM-HD ligado a su diana de RNA. Cada repetición se encuentra unida al nucleótido correspondiente a través de fuerzas de Van der Waals.

La mayoría de los estudios en relación con la función biológica de la familia de las proteínas PUF se han realizado en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*, organismos en los que se ha comprobado que regulan aspectos esenciales, tales como proliferación, mantenimiento y diferenciación de células madre, regulación de patrones de desarrollo, funcionamiento neuronal y biogénesis de orgánulos [11].

Las proteínas PUF son muy versátiles, su función depende de su estructura y de la secuencia del mRNA, así como de las proteínas a las que se encuentren asociadas [9,

10]. Las proteínas PUF suelen interactuar con diferentes proteínas celulares, constituyendo así agrupaciones o complejos proteicos que regulan el destino de los mRNAs con los que interactúan. Podemos destacar, como ejemplo, la formación de este tipo de complejos en el proceso de embriogénesis en *Drosophila*. La proteína Nanos se acumula en la parte posterior del embrión de *Drosophila* y participa en la inhibición de la traducción del mRNA del morfógeno *hunchback*. Esta inhibición de la traducción de *hunchback* se lleva a cabo mediante la formación de un complejo proteico de Nanos y la proteína Pumilio (de la familia PUF), la cual a su vez interactúa con una región del 3'-UTR del mRNA de *hunchback* [12]. Por otro lado, en un estudio de Cooke *et al.* [13] se muestra la importancia de las proteínas PUF como plataformas proteicas capaces de dirigir proteínas efectoras a mRNAs específicos y controlar el destino de los mismos (traducción, degradación, transporte, etc.). En este estudio, prepararon proteínas quiméricas en las que fusionaban PUF a GLD2, una poli (A) polimerasa que alarga la cola poli (A) del 3' de los mRNAs, de forma que las quimeras PUF-GLD2 aumentan la estabilidad y vida media de los mRNAs a los que se unen. Por otro lado, construyeron quimeras de PUF y CAF1, una proteína implicada en desadenilación o eliminación de la cola poli (A), mostrando entonces la quimera PUF-CAF1 el efecto contrario [13].

A pesar de la gran relevancia de la regulación postranscripcional en los tripanosomátidos, existen muy pocos estudios que aborden el papel funcional de las proteínas PUF en estos organismos, y especialmente en *Leishmania*. Entre ellos, podemos destacar el papel de LiPUF6 (*L. infantum* PUF6), que interactúa con secuencias propias de una clase de elementos repetidos denominados SIDER2, presentes en los extremos 3'-UTR de muchos mRNAs. Esta interacción favorece la degradación de dichos mensajeros de una forma específica de especie y estadio [14]. Así, dada la importancia de las RBPs en el ciclo de vida de *Leishmania* y el gran número de proteínas PUF que poseen, existe un gran interés en conocer la función de las mismas en la regulación de la expresión génica en *Leishmania*.

Conocemos el papel regulador de las proteínas PUF en otros organismos y su capacidad de interactuar con diferentes proteínas. Por tanto, nuestra hipótesis es que las proteínas PUF pueden estar actuando como una plataforma de reclutamiento de proteínas implicadas en la traducción, transporte, estabilización y degradación de mRNAs, siendo un pilar fundamental del metabolismo del mRNA en *Leishmania*.

Por ello, el primer objetivo de este trabajo fue el estudio del interactoma proteico de la proteína *LmPUF1* (PUF1 de *L. major*), obtenido mediante co-inmunoprecipitación y posterior análisis proteómico. De este modo, se identificaron 90 proteínas diferentes asociadas de forma específica a *LmPUF1*. A continuación, el segundo objetivo fue analizar las características funcionales de cada una de estas proteínas con la finalidad de deducir procesos moleculares en los que la proteína *LmPUF1* podría estar interviniendo. Entre las proteínas identificadas, se encontrarían importantes componentes de cuerpos de procesamiento (PB, del inglés *Processing Bodies* o *P-bodies*, un tipo de gránulo RNP donde se produce la degradación de mRNAs), componentes de gránulos de estrés (SG, del inglés *Stress Granules*, estructuras de almacén de mRNAs no traducidos en condiciones de estrés), componentes de la maquinaria de maduración y exportación al citoplasma de mRNAs, y chaperonas moleculares. Un porcentaje muy importante del interactoma de *LmPUF1* lo componen proteínas implicadas en la biosíntesis de proteínas, chaperonas moleculares y proteínas de unión a RNA, por lo que prestamos especial atención a estos grupos de proteínas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de datos del interactoma proteico de PUF1 en *Leishmania major* Friedlin

Previamente en el laboratorio, se había realizado el procedimiento experimental para la obtención de los datos proteómicos. Este procedimiento, descrito de forma breve, consistió en la irradiación de 2×10^8 promastigotes con luz UV para establecer entrecruzamientos proteína-RNA. A continuación, se llevó a cabo una co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-*LmPUF1* acoplados a bolitas magnéticas. Las proteínas presentes en los inmunocomplejos se cargaron en un gel de poliacrilamida para concentrar la muestra. Dentro del gel, se llevó a cabo una digestión con tripsina de la muestra. Finalmente, los péptidos resultantes se separaron en una cromatografía líquida de fase reversa y se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem (RP-LC-MS/MS). Se realizaron tres réplicas biológicas. La identificación de los péptidos a partir de los datos en bruto se llevó a cabo empleando el algoritmo SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific) y la búsqueda sobre la base de datos de *L. major* en UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (Fig. 3). Como resultado, se obtuvo una lista con las proteínas asociadas a *LmPUF1*, y el número de péptidos encontrados de cada una. Como

control negativo, se emplea suero preinmune (obtenido del mismo conejo, pero antes de la inoculación del inmunógeno *Lm*PUF1) o un anticuerpo obtenido frente a un inmunógeno no relacionado (en nuestro caso, se empleó un anticuerpo anti-*Lm*PUF3).

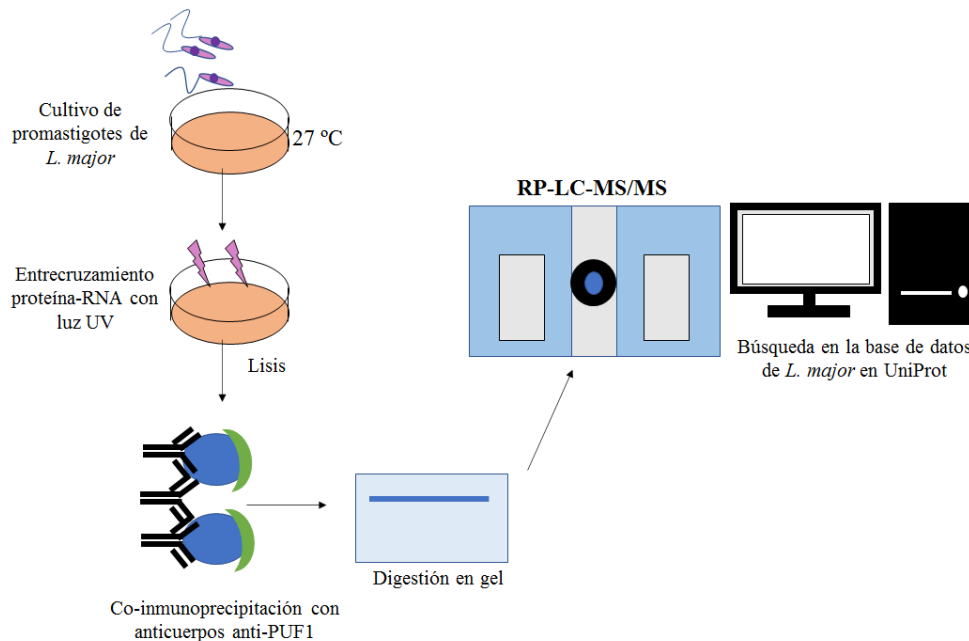


Figura 3. Esquema del procedimiento experimental empleado para obtener el interactoma proteico asociado a *Lm*PUF1. 2×10^8 promastigotes son sometidos a un entrecruzamiento proteína-RNA con luz ultravioleta (UV) y lisados. Los lisados se someten a co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-*Lm*PUF1. El conjunto de proteínas obtenidas se digiere en gel y se someten a RP-LC-MS/MS. La identificación de los péptidos a partir de los datos en bruto se lleva a cabo empleando el algoritmo SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific) y la búsqueda en la base de datos se realiza sobre la base de datos de *L. major* en Uniprot.

3.1.1. Interpretación de los datos proteómicos

Los ficheros con los datos del análisis proteómico son proporcionados por el Servicio de Proteómica del CBMSO. Estos ficheros muestran la lista de proteínas identificadas (con su código de acceso en UniProt), el número de péptidos encontrados de cada una y el código del gen codificante en *L. major* Friedlin para dichas proteínas.

Como hemos comentado anteriormente, se hicieron tres réplicas biológicas de co-inmunoprecipitación con anti-*Lm*PUF1 y posterior análisis proteómico, por lo que tenemos tres réplicas independientes del interactoma de *Lm*PUF1. Para considerar relevante la presencia de una proteína en el interactoma, ésta debía estar presente en al menos dos de estas tres réplicas, y en dicho caso sumamos el total de péptidos de dicha proteína encontrados en las réplicas. Por otro lado, se agruparon los datos de proteínas encontradas en los controles negativos, y en este caso, se tuvieron en cuenta todas las proteínas identificadas y el número de péptidos de cada una. Así, para determinar la

significancia estadística de la asociación de una determinada proteína a *Lm*PUF1, se aplicó un análisis estadístico basado en la distribución binomial. Para ello se tuvo en cuenta el número de péptidos totales de dicha proteína identificados en las réplicas biológicas y en los controles negativos, y se estableció un valor de probabilidad de la hipótesis nula (p) < 0,05 para considerar una asociación estadísticamente significativa.

Finalmente, una vez determinado el total de proteínas asociadas de forma significativa a *Lm*PUF1, se procedió a la identificación funcional. Como hemos comentado, el listado generado por el motor de búsqueda SEQUEST contiene el código de identificación del gen; por ejemplo, LmjF.36.0050, significa que la proteína está codificada en el gen 5 del cromosoma 36. Para la identificación de la proteína asociada, primero utilizamos el servidor Leish-ESP (<http://leish-esp.cbm.uam.es>), que, entre otras aplicaciones, contiene una base de datos, constantemente actualizada, sobre la anotación del genoma en *L. infantum* [15]. En esta base de datos, es posible identificar las proteínas correspondientes a través del identificador LmjF (*L. major* Friedlin). Así, en este caso, el buscador del servidor indica que el gen LmjF.36.0050 codifica la proteína PUF1. Además, en la plataforma Wikidata (<https://www.wikidata.org/>), nuestro grupo ha generado fichas individualizadas para cada uno de los genes de *L. infantum* donde se recoge toda la información que se tiene sobre el gen, su ortólogo en *L. major*, y la proteína codificada, junto con las referencias bibliográficas correspondientes. Así, esta labor de compilación de información se pone al servicio de todas aquellas personas interesadas, que además pueden contribuir aportando nueva información. En este sentido, durante el desarrollo de mi proyecto he colaborado en la actualización de esta base de datos.

Otra fuente de información empleada ha sido la base de datos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>). TriTrypDB es una base de datos de genómica funcional de un gran número de organismos de la familia Trypanosomatidae, incluidos organismos de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. Asimismo, en TriTrypDB se puede encontrar información a través de la búsqueda con el código del gen codificante de *L. major* Friedlin. Como resultado, el servidor genera un listado con los genes ortólogos en cada una de las especies. A continuación, una búsqueda individualizada sobre cada entrada nos permite identificar artículos científicos referentes a la proteína codificada por cada gen en particular. Por tanto, para cada proteína de interés, hemos obtenido en TriTrypDB información sobre su función, sus ortólogas en diferentes especies y bibliografía relacionada. Finalmente, una vez reunida toda la información, se procedió a asignar

posibles funciones a las proteínas identificadas por su asociación a la proteína *LmPUF1*. Esta información se encuentra recogida en la Tabla 1A del apéndice, y resumida en la Tabla 2.

3.2. Búsqueda de información bibliográfica en las bases de datos

En este trabajo, una labor importante ha consistido en buscar y leer de forma detallada la información bibliográfica existente sobre las proteínas identificadas, no solo en el campo de los tripanosomátidos, sino en cualquier organismo. Se ha hecho una búsqueda en internet empleando como base de datos “PubMed” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y “PubMed Central” (PMC) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>). La búsqueda se ha realizado en inglés, lengua en la que se encuentran la mayoría de las entradas de estas bases de publicaciones científicas.

Las palabras clave empleadas en nuestras búsquedas han sido: *Leishmania, evolution, leishmaniasis, epidemiology, RNA binding protein, post-transcriptional, PUF, trypanosomatids, Trypanosoma, RNP, stress granule, P-body, decapping, microtubules, RNA helicases, mRNA, export, molecular chaperones, ubiquitination, Hsp70, proteasome, proteasome-independent, functions.*

Los operadores booleanos empleados han sido: “AND” (aporta mayor especificidad a la búsqueda) y “OR” (que nos permite juntar términos con un significado parecido). De este modo, se han combinado las palabras clave con los operadores con el fin de ajustar la búsqueda a nuestros objetivos. Se utilizó el término de búsqueda “MeSH” (*Medical Subject Headings*). Se han empleado las siguientes ecuaciones de búsqueda en PMC o PubMed (Tabla 1):

Tabla 1. Ecuaciones de búsqueda en PMC o PubMed. Número de artículo y su ecuación de búsqueda asociada.

Artículos	Ecuación de búsqueda
[1]	("leishmania"[MeSH Terms] OR "leishmania"[All Fields]) AND ("biological evolution"[MeSH Terms] OR ("biological"[All Fields] AND "evolution"[All Fields]) OR "biological evolution"[All Fields] OR "evolution"[All Fields]).
[2]	("leishmaniasis"[All Fields] OR "leishmaniasis"[MeSH Terms]) AND ("epidemiology"[All Fields] OR "epidemiology"[MeSH Terms])
[4-7]	("rna-binding proteins"[MeSH Terms] OR ("rna-binding"[All Fields] AND "proteins"[All Fields]) OR "rna-binding proteins"[All Fields] OR ("rna"[All Fields] AND "binding"[All Fields] AND "proteins"[All Fields]) OR "rna binding proteins"[All Fields]) AND trypanosomatids[All Fields] AND posttranscriptional[All Fields].
[8, 14]	puf [All Fields] AND trypanosomatids[All Fields].
[9-13]	puf [All Fields]

[16, 17, 20, 22-24, 26]	rnp [All Fields] AND granules [All Fields] AND posttranscriptional [All Fields] AND trypanosomatids [All Fields].
[25, 27, 31-33]	"stress"[All Fields] AND granules[All Fields] AND ("leishmania"[MeSH Terms] OR "leishmania"[All Fields]) AND ("trypanosoma"[MeSH Terms] OR "trypanosoma"[All Fields] OR "trypanosomes"[All Fields]).
[28, 29]	trypanosomatids[All Fields] AND decapping[All Fields].
[30]	P-body[All Fields] AND ("microtubules"[MeSH Terms] OR "microtubules"[All Fields])
[21, 35, 39]	trypanosomatids[All Fields] AND ("rna helicases"[MeSH Terms] OR ("rna"[All Fields] AND "helicases"[All Fields]) OR "rna helicases"[All Fields])
[38]	("mrna"[All Fields] OR "mrna"[MeSH Terms]) AND export[All Fields]
[42]	("mrna"[All Fields] OR "mrna"[MeSH Terms]) AND export[All Fields] AND puf[All Fields]
[18, 19, 43]	P-bodies[All Fields] AND "stress"[All Fields] AND granules[All Fields] AND ("messenger ribonucleoprotein"[All Fields] OR "mrnp"[All Fields]) AND granules[All Fields]
[44-47]	("molecular chaperones"[MeSH Terms] OR ("molecular"[All Fields] AND "chaperones"[All Fields]) OR "molecular chaperones"[All Fields]) AND (trypanosoma[All Fields] OR leishmania[All Fields])
[48]	Hsp70[All Fields] AND proteasome [All Fields]
[49]	("ubiquitination"[MeSH Terms] OR "ubiquitination"[All Fields]) AND ("leishmania"[MeSH Terms] OR "leishmania"[All Fields])
[50]	"proteasome-independent"[All Fields] AND "functions" [All Fields] AND ubiquitination[All Fields]
[51, 52]	("molecular chaperones"[MeSH Terms] OR ("molecular"[All Fields] AND "chaperones"[All Fields]) OR "molecular chaperones"[All Fields]) AND "stress"[All Fields] AND granules[All Fields].

Se han incluido artículos publicados a partir de 2010, con algunas excepciones por encontrar en ellas información relevante. Todos los artículos consultados son artículos de investigación primarios o revisiones. Por otro lado, nos apoyamos de la información recopilada en TriTrypDB y Wikidata. En ambas bases de datos, mediante el código del gen codificante para la proteína de interés, se accede a información complementaria como publicaciones relacionadas con el gen y la proteína codificada.

Por último, se realizó una búsqueda de conceptos clínicos y epidemiológicos de la leishmaniasis en la página web del “Centers for Disease Control and Prevention”(CDC; <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>) [3].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Interactoma proteico de la proteína PUF1 de *L. major* (*LmPUF1*)

Con el fin de poder analizar las proteínas que se encuentran asociadas a *LmPUF1*, se realizó una co-inmunoprecipitación partiendo de extractos de promastigotes de *L. major* Friedlin. Las proteínas co-inmunoprecipitadas se analizaron mediante RP-LC-MS/MS, lo que permitió su identificación en base al perfil peptídico deducido del espectro de masas. Empleando la metodología analítica descrita, identificamos 90 proteínas asociadas de forma estadísticamente significativa a *LmPUF1* con respecto al control (Tabla 1A del apéndice).

Este conjunto de proteínas fue clasificado en 13 subgrupos atendiendo a su función celular (Fig. 4) (Tabla 2). El mayor porcentaje de proteínas asociadas a *LmPUF1* son proteínas implicadas en la biosíntesis de proteínas. Aquí incluimos aminoacil-tRNA sintetasas, proteínas de las subunidades ribosomales 60S y 40S y factores de iniciación y elongación de la traducción (Tabla 1A). A continuación, los grupos más abundantes son chaperonas moleculares, proteínas de unión a RNA y proteínas que hemos clasificado como “Otras funciones”, donde incluimos enzimas con diversas funciones, así como una proteína con función desconocida (Fig. 4) (Tabla 2, Tabla 1A). Estos grupos en conjunto suponen más de un 70% de las proteínas asociadas a *LmPUF1*.

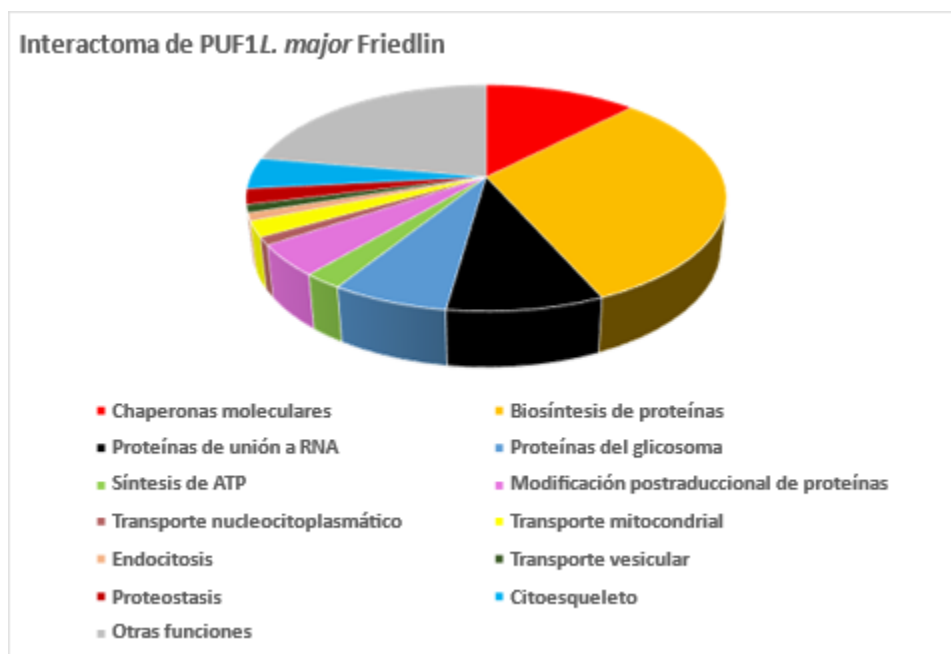


Figura 4. Gráfico circular con la proporción relativa de los subgrupos de proteínas asociadas a *LmPUF1* clasificadas por su función celular. El código de colores del gráfico se encuentra asociado a cada función celular. La sección que ocupa cada subgrupo representa el porcentaje del total del interactoma que se corresponde a proteínas con dicha función.

Tabla 2. Clasificación funcional de las proteínas asociadas a *Lm*PUF1. Clasificación funcional de las proteínas asociadas de forma significativa a *Lm*PUF1, número de proteínas asociadas a cada función y porcentaje que representa cada grupo con respecto al total.

Función celular	Número de proteínas encontradas	Porcentaje del total (%)
Chaperonas moleculares	11	12,22
Biosíntesis de proteínas	28	31,11
Proteínas de unión a RNA	8	8,889
Proteínas del glicosoma	6	6,67
Síntesis de ATP	2	2,222
Modificación postraduccional de proteínas	4	4,444
Transporte nucleocitoplasmático	1	1,111
Transporte mitocondrial	2	2,222
Endocitosis	1	1,111
Transporte vesicular	1	1,111
Proteostasis	2	2,222
Citoesqueleto	4	4,444
Otras funciones	20	22,22

A continuación, en este trabajo, profundizamos en las funciones de proteínas clasificadas dentro de los grupos de biosíntesis de proteínas, proteínas de unión a RNA y chaperonas moleculares.

4.2. *Lm*PUF1 se encuentra asociada con importantes componentes de *P-bodies* (PB), gránulos de estrés (SG) y maquinaria de exportación de mRNAs al citoplasma.

Los mRNAs no traducidos se almacenan en grandes complejos ribonucleoproteicos (RNPs), sin membrana y donde diferentes proteínas regulan el destino de dichos mRNAs. Existen múltiples tipos de RNPs; entre los más importantes están los PB, que contienen proteínas implicadas en la degradación de mRNAs, y los SG, que contienen complejos de iniciación de la traducción, incluyendo subunidades pequeñas del ribosoma. Ambos tipos de gránulos interactúan entre sí, están en un continuo intercambio de componentes. En condiciones normales, los mRNAs en el citoplasma están siendo traducidos en polisomas o degradados en los PB, encontrándose ambos procesos en equilibrio. En condiciones de estrés (térmico, nutricional, etc.), la mayoría de los mRNAs se separan de los polisomas y se dirigen o a la maquinaria de degradación (PB), o a SG en los que permanecen silentes hasta que las condiciones vuelvan a la normalidad [16]. Dentro de los tripanosomátidos, se han encontrado hasta 6 tipos diferentes de RNPs (PB, SG tras choque térmico, SG tras depleción de nutrientes, gránulos de almacén de tRNAs, gránulos de periferia nuclear y gránulos en el polo

posterior), caracterizados por la presencia de marcadores proteicos específicos, los cuales han sido ampliamente estudiados en *T. brucei* y *T. cruzi* [17]. En nuestro análisis del interactoma proteico de *LmPUF1*, hemos identificado componentes presentes en PB y SG.

4.2.1. *LmPUF1* y PB

Existen estudios en levaduras de la especie *S. cerevisiae* que sugieren la implicación de las proteínas PUF en la regulación postranscripcional en los PB. Lee *et al.* [18] describieron una relación entre Puf3 y los PB al observar mediante inmunofluorescencia la colocalización de Puf3 con Dhh1 y Edc3, dos componentes conocidos de los PB [18]. Así mismo, Mitchell *et al.* [19] observaron que, tras la inducción de estrés por privación de glucosa, diferentes proteínas Puf (Puf2-5) se acumulaban en PB y SG (de los SG se habla más adelante).

En concordancia con estos estudios, hemos podido identificar una asociación estadísticamente significativa de *LmPUF1* a *LmDHH1*, que es un importante marcador de PB [20]. DHH1 es una RNA helicasa con caja DEAD con actividad ATPasa, implicada en el mantenimiento y regulación de la dinámica de estos gránulos RNPs. Las RNA helicasas con caja DEAD son una familia con múltiples miembros conservados en la mayoría de los procariotas y eucariotas, que pertenecen a la superfamilia 2 de helicasas (SF2), implicadas en el metabolismo del RNA [20, 21].

La proteína DHH1 ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae* (donde se denomina Dhh1 siguiendo la nomenclatura específica en la especie) y ha mostrado ser esencial en la estimulación de la degradación de los mRNAs al asociarse con múltiples proteínas involucradas en la eliminación del 5'cap (Dcp1-Dcp2, Pat1 y Edc3), y con ello permitir que la exonucleasa Xrn1 degrade el mRNA en sentido 5'-3' [9, 20, 22]. Asimismo, tanto Dhh1 como las proteínas Puf son capaces de interactuar con Pop2, una subunidad del complejo de desadenilación del mRNA, promoviendo también la eliminación de la cola de poli (A). Ambos procesos, eliminación del 5'cap y desadenilación, son necesarios para la degradación de mRNAs. Por tanto, DHH1 es esencial en la represión de la traducción y en la degradación de los mRNAs (Fig. 5) [9].

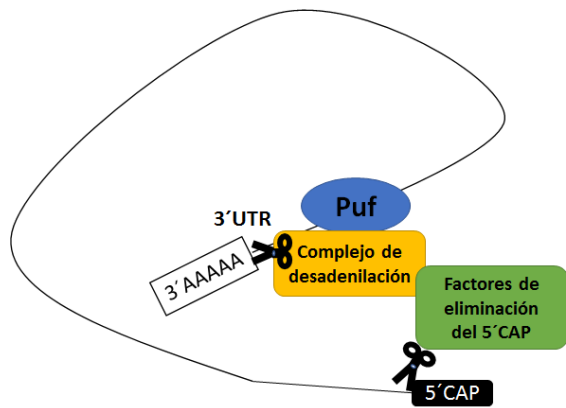


Figura 5. Represión de la traducción por las proteínas PUF. Las proteínas PUF se unen a secuencias blanco en el 3'-UTR de sus mRNAs y reclutan el complejo de desadenilación de mRNAs (Ccr4-Pop2-NOT, a través de su interacción con la subunidad Pop2). Además de la desadenilasa, el complejo represivo reclutado por Puf incluye factores de eliminación del 5'cap (como Dhh1 y Dcp1, que están asociados con Ccr4-Pop2-NOT). Al reclutar factores que afectan tanto a la cola de poli (A) como al 5'cap, las proteínas PUF pueden promover de forma efectiva la desadenilación y la represión de la traducción.

DHH1 se ha estudiado en PB de humanos (donde la proteína ortóloga se denomina DDX6), levaduras [18, 19, 20, 23], así como en tripanosomátidos [24-26]. En *T. cruzi*, se encontró una importante asociación en la fase de epimastigote (no infectiva) de *TcDHH1* a la proteína *TcPUF6* (*Trypanosoma cruzi* PUF6), de forma que se plantea que *TcPUF6* y *TcDHH1* reprimen la traducción de ciertos mRNAs implicados en estadios infectivos posteriores (tripomastigotes metacíclicos) [24-26]. *TcPUF6* es la ortóloga en *T. cruzi* a la proteína *TbPUF1* (*T. brucei* PUF1) y *LmPUF1* [24], por lo que estos datos apoyan nuestro hallazgo.

Así, la asociación de *LmDHH1* con *LmPUF1*, sugiere la presencia de *LmPUF1* en los PB, y su capacidad de interactuar con proteínas efectoras como *LmDHH1*, regulando la degradación de mRNAs.

Cabe destacar, que no se conocen ortólogos en tripanosomátidos de Dcp1, Dcp2, Pat1 ni Edc3, componentes de la maquinaria de eliminación del 5'cap de eucariotas [25, 27, 28]. La estructura del 5'cap en tripanosomátidos es diferente, mostrando un residuo de 7-metil GTP seguido de cuatro residuos metilados (se denomina cap4) [29], por lo que se propone que tienen una maquinaria específica. En 2017, Kramer *et al.* [28] identificaron en *T. brucei* la proteína *TbALPH1* como la enzima de eliminación del cap4, buscada desde hace mucho tiempo en *Trypanosoma*. Llegaron a esta conclusión al observar que la depleción de *TbALPH1* es letal y resulta en un acúmulo masivo de mRNAs desadenilados pero que mantenían el cap y no eran degradados [28]. La proteína ortóloga en *L. major* Friedlin de *TbALPH1* es una Ser/Thr fosfatasa codificada por el gen *LmjF.22.1600*. No hemos encontrado esta proteína en nuestro análisis proteómico, por lo que será interesante en estudios futuros investigar la maquinaria de eliminación del cap

en *Leishmania*, y determinar si esta proteína ortóloga de *TbALPH1* también cumple dicha función.

Las células eucariotas transportan diferentes componentes a ubicaciones intracelulares particulares a través de microtúbulos y filamentos de actina. Aizer *et al.* [30] observaron en células U2OS humanas, que los PB muestran un desplazamiento limitado en la célula que es dependiente de su asociación a los microtúbulos. Asimismo, encontraron que algunos PB se mantenían estáticos asociados a haces de actina. En nuestro análisis proteómico hemos encontrado una asociación significativa de *LmPUF1* con diferentes componentes del citoesqueleto: α -tubulina ($p = 0,03$), β -tubulina ($p = 6,5 \times 10^{-6}$) y actina ($p = 0,015$). Si bien, las proteínas del citoesqueleto son muy abundantes y participan en múltiples procesos, por lo que podrían encontrarse en la inmunoprecipitación de forma inespecífica. Sin embargo, dado que el valor p es menor al límite establecido (0,05), sugiere un enriquecimiento en las estructuras asociadas con *LmPUF1* y, por tanto, será interesante profundizar en el análisis de esta asociación entre los RNPs y el citoesqueleto.

4.2.2. *LmPUF1* y SG

La fosforilación de eIF2 α por quinasas activadas por estrés o la interferencia del inicio de la traducción al inhibir eIF4A son dos mecanismos que resultan en la formación de complejos de preiniciación improductivos y abortivos en el mRNA, induciendo la formación de estructuras citoplasmáticas microscópicamente visibles llamadas gránulos de estrés (SG) [31]. Los SG aparecen bajo condiciones de estrés y su presencia se correlaciona con el silenciamiento traduccional. En mamíferos, la composición proteica de estas estructuras depende del tipo de célula y del tipo de estímulos de estrés, pero tiene una composición central de factores de iniciación de la traducción (como eIF4E, eIF4A, eIF4G, eIF3 y eIF2), la proteína de unión a poli (A) y proteínas de la subunidad ribosómica pequeña [27, 32]. Los SG parecen funcionar como centros de triaje, desde los que se decide si hay reinicio de la traducción, degradación o almacenaje del mRNA [27].

En un estudio de Kramer *et al.* [31], se analizó la composición de SG inducidos por estrés térmico en *Trypanosoma*, y se pudo comprobar que es parecida a la que encontramos en mamíferos, con proteínas de unión a poli (A) (*TrypPABP1* y *TrypPABP2*) y diferentes factores de inicio de la traducción. Sin embargo, no llegaron a analizar la presencia de proteínas de las subunidades del ribosoma [27, 31]. Tras recuperar

la temperatura normal, los diferentes componentes de los SG recuperan su localización original, sugiriendo que la respuesta a estrés térmico es reversible [31]. Aunque la función de los SG en *Trypanosoma* no es completamente comprendida, su formación podría ser relevante en un contexto de estrés térmico ambiental, evitando una degradación del mRNA masiva. Esta condición permitiría la traducción de las proteínas de choque térmico necesarias para mantener la homeostasis hasta que termine el estrés, o hasta que los parásitos se adapten a las nuevas condiciones de crecimiento [25, 27].

En *Leishmania*, en un estudio de 2019 de Shrivastava *et al.* [33], se analizó mediante espectrometría de masas la composición de SG generados por estrés nutricional. Este proceso se ha asociado con la metacicloogénesis, en la cual se induce la diferenciación de los promastigotes en el insecto a formas infectivas preparadas para la infección del hospedador mamífero. *In vitro*, se puede recrear esta situación al incubar los promastigotes en ausencia de nutrientes (por ejemplo, incubación en PBS o en medio sin purinas). Sometiendo a promastigotes de la especie *L. amazonensis* a estas condiciones, detectaron un enriquecimiento en gránulos que contenían: factores de inicio de la traducción (emplearon eIF4E3 como marcador); múltiples proteínas ribosómicas; proteínas de unión a RNA como PUF1, RNA helicasas, DRBD2 y la proteína de unión a poli-A PABP2; factores de elongación de la traducción; chaperonas moleculares; componentes del citoesqueleto; proteínas nucleares; enzimas metabólicas. También pudieron encontrar el acúmulo de mRNAs maduros. Sin embargo, no encontraron componentes típicos de PB como DHH1, por lo que proponen que estos gránulos son exclusivamente para el almacén de mRNAs, y no para su degradación [33]. Este estudio es de especial relevancia ya que localizan en SG de *L. amazonensis* la proteína PUF1, apoyando que PUF1 es un elemento de los SG en *Leishmania*.

En concordancia con todos estos datos previamente estudiados en *Trypanosoma* y *Leishmania*, hemos podido encontrar múltiples proteínas asociadas a *LmPUF1* que podrían indicarnos su presencia en SG (Tabla 1A):

- **Factores de inicio de la traducción:** subunidad α de eIF2, eIF4A1, eIF4A2, eIF4G4 y diferentes subunidades de eIF3 (eIF3A, eIF3C, eIF3E, eIF3G, eIF3K).
- **Múltiples proteínas de la subunidad pequeña y grande del ribosoma (40S y 60S),** marcadores típicos de SG eucariotas (SA, S3, S4, S14, S18, S20, S23 para la subunidad pequeña, L5, L10a, L21, L7a y L23 de la subunidad grande),

la mayoría encontradas también en el estudio de Shrivastava *et al.* [33] en los SG.

- **Proteínas de unión a RNA:** múltiples RNA helicasas, PUF11, DRBD2 (la proteína ortóloga a *TcDRBD2*, de la que hablaremos más adelante), y PABP3, una isoforma de PABP exclusiva de *Leishmania*, que interacciona de forma directa con PABP2 y cuyas funciones parecen ser redundantes [34].
- **Factores de elongación de la traducción:** EF1 α y EF2.
- **Chaperonas moleculares,** cuya función destacaremos más adelante.
- **Componentes del citoesqueleto:** como ya hemos comentado anteriormente, encontramos una asociación significativa de *LmPUF1* con diferentes componentes del citoesqueleto (α -tubulina, β -tubulina y actina).
- **1 proteína nucleolar:** NOP56, también encontrada en el estudio de Shrivastava *et al.* [33] en los SG de *L. amazonensis*.
- **Múltiples enzimas metabólicas.**

Estas proteínas suponen más de un 70% del total del interactoma de *LmPUF1* (Tabla 2). Todo ello sugeriría que *LmPUF1* es un componente relevante de los SG.

4.2.3. RNA helicasas con caja DEAD presentes en el interactoma de *LmPUF1*.

Las RNA helicasas con caja DEAD no solo participan en la degradación de mRNAs como hemos comentado para DHH1, sino que hay otros miembros con importantes funciones en transcripción, *splicing*, edición del RNA, exportación de RNA, traducción y biogénesis de ribosomas. Esta familia de RNA helicasas es muy abundante en *Leishmania*, habiéndose identificado 28 miembros [21, 35]. En este sentido, además de *LmDHH1*, hemos podido encontrar otros tres miembros de esta familia asociados a *LmPUF1*: DBP2A (LmjF.36.2130), DED1 (LmjF.35.3100), y SUB2 (LmjF.21.1552) (Tabla 1A).

DBP2A también es conocida como HEL64. Existen estudios de su ortóloga en *T. brucei*, *TbHEL64*, que resulta esencial en el ciclo de vida de *T. brucei* durante su fase en el insecto, aunque su función exacta se desconoce [21]. Por ello, será interesante en estudios futuros profundizar en la asociación de *LmPUF1* con esta RNA helicasa de caja DEAD.

Por otro lado, las proteínas DED1 están asociadas con el inicio de la traducción en eucariotas y se han estudiado en *L. amazonensis* [36]. En el genoma de *Leishmania* hay dos parálogos que codifican las proteínas DED1-1 y DED1-2, que tienen función redundante, y muestran una elevada similitud a su ortóloga Ded1 de *S. cerevisiae* [21, 36]. La diferencia entre *LeishDED1-1* y *LeishDED1-2* parece radicar en su expresión diferencial durante el desarrollo del parásito; así, la proteína *LeishDED1-2* es más abundante en promastigotes, siendo casi indetectable en la etapa de amastigote, mientras que la expresión de *LeishDED1-1* aumenta en amastigotes axénicos [36]. DED1 se une al 5'cap de los mRNAs y coopera con el complejo eIF4F facilitando la unión de la subunidad 40S del ribosoma, permitiendo el inicio de la traducción [36]. En un estudio de Hilliker *et al.* [37] en *S. cerevisiae* se demostró que Ded1 funciona tanto en la represión como en la iniciación de la traducción: Ded1 se asocia con el mRNA y el complejo de factores de inicio de la traducción eIF4F, formando un complejo mRNP (mRNAs asociados a proteínas) que se acumula en los SG donde permanece inhibida la traducción. Posteriormente, gracias a su actividad ATPasa, Ded1 permite la liberación de estos mRNPs y reinicio de la traducción de los mRNAs, conduciendo esto a la desaparición de los SG. Para llegar a esta conclusión, observaron que defectos en la actividad ATPasa de versiones mutantes de Ded1 conducían a un acúmulo de SG constitutivos. Además, estos SG contenían en su interior PB, lo cual pudieron determinar al detectar la proteína Edc3, empleada como marcador de PB [37]. Conociendo esto, será interesante llevar a cabo el mismo procedimiento experimental en *Leishmania* con el fin de comprobar si *LeishDED1* mantiene la misma función que su ortóloga en *S. cerevisiae*.

Por último, hemos encontrado una asociación significativa de *LmPUF1* a la RNA helicasa SUB2. Esta proteína forma parte de un complejo implicado en la exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma denominado TREX (*Transcription/Export*), esencial en la conexión entre transcripción y exportación del mRNA [38]. Continuamos profundizando en su asociación a *LmPUF1* en el siguiente punto (4.2.4).

En definitiva, que *LmPUF1* se asocie a múltiples RNA helicasas sugiere su implicación en múltiples pasos del metabolismo del mRNA, debido a la enorme importancia que las RNA helicasas muestran en este aspecto, al participar en transcripción, *splicing*, edición del RNA, transporte nucleocitoplasmático y traducción.

4.2.4. Asociación de *Lm*PUF1 con proteínas implicadas en la maduración y exportación al citoplasma de mRNAs.

A medida que se sintetiza el mRNA, se empaqueta junto con una gran cantidad de proteínas de unión a RNA para formar partículas mRNPs, cuya composición va variando durante la maduración y exportación [38]. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en levaduras, donde se ha determinado que Sub2 (proteína ortóloga en *S. cerevisiae* de *Lm*SUB2) es capaz de reclutar a Mex67-Mtr2, los principales receptores implicados en exportación de mRNAs al citoplasma. Así mismo, SUB2 ha sido estudiada en tripanosomátidos, y se ha determinado que la eliminación del gen *Tc*SUB2 es letal en *T. cruzi*, lo que sugiere que tiene una función esencial. Alternativamente, se realizaron ensayos de interferencia de RNA en *T. brucei* que permitieron demostrar que, además de ser una proteína esencial, su déficit provoca la acumulación de mRNA en el núcleo y la disminución de los niveles de traducción, lo que indica que SUB2 también es un componente de la ruta de la transcripción y exportación de mRNAs en los tripanosomas [39].

Por otro lado, también hemos encontrado una asociación significativa de *Lm*PUF1 con una RBP (codificada por el gen *Lmj*F.35.2200, Tabla 1A) cuya ortóloga en *T. cruzi* es *Tc*DRBD2. En 2019, Wippel *et al.* [40] llevaron a cabo un análisis de homología, que mostró que *Tc*DRBD2 presenta una similitud del 40% a la proteína Gbp2 de *S. cerevisiae* [40], que participa en el control de calidad y exportación de mRNAs, reclutando a la proteína Mex67 [41]. En base a esta homología, los autores hipotetizan que *Tc*DRBD2 participa en la exportación de mRNAs o en su unión tras ser exportados al citoplasma a través de dos dominios RRM (*RNA-recognition motif*) de unión al RNA [40]. Por otro lado, en *S. cerevisiae*, Mitchell *et al.* [19], determinaron que los componentes de la maquinaria de exportación Gbp2 y Mex67, pasan de localizar únicamente en el núcleo en condiciones normales de crecimiento, a formar parte de PB o SG en condiciones de privación de glucosa. Este hecho podría darnos una conexión entre el proceso de exportación de mRNAs y su posterior almacenamiento en RNPs.

Por tanto, resultaría interesante comprobar en estudios futuros si *Lm*PUF1 participa en la exportación de mRNAs al citoplasma, gracias a su capacidad de asociarse a la RNA helicasa SUB2 y la RBP ortóloga a Gbp2 (*Lm*DRBD2), ya que ambas proteínas se han asociado con este proceso.

Además, existen estudios previos que implican a las proteínas PUF en la exportación de mRNAs. En 2013, Pushpa *et al.* [42] propusieron, en el modelo eucariota *C. elegans*, que la proteína PUF8 podría participar en una vía alternativa de exportación para algunos mRNAs específicos a los que se puede unir. Como apoyo de esta hipótesis, observaron que PUF8 colocalizaba con NCBP2, una proteína involucrada en la exportación de mRNAs, así como con el complejo TREX y diferentes componentes del complejo del poro nuclear (NPC, del inglés *Nuclear Pore Complex*). Estos estudios apoyan la hipótesis de que los complejos mRNPs comienzan a formarse en el núcleo, y ahí se determinaría su destino una vez alcanzado el citoplasma [27].

En resumen, hemos podido determinar la unión de *LmPUF1* a proteínas de los PB, SG y también su interacción con componentes implicados en la maduración y exportación de mRNAs al citoplasma. Por ello, *LmPUF1* podría estar participando en múltiples pasos del metabolismo del mRNA en *Leishmania*: procesamiento y exportación al citoplasma, su transporte a PB para su degradación, o su almacén en SG en situaciones de estrés (Fig. 6). Ya se ha determinado previamente en mamíferos, que PUM1 (proteína de la familia PUF) es un elemento central del interactoma de los SG y PB [43], por lo que nuestros hallazgos mostrarían que las proteínas PUF conservan dicha función en eucariotas. Los PB y SG pueden compartir elementos e incluso fusionarse completamente, por lo que, dada la asociación de *LmPUF1* a marcadores de ambos, podemos proponer que es capaz de regular el paso de determinados mRNAs de unas estructuras a otras.

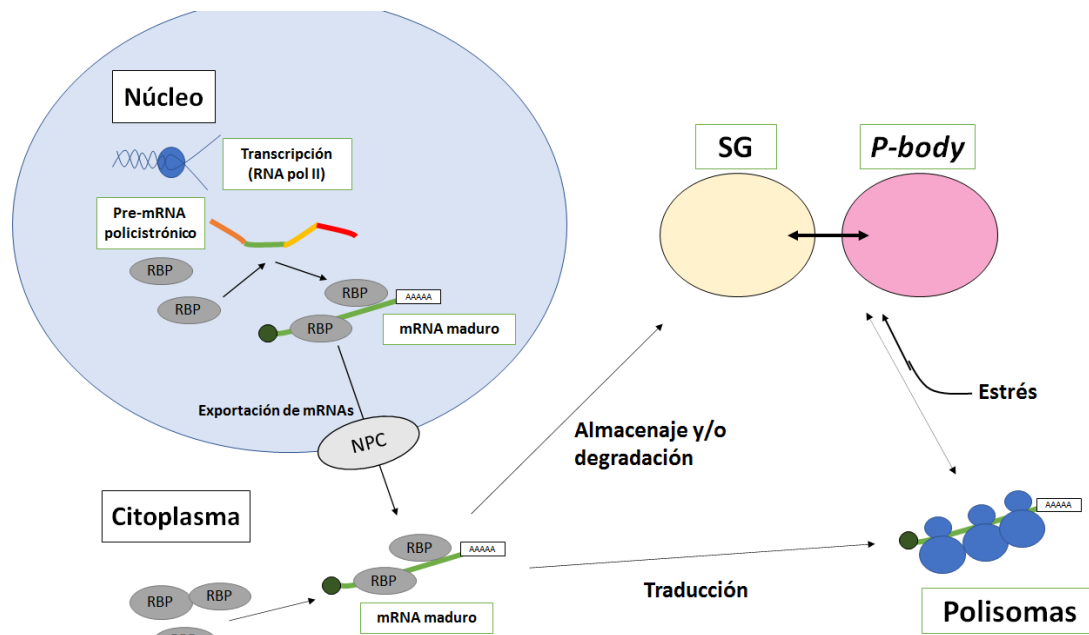


Figura 6. Esquema del metabolismo del mRNA. Las RBPs nucleares interactúan con mRNAs en el momento en el que comienzan a ser transcritos por la RNA polimerasa II y modulan su maduración (por *trans-splicing* y poliadenilación) y los procesos de exportación nuclear. Los mRNAs maduros llegan al citoplasma y las RBPs citoplasmáticas (junto con las que provienen del núcleo) se unen a este complejo y determinan el destino de los mRNAs dirigiéndolos a la maquinaria de traducción (polisomas) o a los gránulos de RNPs para su almacenamiento o degradación. El transporte de mRNAs entre esos destinos depende de estado celular. Cuando se someten a estrés (por ejemplo, en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, cambios de pH y aumento de la temperatura), aparecen gránulos de estrés. Para recuperar la homeostasis celular, las RBPs desempeñan un papel importante en la reorganización de la composición de gránulos de RNPs al cambiar dinámicamente los mRNAs que se dirigirán a la maquinaria de traducción, almacenamiento en SG o que serán degradados en PB.

4.3. Posible interacción de *LmPUF1* con las chaperonas HSP70 y cochaperonas HSP40

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* transita desde un insecto poiquilotérmico (flebotomos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*) a un huésped mamífero. En cada hospedador el parásito adquiere una morfología y características muy diferentes, sufriendo continuos episodios de estrés térmico, oxidativo y nutricional. Por ello, es precisa la activación de mecanismos encargados de mantener una correcta proteostasis. En consecuencia, las chaperonas moleculares van a resultar esenciales en el ciclo de vida de estos parásitos [44]: apoyan el plegamiento de polipéptidos nacientes, evitan la formación de agregados y participan en su disolución, facilitan el replegamiento de péptidos dañados o su eliminación por la maquinaria degradativa y participan en el transporte intracelular de péptidos a través de las distintas localizaciones subcelulares.

En particular, la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70, conservada en los distintos grupos filogenéticos a lo largo de la evolución [45]), tiene un papel esencial en

plegamiento, desagregación de complejos y degradación de proteínas [44]. El destino de muchas proteínas sustrato viene determinado por el conjunto de interacciones entre HSP70 y otras chaperonas y cochaperonas de la célula, actuando HSP70 como un pilar central en este proceso. En *Leishmania* encontramos todos los grupos de HSP70 que componen la familia en eucariotas: HSP70 citosólica, HSP70 del retículo endoplasmático (BiP), HSP70 mitocondrial, y la subfamilia HSP110. Asimismo, contiene dos miembros del grupo GRP170 (GRP170 y HSP70.a), mientras que en humanos solo existe uno. Por otro lado, *Leishmania* posee 3 variantes de HSP70 que no tienen ortólogos en humanos: HSP70.4, HSP70.b y HSP70.c. Sin embargo, no parece existir ninguna proteína ortóloga en *Leishmania* de la proteína humana HSP70-14 [44].

Dentro del grupo de chaperonas asociadas a *Lm*PUF1 en nuestro análisis proteómico, han aparecido las siguientes proteínas (Tabla 1A):

- 3 miembros de la familia HSP70, todos ellos citoplasmáticos:
 - **HSP70:** Existen 6 copias del gen de HSP70 en tándem en el genoma de *Leishmania*. Las 5 primeras copias son idénticas, y codifican para HSP70-I, que se asocia a los ribosomas en condiciones fisiológicas normales. El sexto gen codifica HSP70-II (presenta cambios en el 3'-UTR) que se traduce específicamente durante situaciones de estrés térmico. La importancia del gen HSP70-II en el ciclo de vida de *Leishmania* se demostró con la delección de dicho gen en promastigotes, los cuales mostraron muchas alteraciones celulares y bioquímicas, junto con una virulencia muy reducida [44].
 - **HSP70.4:** muestra una localización citoplasmática en *Leishmania*, agrupándose en análisis filogenéticos con HSP70s citoplasmáticas [44].
 - **HSP110:** La función de la chaperona HSP110 no es bien conocida. Se demostró que HSP110 de mamíferos y su ortóloga Sse1 de levaduras interactúan funcional y físicamente con HSP70 prototípicos, actuando como potentes factores de intercambio de nucleótidos (NEFs) para HSP70 (Fig. 7) [44, 46].
- 2 miembros de la familia de cochaperonas HSP40, proteínas con dominio DnaJ, que actúan como cochaperonas aportando el sustrato a HSP70 [44] (Fig. 7): JDP2 y JDP66.

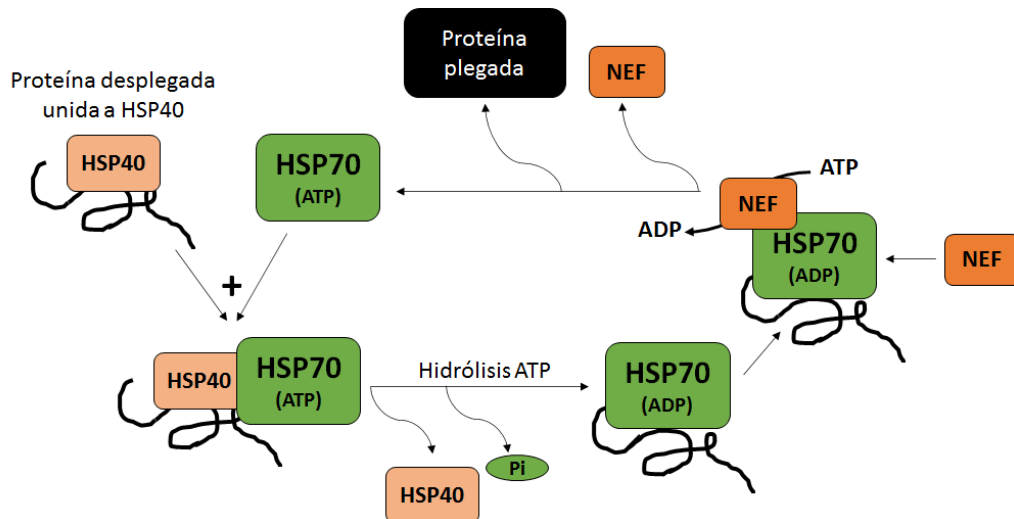


Figura 7. Resumen del ciclo funcional de HSP70. En primer lugar, una proteína desplegada unida a HSP40, forma un complejo con HSP70 en la forma unida a ATP. La hidrólisis de ATP promueve la transferencia del sustrato a HSP70. Tras esta transferencia, HSP40 se libera del complejo, y se recluta el factor de intercambio de nucleótidos HSP110 (NEF) que estimula el intercambio de ADP por ATP. Entonces, la unión de ATP induce un cambio conformacional que conduce a la liberación del NEF y del sustrato ya correctamente plegado.

Bentley *et al.* [47] demostraron en un estudio reciente en *T. brucei* la importancia de la asociación entre *TbJDP2* (HSP40) con las proteínas *TbHSP70* y *TbHSP70.4* (HSP70s), todas ellas ortólogas a las que nosotros hemos encontrado asociadas a *LmPUF1*. Las actividades ATPasa basales de *TbHSP70.4* y *TbHSP70* resultan estimuladas por *TbJDP2*. Estos autores determinaron además que *TbJDP2* cooperaba funcionalmente con *TbHSP70* y *TbHSP70.4*, ya que estimula la capacidad de ambas proteínas para mediar el replegamiento de la β -galactosidasa químicamente desnaturalizada [47]. Por tanto, conociendo la asociación de *LmPUF1* a este complejo funcional formado por *LmHSP70*, *LmHSP70.4* y *LmJDP2*, sería interesante profundizar en el papel de *LmPUF1* en dicha asociación.

Otra función de las HSP70 es la de degradación de proteínas sustrato desplegadas o mal plegadas. Entre las diferentes vías de degradación, cabe destacar el sistema ubiquitina-proteasoma asistido por chaperonas. En este sistema, la ubiquitina ligasa se asocia al C-terminal de HSP70, favoreciéndose la ubiquitinación de las proteínas sustrato unidas a la chaperona que podrán ser degradadas por el proteasoma [48]. Hemos encontrado una asociación significativa ($p = 0,00195$) de *LmPUF1* a una enzima E1 activadora de ubiquitina (*LmjF.35.3060*), pudiendo sugerir la existencia de una conexión entre *LmPUF1* y el sistema ubiquitina-proteasoma asistido por chaperonas. Sin embargo, además de su conocida función en la degradación de proteínas, la ubiquitinación de proteínas también actúa como un mecanismo que controla la localización y función de

proteínas. Un ejemplo de esto lo encontramos en el estudio de Bhandari *et al.* [49], donde determinan que la ubiquitinación de la proteína *LdCSBP* (*L. donovani* CSBP) disminuye su actividad ribonucleasa, implicada en la degradación de mRNAs. En general, la ubiquitinación regula una amplia gama de actividades celulares, incluido el tráfico vesicular, el control del ciclo celular, la respuesta al estrés, la reparación y señalización del DNA [50]. Debido a esto, será interesante determinar en estudios futuros el posible papel que puede ejercer la asociación de la enzima E1 activadora de ubiquitina a *LmPUF1*.

Por otro lado, en un estudio realizado por Walters *et al.* [51] en el modelo eucariota *S. cerevisiae*, determinaron que la chaperona Hsp70 junto con las cochaperonas de la familia Hsp40 participaban en la dinámica de los SG y PB. Observaron que Hsp70, y dos Hsp40 denominadas Ydj1 y Sis1, se acumulaban en los SG, y que el defecto en estas proteínas conduce a una disminución en el aclaramiento de los SG, por lo que la célula no recupera su fisiología normal. Determinaron que Hsp70 y Hsp40 participan en la liberación de mRNAs cuya traducción se encuentra reprimida en los SG, y, por lo tanto, restauran la traducción, lo que lleva a la desaparición de los SG [51]. Esto es apoyado por la observación de que una sobreexpresión de HSP70 en células de mamíferos reduce la inducción de SG por inhibidores del proteasoma [52]. Por tanto, HSP70 y HSP40 podrían cooperar para alterar la conformación y/o interacciones de componentes específicos de los SG, pudiendo permitir la restauración de la actividad traduccional.

Anteriormente hemos tratado en profundidad los SG, debido a la asociación de *LmPUF1* a diferentes elementos encontrados en estas estructuras que se desarrollan en situaciones de estrés para almacenar mRNAs no traducidos hasta recuperar la homeostasis celular. Resulta interesante profundizar en el posible papel de las chaperonas moleculares en estas estructuras, debido a su capacidad de eliminar agregados y proteínas alteradas, así como favorecer el plegamiento correcto de las mismas.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Las RBPs son componentes fundamentales en la regulación postranscripcional de la expresión génica, modulando la estabilidad, traducción y degradación de los diferentes mRNAs. En *Leishmania* las RBPs son especialmente importantes, ya que carece de una regulación a nivel transcripcional. Sus ciclos de vida estresantes, alternando entre hospedadores mamíferos e insectos, con cambios continuos de temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes, requieren de una regulación muy rápida, que les permita

adaptar su proteoma. Esto lo consiguen a través de una regulación postranscripcional. Dentro del enorme repertorio de RBPs, encontramos las proteínas PUF, con 10 miembros dentro de los tripanosomátidos [5, 8, 9]. Con el fin de conocer mejor la familia de proteínas PUF en *Leishmania*, hemos profundizado en el papel de la proteína *LmPUF1* en la regulación postranscripcional mediante el estudio de su interactoma proteico (por RP-LC-MS/MS) y la búsqueda bibliográfica de estudios sobre la función de las proteínas encontradas. Hemos podido determinar que *LmPUF1* se asocia de forma significativa a 90 proteínas diferentes, y entre ellas hemos identificado proteínas que forman parte de RNPs como *P-bodies* (PB), gránulos de estrés (SG) y de la maquinaria de exportación de mRNAs al citoplasma. Por otro lado, hemos podido describir una asociación significativa de *LmPUF1* con chaperonas de la familia HSP70 y cochaperonas de la familia HSP40, las cuales colaboran para mantener la proteostasis al facilitar el plegamiento, desagregación y degradación de proteínas.

Esta variedad de interacciones sugiere que *LmPUF1* participa en múltiples pasos de la regulación postranscripcional en *Leishmania*: procesamiento y exportación de mRNAs al citoplasma, su transporte a PB para su degradación o su almacenaje en SG en situaciones de estrés, regulando la interacción entre ambos RNPs y por tanto determinando el destino de los mRNAs. Además, conocemos que HSP70 y HSP40 participan en el aclaramiento de los SG en *S. cerevisiae*, por lo que la interacción de estas con *LmPUF1*, sugiere un papel de *LmPUF1* como señuelo para reclutar a chaperonas y cochaperonas a los SG y favorecer la recuperación de la homeostasis proteica. Teniendo en cuenta las interacciones observadas en este estudio hemos podido validar nuestra hipótesis inicial, pero será esencial a modo de perspectivas futuras poder confirmar la relevancia funcional de lo que hemos observado, y para ello se podrían plantear los siguientes abordajes experimentales:

- Estudios de inmunofluorescencia con *LmPUF1* fusionada a una proteína fluorescente (por ejemplo, *LmPUF1*-GFP), y a continuación, inducir estrés nutricional (cultivo en PBS) y/o térmico, para ver si *LmPUF1* colocaliza con marcadores de SG y PB. Posteriormente, sería interesante hacer un *Knock-Out* (KO) de *LmPUF1* y analizar si se producen cambios en abundancia y localización de SG y PB, con el fin de determinar si *LmPUF1* es esencial en la generación de estos RNPs.

- Análisis del posible papel de *LmPUF1* en la exportación de mRNAs al citoplasma, mediante la determinación de cambios en la distribución o una acumulación en el núcleo de determinados mRNAs en promastigotes KO-*LmPUF1*. En concreto, este análisis se realizaría mediante RNAseq sobre muestras de promastigotes KO-*LmPUF1* y promastigotes WT, con el fin de determinar la especificidad de mRNAs asociados a *LmPUF1*.
- Para confirmar la interacción de *LmPUF1* con HSP70 y HSP40, planteamos la expresión como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* M15. La asociación de *LmPUF1* a un tag nos permitiría purificarla y confirmar su asociación *in vitro* a HSP70-HSP40. Además, nos proponemos determinar *in vitro* la importancia de esta asociación mediante estudios sobre parámetros como la supresión de la agregación, actividad ATPasa y actividad de plegamiento de proteínas desplegadas mediada por HSP70 y HSP40, y comprobar cómo serían afectados por la presencia de *LmPUF1* en el ensayo.
- Por último, el tratamiento con RNAsa previo a una co-inmunoprecipitación con anti-*LmPUF1*, nos permitiría determinar si las interacciones detectadas en el estudio aquí presentado son dependientes de puentes de RNA o si son interacciones directas proteína-proteína.

6. REFERENCIAS.

- [1] Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(3):e0004349.
- [2] Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med.* 2015; 3(2):43-50.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention. CDC - DPDx – Leishmaniasis [Internet]. 2019; [Consultado 18 Mar 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
- [4] Requena JM. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011; 16:2069-2085.
- [5] Fernández-Moya SM, Estévez AM. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010; 1(1):34-46.
- [6] Nandan D, Thomas SA, Nguyen A, Moon K, Foster LJ, Reiner NE. Comprehensive identification of mRNA-binding proteins of *Leishmania donovani* by interactome capture. *PLoS One.* 2017; 12(1):e0170068.

- [7] Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(7):533-543.
- [8] Folgueira C, Martínez-Bonet M, Requena JM. The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. *BMC Res Notes.* 2010; 3:13.
- [9] Quenault T, Lithgow T, Traven A. PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol.* 2011; 21(2):104-112.
- [10] Qiu C, Dutcher RC, Porter DF, Arava Y, Wickens M, Hall TMT. Distinct RNA-binding modules in a single PUF protein cooperate to determine RNA specificity. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(16):8770-8784.
- [11] Wang M, Ogé L, Perez-Garcia MD, Hamama L, Sakr S. The PUF protein family: overview on PUF RNA targets, biological functions, and post transcriptional regulation. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(2):410.
- [12] Sonoda J, Wharton RP. Recruitment of Nanos to *hunchback* mRNA by Pumilio. *Genes Dev.* 1999; 13(20):2704-2712.
- [13] Cooke A, Prigge A, Opperman L, Wickens M. Targeted translational regulation using the PUF protein family scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(38):15870-15875.
- [14] Azizi H, Dumas C, Papadopoulou B. The Pumilio-domain protein PUF6 contributes to SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay in *Leishmania*. *RNA.* 2017; 23(12):1874-1885.
- [15] González-de la Fuente S, Peiró-Pastor R, Rastrojo A, Moreno J, Carrasco-Ramiro F, Requena JM, *et al.* Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs. *Sci Rep.* 2017; 7(1):18050.
- [16] Alves LR, Goldenberg S. RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa. *World J Biol Chem.* 2016; 7(1):78-87.
- [17] Kramer S. RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014; 5(2):263-284.
- [18] Lee SI, Dudley AM, Drubin D, Silver PA, Krogan NJ, Pe'er D, *et al.* Learning a Prior on Regulatory Potential from eQTL Data. *PLoS Genet.* 2009; 5(1):e1000358
- [19] Mitchell SF, Jain S, She M, Parker R. Global Analysis of Yeast mRNPs. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20(1):127-133.
- [20] Mugler CF, Hondele M, Heinrich S, Sachdev R, Vallotton P, Koek AY, *et al.* ATPase activity of the DEAD-box protein Dhh1 controls processing body formation. *Elife.* 2016; 5:e18746.
- [21] Marchat LA, Arzola-Rodríguez SI, Hernandez-de la Cruz O, Lopez-Rosas I, Lopez-Camarillo C. DEAD/DExH-Box RNA helicases in selected human parasites. *Korean J Parasitol.* 2015; 53(5):583-595.
- [22] Luo Y, Na Z, Slavoff SA. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry.* 2018; 57(17):2424-2431.
- [23] Guzikowski AR, Chen YS, Zid BM. Stress-induced mRNP granules: form and function of processing bodies and stress granules. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2019; 10(3):e1524.
- [24] Dallagiovanna B, Correa A, Probst CM, Holetz FB, Smircich P, de Aguiar AM, *et al.* Functional genomic characterization of mRNAs associated with *Tc*PUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2008; 283(13):8266-8273.

- [25] Romagnoli BAA, Holetz FB, Alves LR, Goldenberg S. RNA binding proteins and gene expression regulation in *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10:56.
- [26] Holetz FB, Alves LR, Probst CM, Dallagiovanna B, Marchini FK, Manque P, *et al*. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J*. 2010; 277(16):3415-3426.
- [27] Cassola A. RNA granules living a post-transcriptional life: the trypanosomes' case. *Curr Chem Biol*. 2011; 5(2):108-117.
- [28] Kramer S. The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. *PLoS Pathog*. 2017; 13(6):e1006456.
- [29] Perry KL, Watkins KP, Agabian N. Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(23):8190-8194.
- [30] Aizer A, Brody Y, Ler LW, Sonenberg N, Singer RH, Shav-Tal Y. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(10):4154-4166.
- [31] Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Webb H, Hoheisel JD, Clayton C, *et al*. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. *J Cell Sci*. 2008; 121(Pt 18):3002-3014.
- [32] Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 284(2):C273-C284.
- [33] Shrivastava R, Drory-Retwitzer M, Shapira M. Nutritional stress targets LeishIF4E-3 to storage granules that contain RNA and ribosome components in *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(3):e0007237.
- [34] da Costa Lima TD, Moura DM, Reis CR, Vasconcelos JR, Ellis L, Carrington M, *et al*. Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryotic Cell*. 2010; 9(10):1484-1494.
- [35] Gargantini PR, Lujan HD, Pereira CA. In silico analysis of trypanosomatids' helicases. *FEMS Microbiol Lett*. 2012; 335(2):123-129.
- [36] Zinoviev A, Akum Y, Yahav T, Shapira M. Gene duplication in trypanosomatids - two DED1 paralogs are functionally redundant and differentially expressed during the life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 185(2):127-136.
- [37] Hilliker A, Gao Z, Jankowsky E, Parker R. The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex. *Mol Cell*. 2011; 43(6):962-972.
- [38] Xie Y, Ren Y. Mechanisms of nuclear mRNA export: A structural perspective. *Traffic*. 2019; 20(11):829-840.
- [39] Serpeloni M, Moraes CB, Muniz JR, Motta MC, Ramos AS, Kessler RL, *et al*. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. *PLoS One*. 2011; 6(6):e20730.
- [40] Wippel HH, Malgarin JS, Inoue AH, Leprevost FDV, Carvalho PC, Goldenberg S, *et al*. Unveiling the partners of the DRBD2-mRNP complex, an RBP in *Trypanosoma cruzi* and ortholog to the yeast SR-protein Gbp2. *BMC Microbiol*. 2019; 19(1):128.

- [41] Hackmann A, Wu H, Schneider UM, Meyer K, Jung K, Krebber H. Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. *Nat Commun.* 2014; 5:3123.
- [42] Pushpa K, Kumar GA, Subramaniam K. PUF-8 and TCER-1 are essential for normal levels of multiple mRNAs in the *C. elegans* germline. *Development.* 2013; 140(6):1312-1320.
- [43] Guzikowski AR, Chen YS, Zid BM. Stress-induced mRNP granules: form and function of P-bodies and stress granules. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2019; 10(3):e1524.
- [44] Requena JM, Montalvo AM, Fraga J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central players in many stress-related and -unrelated physiological processes. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:301326.
- [45] Gupta RS. Protein phylogenies and signature sequences: evolutionary relationships within prokaryotes and between prokaryotes and eukaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1997; 72(1):49–61
- [46] Shaner L, Morano KA. All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperon.* 2007; 12(1):1-8.
- [47] Bentley SJ, Boshoff A. *Trypanosoma brucei* J-Protein 2 functionally co-operates with the cytosolic Hsp70 and Hsp70.4 proteins. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(23):5843.
- [48] Lüders J, Demand J, Höhfeld J. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem.* 2000; 275(7):4613-4617.
- [49] Bhandari D, Guha K, Bhaduri N, Saha P. Ubiquitination of mRNA cycling sequence binding protein from *Leishmania donovani* (LdCSBP) modulates the RNA endonuclease activity of its Smr domain. *FEBS Letters.* 2011; 585(5):809-813.
- [50] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 2007; 315(5809):201-205.
- [51] Walters RW, Muhlrud D, Garcia J, Parker R. Differential effects of Ydj1 and Sis1 on Hsp70-mediated clearance of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 2015; 21(9):1660-1671.
- [52] Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(7):2603-2618.

7. APÉNDICE

Tabla 1A. Relación de proteínas identificadas en el análisis proteómico que se encontraban asociadas a *LmPUF1* de forma estadísticamente significativa. En la primera columna se indica el nombre de la proteína. En la segunda columna, el código del gen codificante para la proteína en *L. major*. En la tercera columna, su gen ortólogo en *L. infantum*, con cuyo código se puede acceder a información complementaria en la plataforma Wikidata.org. En la cuarta columna encontramos el valor de probabilidad (*p*) de la hipótesis nula (falta de asociación significativa). Este valor de probabilidad se ha determinado mediante el método estadístico de distribución binomial. En la quinta columna se indica el grupo funcional asignado a cada proteína.

Nombre de la proteína	Gen en <i>Leishmania major</i>	Gen en <i>Leishmania infantum</i>	(<i>p</i>)	Función celular
Treonil-tRNA sintetasa	LMJF.35.1410	LINF_350019000	0,015625	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal L5 (subunidad 60S)	LMJF.35.1880/LMJF.35.1890	LINF_350023 700/800/900	0,03125	Biosíntesis de proteínas

Factor de iniciación eucariótico 4A-1 eIF4A1	LMJF.01.0770	LINF_010012800	0,000488281	Biosíntesis de proteínas
Subunidad c del factor eucariótico 3 de iniciación de la traducción eIF3c	LMJF.36.6980	LINF_360081900	0,000488281	Biosíntesis de proteínas
Factor eucariótico de inicio de traducción 4 gamma eIF4G4	LMJF.36.6060	LINF_360070500	0,00390625	Biosíntesis de proteínas
Subunidad G del factor eucariótico 3 de inicio de la traducción eIF3G	LMJF.34.2700	LINF_340033000	0,015625	Biosíntesis de proteínas
Asparaginil-tRNA sintetasa	LMJF.34.2340	LINF_340028800	0,001953125	Biosíntesis de proteínas
Subunidad E del factor eucariótico 3 de inicio de la traducción eIF3E	LMJF.28.2310	LINF_280029900	0,0078125	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal S20	LMJF.28.1010	LINF_280015700	0,015625	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal S23 (subunidad 40S)	LMJF.21.1060	LINF_210018200	0,03125	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal L10a (subunidad 60S)	LMJF.18.0620	LINF_180011500	0,03125	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal L21 (subunidad 60S)	LMJF.16.0460	LINF_160009700	0,0078125	Biosíntesis de proteínas
Seril-tRNA sintetasa	LMJF.11.0100	LINF_110005900	0,0078125	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal L7a (subunidad 60S)	LMJF.07.0500	LINF_070010500	0,03125	Biosíntesis de proteínas
Subunidad alfa del factor 2 de iniciación eucariótico eIF2 α	LMJF.03.0980	LINF_030014900	0,000438724	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal L23 (subunidad 60S)	LMJF.35.3790/LMJF.35.3800	LINF_350043 300/400	0,026	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal SA (subunidad 40S)	LMJF.36.5010	LINF_360059600	0,024513245	Biosíntesis de proteínas
Subunidad I del factor eucariótico de inicio de la traducción 3 eIF3I	LMJF.36.3880	LINF_360047700	0,014435649	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal S18 (subunidad 40S)	LMJF.36.0930/LMJF.36.0940	LINF_360015 200/100	0,017311811	Biosíntesis de proteínas
Factor de elongación 2 EF2	LMJF.36.0180	LINF_360006800	0,001246557	Biosíntesis de proteínas
Factor de iniciación de la traducción 2 IF-2	LMJF.33.2740	LINF_330036700	0,032714844	Biosíntesis de proteínas
Subunidad K del factor de iniciación 3 eucariótico eIF3K	LMJF.32.2180	LINF_320028100	0,032714844	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosómica S14 (subunidad 40S)	LMJF.28.0960	LINF_280015200	0,011309981	Biosíntesis de proteínas
Factor de elongación 1 alfa EF1 α	LMJF.17.0082	LINF_170006100	0,009	Biosíntesis de proteínas
Subunidad A del factor de iniciación 3 eucariótico eIF3A	LMJF.17.0010	LINF_170005000	0,005	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosomal S4 (subunidad 40S)	LMJF.13.1220	LINF_130017200	0,007	Biosíntesis de proteínas
Proteína ribosómica S3 (subunidad 40S)	LMJF.15.0950	LINF_150017600	0,039066315	Biosíntesis de proteínas
Factor eucariótico de iniciación de la traducción 4A2 eIF4A2 RNA helicasa FAL1	LMJF.28.1530	LINF_280021300	0,015625	Biosíntesis de proteínas
Proteína de choque térmico 78 HSP78	LMJF.02.0710	LINF_020012400	0,0078125	Chaperona molecular
Miembro mitocondrial de la familia HSP90 TRAP-1 HSP75	LMJF.33.2390	LINF_330033000	0,015625	Chaperona molecular
HSP70 mitocondrial mtHSP70 HSPA9B	LMJF.30.2460	LINF_300030000	0,03125	Chaperona molecular
proteína de choque térmico 110 HSP110	LMJF.18.1370	LINF_180019100	4,76837E-07	Chaperona molecular
Proteína con dominio DnaJ JDP2 J2	LMJF.27.2400	LINF_270032200	0,011230469	Chaperona molecular
Proteína de choque térmico de 100 kDa HSP100 ATPasa de la familia AAA+	LMJF.29.1270	LINF_290018600	0,015441895	Chaperona molecular
Subunidad theta de la proteína 1 del complejo T	LMJF.36.6910	LINF_360081100	0,000266746	Chaperona molecular
Proteína de choque térmico 70 kDa HSP70	LMJF.28.2770	LINF_280035000	0,0008	Chaperona molecular
Proteína de la familia de choque térmico 70 HSP70.4	LMJF.26.1240	LINF_260017400	4,21517E-06	Chaperona molecular
Proteína 1 del complejo T, subunidad gamma TCP1g	LMJF.23.1220	LINF_230021100	0,000658663	Chaperona molecular
Proteína con dominio DnaJ JDP66 J66	LMJF.22.0080	LINF_220005800	0,032714844	Chaperona molecular
Proteína pumilio 11 PUF11	LMJF.36.5100	LINF_360060500	2,38419E-07	Proteína de unión a RNA
Proteína 1 de la familia Pumilio PUF1	LMJF.36.0050	LINF_360005400	1,0842E-19	Proteína de unión a RNA
Proteína de unión a RNA – putativa	LMJF.35.2200	LINF_350027200	0,032026046	Proteína de unión a RNA
RNA helicasa con caja DEAD DBP2A	LMJF.36.2130	LINF_360028400	0,015625	Proteína de unión a RNA
RNA helicasa con caja DEAD dependiente de ATP DHH1	LMJF.35.0370	LINF_350008800	0,03	Proteína de unión a RNA
RNA helicasa con caja DEAD dependiente de ATP DED1	LMJF.35.3100	LINF_350036300	0,04	Proteína de unión a RNA
RNA helicasa con caja DEAD dependiente de ATP SUB2	LMJF.21.1552	LINF_210024300	0,006469727	Proteína de unión a RNA
Proteína 3 de unión a poli-A PABP3	LMJF.25.0080	LINF_250005800	0,028686523	Proteína de unión a RNA

Proteína nucleolar 56 NOP56	LMJF.10.0210	LINF_100007300	6,10352E-05	Proteína de unión a RNA
Proteína de la membrana glicosomal Gim5A	LMJF.35.3700	LINF_350042400	0,001953125	Proteína del glicosoma
Proteína de membrana glicosomal PEX11	LMJF.28.2260	LINF_280029400	0,0078125	Proteína del glicosoma
Malato deshidrogenasa glicosomal	LMJF.19.0710	LINF_190012000	0,015625	Proteína del glicosoma
Orotidina-5-fosfato descarboxilasa orotato fosforribosiltransferasa	LMJF.16.0550	LINF_160010700	0,003	Proteína del glicosoma
Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa ALD	LMJF.36.1260	LINF_360018400	0,000364304	Proteína del glicosoma
Piruvato fosfato dikinasa	LMJF.11.1000	LINF_110016000	0,000244141	Proteína del glicosoma
Subunidad beta de la ATP sintetasa mitocondrial	LMJF.25.1170/LMJF.25.1180	LINF_25001 8000/7900	0,0078125	Síntesis de ATP
ATP sintetasa F1 - subunidad alfa	LMJF.05.0500	LINF_050010000	0,014	Síntesis de ATP
Enzima E1 activadora de ubiquitina	LMJF.35.3060	LINF_350035900	0,001953125	Modificación postraduccional de proteínas
Serina/treonina kinasa	LMJF.07.0900	LINF_070015200	0,00390625	Modificación postraduccional de proteínas
Factor de ADP-ribosilación ARF1	LMJF.31.2280	LINF_310031000	0,0078125	Modificación postraduccional de proteínas
Serina/treonina kinasa	LMJF.36.1520	LINF_360021400	0,011230469	Modificación postraduccional de proteínas
Subunidad beta-1 de la importina	LMJF.34.0490	LINF_340010100	0,015625	Transporte núcleo-citoplasmático
ATOM46 Traslocasa de membrana mitocondrial externa	LMJF.28.0930	LINF_280014900	0,001953125	Transporte mitocondrial
ATP/ADP traslocasa ANC1 MCP5a	LMJF.19.0200	LINF_190006800	0,026	Transporte mitocondrial
Cadena pesada de la clatrina	LMJF.36.1630	LINF_360022600	6,54254E-08	Endocitosis
GTPasa pequeña similar a ras Sar1	LMJF.05.0030	LINF_050005200	0,0078125	Transporte vesicular
Cistein peptidasa - clan CA - familia C2	LMJF.20.1180/ LMJF.20.1185	LINF_200016 800/900	0,03125	Proteostasis
Subunidad ATPasa de proteasa dependiente de ATP HsIU1	LMJF.15.0090	LINF_150005800	0,00012207	Proteostasis
Actina	LMJF.04.1230	LINF_040017600	0,01543808	Citoesqueleto
Alfa tubulina	LMJF.13.0280	LINF_130007700	0,03	Citoesqueleto
Beta tubulina	LMJF.21.1860	LINF_210028500	0,0000065	Citoesqueleto
Cadena beta de la tubulina	LMJF.33.0792	LINF_330015000	0,000411385	Citoesqueleto
Aspartato aminotransferasa	LMJF.35.0820	LINF_350012900	0,000244141	Otras funciones
Cadena beta de la succinil-CoA ligasa	LMJF.36.2950	LINF_360037500	0,00012207	Otras funciones
Tirosina aminotransferasa	LMJF.36.2360	LINF_360030700	0,015625	Otras funciones
1-2-Dihidroxi-3-ceto-5-metilpiopenteno dioxigenasa	LMJF.34.4600	LINF_340052200	0,03125	Otras funciones
Fosfoglicerato kinasa con dominio PAS PAS-PGK	LMJF.30.3380	LINF_300039500	0,03125	Otras funciones
Subunidad de la pantotenato kinasa	LMJF.28.0140	LINF_280006300	3,05176E-05	Otras funciones
Prolina deshidrogenasa PRODH	LMJF.26.1610	LINF_260021100	3,8147E-06	Otras funciones
Subunidad alfa de la succinil-CoA sintetasa	LMJF.25.2130	LINF_250028300	0,001953125	Otras funciones
Proteína similar a 4-cumarato:CoA ligasa 4CLL	LMJF.19.0985/ LMJF.19.0995	LINF_190015 200/100	0,0078125	Otras funciones
CoA ligasa de ácido graso de cadena larga-putativa	LMJF.03.0230	LINF_030007100	0,028686523	Otras funciones
3-2-trans-enoil-CoA isomerasa teCi.2	LMJF.31.2250	LINF_310030700	0,011230469	Otras funciones
S-adenosilmetionina sintetasa	LMJF.30.3500	LINF_300040800	0,002090454	Otras funciones
Glutamato deshidrogenasa	LMJF.15.1010	LINF_150018300	0,03	Otras funciones
Isocitrato deshidrogenasa [NADP]	LMJF.10.0290	LINF_100008300	0,001288414	Otras funciones
Peroxidoxina Triparredoxina peroxidasa mTXNPx PRX1M	LMJF.23.0040	LINF_230005400	0,0078125	Otras funciones
H+ - ATPasa tipo P H1A-1	LMJF.18.1510	LINF_180020 600/700	3,05176E-05	Otras funciones
H+ - ATPasa tipo P H1A-2	LMJF.18.1520	LINF_180020800	3,05176E-05	Otras funciones
Proteína miristoilada pequeña 1 SMP1	LMJF.20.1310	LINF_200018300	0,015625	Otras funciones

Proteína con repeticiones ankirina TPR	LMJF.24.0140	LINF_240006100	0,03125	Otras funciones
Proteína hipotética, sin función conocida	LMJF.24.1560	LINF_240021100	0,000488281	Otras funciones