Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Clonado y caracterización de quinasas relacionadas con la CDC2 en el parásito Trypanosoma cruzi

Gómez, Eliana Beatriz

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Gómez, Eliana Beatriz. (1999). Clonado y caracterización de quinasas relacionadas con la CDC2 en el parásito Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3128_Gomez.pdf

Cita tipo Chicago:
Gómez, Eliana Beatriz. "Clonado y caracterización de quinasas relacionadas con la CDC2 en el parásito Trypanosoma cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3128_Gomez.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Clonado y caracterización de quinasas relacionadas con la CDC2 en el parásito *Trypanosoma cruzi*

Autora: Eliana Beatriz Gómez.

Directora: Dra. María Teresa Téllez-Iñón.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

1999

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Thesis in fulfilment of the degree of Doctor of the University of Buenos Aires

Cloning and characterization of CDC2 related protein kinases from the parasite *Trypanosoma cruzi*

Author: Eliana Beatriz Gómez.

Director: Dra. María Teresa Téllez-Iñón.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.

1999

Cloning and characterization of CDC2 related protein kinases from the parasite *Trypanosoma cruzi.*

Two CDC2-related protein kinase genes (crk), tzcrk3 and tzcrk1, were cloned from the parasite *Trypanosoma cruzi*. Recombinant proteins were used to raise specific antisera. Antibodies anti-TzCRK1 recognized a protein of 33 kDa in the three forms of the parasite. This antiserum showed that TzCRK1 is localized in the cytosol, kinetoplast and nucleus, and is constitutively expressed though the cell cycle. Purified antiTzCRK1 IgGs, immunoprecipitated a kinase activity which phosphorylated histone H1 and Rb. The recombinant GST-TzCRK1 had high *in vitro* kinase activity in the absense of regulatory proteins. CDC2 and CDK2 specific inhibitors could not abolish the TzCRK1 kinase activity. Transfection of COS-7 cells with tzcrk1 demonstrated for the first time that a CRK protein can bind mammalian cyclins; TzCRK1 co-immunoprecipitated with cyclins E, D3 and A suggesting a role for this kinase in cell cycle control. The TzCRK3 antisera recognized a 40 kDa protein in membrane and nuclear fractions and a 54 kDa protein in the citosolic fraction. The p13SUC1 protein coprecipitated a kinase activity from the citosol of the epimatigote stage. Yeast complementation assays showed that these *T. cruzi* CRKs, could not rescue the yeast CDC28 function.

The two hybrid system was used to identify and clone proteins that associate to TzCRK1. Three clones were identified, which code for proteins with identity to cyclins from the PREG and PHO80 family. In other organisms, these cyclin like proteins are involved in the control of phosphate metabolism. In *S. cerevisiae*, PHO80 binds to the CDK protein PHO85, which controls the transcription of the acid phosphatase gene and participates in the regulation of the cell cycle. These results suggest that TzCRK1 could be involved in cell cycle progression and/or in other processes such as phosphate metabolism.

AGRADECIMIENTOS.

A mi directora de tesis, la Dra. María Teresa Téllez-Iñón, por haber confiado en mi y por haberme brindado su apoyo en todo momento.

A Isa y Marcelita por los buenos momentos pasados en el laboratorio. A Isa por haberme ayudado en la escritura de esta tesis.

A los chicos del laboratorio: Rita, Gaby, Paula, Gustavo Mac y Jose.

A Claudia Ochatt y Sandra Ogueta por hacerse cargo del paquete apenas entre en el INGEBI.

A Alberto Kornblihtt por haberme iniciado en la Biología Molecular.

A Santiago Werbajh y Marcelo Cerdán por haberme aguantado durante mi aprendizaje de técnicas de laboratorio.

A la Bqca. Berta Cazzulo por haberme dado la mayoría de las muestras de parásitos utilizadas en esta tesis.

Al Dr. Silvio Gutkind, por haberme recibido en su laboratorio y permitirme realizar algunos experimentos incluidos en esta tesis.

Al Dr. John Swindle, por haberme abierto las puertas de su laboratorio para que pueda estar junto con Joaquín y por haberme mostrado otras facetas de la ciencia.

Al Dr. Gregory Hannon, por convencerme de empezar con el clonado de las CRKs, y por habernos donado, sin condición alguna, varios de los materiales utilizados.

Al CONICET por haberme otorgado las sucesivas becas que hicieron posible esta tesis.

A todos aquellos que respondieron a mis preguntas, que me dieron protocolos, que me prestaron material (aún sin saberlo), que no me aguantaron en mis días de mal humor, que me cebaron mate, que me convidaron alimento en los momentos necesarios, que organizaron los happy hour, que me prestaron las computadoras, impresoras, etc., etc. etc.

A Malarini por escucharme siempre y por los tangos compartidos.

A Mari, Leonor, Francisco y Tito, aunque ya no este, por que sin ellos nuestro día a día sería imposible.

A mi mamá por haber estado siempre a mi lado y haber subsidiado a la ciencia argentina.

A mi papá porque me alentó cuando decidí estudiar biología y haberme apoyado siempre.

A Joaquín por todo.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS. **1**

OBJETIVOS. **3**

OBJETIVO GENERAL. 3

OBJETIVO PRIMARIO. 3

INTRODUCCIÓN. **4**

EL PROTOZOO *Trypanosoma cruzi*. 4

Ubicación sistemática. *4*

Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi. *5*

ENFERMEDAD DE CHAGAS. 8

Consideraciones Generales. *8*

Historia *8*

Fases de la Enfermedad. *9*

Diagnóstico. *10*

Tratamientos. *10*

Control de vectores. *11*

Enfermedades causadas por otros tripanosomátidos. *11*

Tripanosomiasis Africana. 11

Leishmaniasis. 12

Características de los Tripanosomátidos. *12*

Organización genómica. 12

Organización génica. 12

Expresión génica. 13

El mecanismo de trans-splicing. 14

El Kinetoplasto. 15

Editado de ARN. 16

EL CICLO CELULAR. 16

EL CONTROL DEL CICLO CELULAR: CONSIDERACIONES GENERALES. 18

Factores que controlan el ciclo celular: MPF y SPF. *19*

Ciclinas: proteínas regulatorias de la CDC2. ..... *21*

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR. 22

S. pombe vs S. cerevisiae. *22*

La transición G_2/M: entrada en mitosis. *23*

Regulación de la salida de Mitosis. *25*

Regulación del pasaje G_1/S. *26*

CDC2/CDC28 y las ciclinas de G_1 (CLN). 26

CDC2/CDC28 y las ciclinas B (CLB). 29

REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN. 30
LA FAMILIA CDK. 31
Relación Estructura-Función. *31*
COMPLEJOS CDKS-CICLINAS DE MAMÍFEROS Y LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR. 32
Consideraciones Generales. *32*
CDK4-Ciclinas D. 35
CDK2-Ciclina E. 35
CDC2-Ciclinas B. 36
Regulación de los complejos Cyc-CDKs por inhibidores específicos (CKI). 36
CDKS Y CICLINAS INVOLUCRADAS EN PROCESOS DIFERENTES AL CICLO CELULAR. 37
El complejo CDK7-Ciclina H y la regulación de la transcripción. *37*
Complejos PHO85-Ciclinas. *38*
PHO85-PHO80 en la regulación del metabolismo del fosfato. 38
PHO85-PCL8 y 10 en la regulación de la glucógeno sintetasa. 39
PHO85-PCL1,2 y 9 en el ciclo celular. 40
CDK-CICLINAS DE TRIPANOSOMÁTIDOS. 40

MATERIALES Y MÉTODOS. 44
1 - CEPAS BACTERIANAS DE *E. COLI* UTILIZADAS. 44
2 - ANTICUERPOS COMERCIALES UTILIZADOS. 44
3 - OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS. 44
3.1-Oligonulceótidos generales. *44*
3.2- Oligonucleótidos utilizados para el clonado de tzcrk1: *44*
3.3- Oligonucleótidos utilizados para el clonado de tzcrk3: *45*
4 - PARÁSITOS. 45
5 - MEDIOS Y SOLUCIONES GENERALES. 45
5.1- Medios. *45*
5.2- Soluciones. *46*
6 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL CLONADO Y ANÁLISIS DE LOS GENES tzcrk1 y tzcrk3. 47
6.1- Purificación fenólica y precipitación de ácidos nucleicos. *47*
6.2- Electroforesis. *47*
6.2.1- Geles de agarosa nativos. 47
6.2.2- Geles de agarosa con formaldehído. 47
6.2.3- Geles de poliacrilamida desnaturalizantes para secuenciación. 47
6.3- Cuantificación de ADN, ARN y oligonucleótidos. *47*
6.4- Digestión de ADN con enzimas de restricción. *48*
6.5- Reacciones de ligación de ADN. *48*
6.6- Preparación de bacterias competentes. *48*

6.7- Preparación de ADN plasmídico. ... *48*
6.8- Transformación de bacterias. ... *49*
6.9- Secuenciación. ... *49*
6.10- Preparación de sondas radioactivas. ... *49*
6.10.1- Marcación de fragmentos de ADN doble cadena de más de 250 pb ... 49
6.10.2- Marcación de oligonucleótidos. ... 50
6.11- Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. ... *50*
6.12- Preparación del vector pBS SK+ para ligar productos de PCR con extremos romos: digestión y remoción de fosfatos 5'. ... *50*
6.13- Preparación de los productos de PCR para subclonado: obtención de extremos romos y fosforilación en 5'. ... *50*
6.14- Ensayos de Southern Blot y Northern Blot. ... *51*
6.14.1- Transferencia de ADN a membranas de nylon. ... 51
6.14.2- Transferencia de ARN a membranas de nylon. ... 51
6.14.3- Hibridación con sondas >= a 300 pb. ... 51
6.14.4- Hibridación con sondas de oligonucleótidos. ... 52
6.15- Hibridación de colonias. ... *52*
6.15.1- Transferencia del ADN. ... 52
6.15.2- Hibridación ... 52
6.16- Transcripción reversa (RT): síntesis de ADNc. ... *52*
6.17- Preparación de ADN genómico de epimastigotes de T.cruzi. ... *52*
6.18- Preparación de ARN total de epimastigotes de T.cruzi. ... *52*
6.18.1- Para pequeñas cantidades de parásitos-(10^8 células.) ... 52
6.18.2- Para grandes cantidades de parásitos (500 mg) ... 53
7 - CLONADO DE LOS GENES tzcrk1 Y tzcrk3: PROCEDIMIENTO. ... 53
7.1- Etapa 1: Clonado y secuenciación de la región media de los genes tzcrk1 y 3. ... *53*
7.2- Etapa 2: Clonado y secuenciación de la región 5' de los genes tzcrk 1 y 3. ... *54*
7.2.1- Región 5' de tzcrk3. ... 54
7.2.2- Región 5' de tzcrk 1. ... 55
7.3- Etapa 3: Clonado de la región 3' de tzcrk 1 y tzcrk 3. ... *56*
7.3.1- Jumping PCR para tzcrk 1 y tzcrk 3 ... 56
7.4- Etapa 4: Clonado de los genes completos tzcrk1 y tzcrk3. ... *57*
8 - ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE tzcrk1 y tzcrk3: PROCEDIMIENTO ... 57
9 - ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT: PROCEDIMIENTO ... 58
10 - ESTUDIO POR RT/PCR DE LA EXPRESIÓN DE tzcrk1 Y tzcrk3: PROCEDIMIENTO ... 58
11 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS TZCRK1 Y TZCRK3 ... 58
11.1- Cultivo de células COS-7. ... *58*
11.2- Preparación de extractos proteicos. ... *58*
11.2.1- Parásitos. ... 58

11.2.2- Células COS-7 59
11.3- Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Desnaturalizantes (SDS-PAGE) *59*
11.4- Ensayos de Western blot *60*
11.5- Purificación de proteínas recombinantes. *60*
11.5.1- Purificación de proteínas fusionadas a GST. 60
11.5.2- Purificación de proteínas que forman cuerpos de inclusión (His-TzCRK3). 60
11.6- Preparación de los antisueros GST-TzCRK1 e His-TzCRK3. ..... *61*
11.7- Purificación de IgGs de conejo. *61*
11.8- Ensayos de inmunoprecipitación y co-precipitacón. *61*
11.9- Ensayos de Actividad de Quinasas de proteínas. *62*
11.9.1- Ensayos analizados por SDS-PAGE. 62
11.9.2- Ensayos utilizando P81 62
11.10- Sincronización de cultivos por el método de la hidroxiurea. *63*
11.11- Sincronización de amastigotes. *63*
11.12- Inmunocitoquímica, Microscopía electrónica. *63*
11.13- Transfección de células COS-7. ..... *63*
11.14- Ensayos de inhibición de la actividad quinasa. *63*
12 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ENSAYOS CON LEVADURAS. 64
12.1- Transformación de levaduras. *64*
12.1.1- Pequeña escala 64
12.1.2- Gran Escala 64
12.2- Medición de actividad β-galactosidasa. *66*
12.3- Preparación de extractos proteicos. *66*
12.4- Preparación de bacterias competenes, cepa HB101. ..... *66*
12.5- Minipreparación de plásmidos de levadura para transformar bacterias. *67*
12.6- Transformación de bacterias HB101 con minipreparaciones de levaduras. *67*
13 - COMPLEMENTACIÓN EN LEVADURAS: PROCEDIMIENTO. 67
13.1- Subclonado de los genes tzcrk1 y 3 en los vectores pYes2(trp), YCpIF2 e YCpIF16. ..... *67*
13.2- Transformación y selección. *68*
14 - SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO: PROCEDIMIENTO. 68
14.1- Levadura L40 ..... *68*
14.2- Vectores. *68*
14.3- Subclonado del gen tzcrk1 en el vector pBTM116. ..... *68*
14.4- Transformación y selección de clones positivos. *69*
14.5- Control de interacción específica. *69*
14.6- Secuenciación y análisis. *69*

RESULTADOS **70**

1 - CLONADO DE LOS GENES tzcrk1 y tzcrk3 70

1.1- Etapa 1: Clonado y secuenciación de la región media de los genes tzcrk1 y tzcrk3 ..... *70*

1.2- Etapa 2: Clonado y secuenciación de la región 5' de los genes tzcrk 1 y tzcrk3 ..... *71*

1.2.1- Clonado, secuenciación y análisis de la región 5' de tzcrk 3. ..... *71*

1.2.2- Clonado, secuenciación y análisis de la región 5' de tzcrk 1. ..... *72*

1.3- Etapa 3: Clonado y secuenciación de la región 3' de tzcrk 1 y 3. ..... *75*

Jumping PCR: concepto teórico. *75*

1.3.1- Jumping PCR para tzcrk 1 y tzcrk 3 ..... *75*

1.4- Etapa 4: Clonado y análisis de los genes completos para TzCRK1 y TzCRK3. ..... *78*

2 - ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE tzcrk1 y tzcrk3 (SOUTHERN BLOTS). 82

3 - ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT. 83

4 - ESTUDIO POR RT/PCR DE LA EXPRESIÓN DE tzcrk 1 Y tzcrk 3 EN LA FORMA NO REPLICATIVA (TRIPOMASTIGOTE) DE *T. cruzi*. 84

5 - EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TZCRK1 Y TZCRK3 EN CULTIVOS BACTERIANOS. 85

5.1- Expresión de GST-TzCRK1. ..... *85*

5.2- Expresión de His-TzCRK3. ..... *86*

6 - WESTERN BLOT UTILIZANDO EL ANTISUERO ANTI-TZCRK1 87

7 - TZCRK1 ESTA PRESENTE EN LOS TRES ESTADÍOS DEL PARÁSITO. 89

8 - LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA TZCRK1 89

9 - LOS NIVELES DE TZCRK1 NO VARÍAN A LO LARGO DEL CICLO CELULAR. 91

9.1- Estudio utilizando epimastigotes sincronizados. *91*

9.2- Estudio utilizando amastigotes sincronizados. *92*

10 - WESTERN BLOT CON EL ANTISUERO ANTI-TZCRK3: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR. 93

11 - ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST-TZCRK1 E HIS-TZCRK3 DE FOSFORILAR SUSTRATOS EXÓGENOS. 93

12 - ACTIVIDAD QUINASA DE LA TZCRK1 ENDÓGENA. 95

13 - ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE P13SUC1 DE UNIR QUINASAS DE *T. cruzi*. 95

14 - ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN. 96

15 - ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TZCRK1 98

16 - ESTUDIO DE TZCRK1 EXPRESADA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS 99

16.1 - Verificación por Western blot de la expresión de las proteínas TzCRK1 y HA-TzCRK3 ..... *99*

16.2 - Determinación de la actividad de HA-TzCRK1 ..... *99*

16.3 - TzCRK1 es capaz de asociarse con las ciclinas E, D3 y A de células COS-7. ..... *100*

17 - CLONADO DE TRES CICLINAS, TCCYC2, TCCYC4 Y TCCYC5, CAPACES DE ASOCIARSE CON TZCRK1. 101

17.1- Sistema del Doble Híbrido - Concepto teórico. *101*

17.2- Sistema del Doble Híbrido para el gen tzcrk1 ..... *103*

17.2.1 - Análisis de clones del supergrupo I: identificación de los genes tccyc2, tccyc4 y tccyc5..... *107*

DISCUSION..... **113**

CLONADO Y ANÁLISIS DE LOS GENES tzcrk1 y tzcrk3. 113

Clonado. *113*

Análisis de secuencia. *113*

Evidencias de Trans-splicing alternativo. *115*

Organización Genómica. *116*

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TzCRK1. 117

TzCRK1 como proteína recombinante. *118*

El Sistema del Doble Híbrido. *118*

Consideraciones generales. 118

Identificación de ciclinas que se asocian con TzCRK1 119

Ensayos de complementación. *121*

CONCLUSIONES **122**

BIBLIOGRAFÍA. **124**

ABREVIATURAS.

β-gal	β galactosidasa.
µl	Microlitro.
A	Ampers.
aa	Aminoácido.
ADN	Acido desoxiribonucleico.
ADNc	ADN copia.
ADNk	ADN kinetoplástico.
ARN	Acido ribonucleico.
ARNg	ARN guía.
ARNm	ARN mensajero.
ATP	Trifosfato de adenosina.
Cis	Cisteína.
cyc	Ciclina.
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco.
dNTPs	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfatos
GST	Glutatión S-transferasa.
HA	Hemaglutinina.
His	Histidina.
Ig	Inmunoglobulina.
kDa	KiloDaltons.
kpb	Kilo pares de bases.
L	Litro
M	Molar.
ME	Miniexón.
ml	Mililitro.
NC	No codificante.
nm	Nanometros.
nt	Nucleótido.
ORF	Marco abierto de lectura.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.

pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG	Polietilenglicol.
PM	Peso molecular.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Transcriptasa reversa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Ser	Serina.
SL	Secuencia líder.
Ta	Temperatura ambiente.
Tir	Tirosina.
TLCK	Tosillisilclorometilcetona.
Tre	Treonina.
Tris	2-amino-2-hidroximetil 1,3 propanodiol.
UV	Ultravioleta.
V	Volts.
W	Watts.
WB	Western blot.
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Estudio de proteínas involucradas en el proceso de división celular en el parásito *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVO PRIMARIO.

Caracterización de proteínas relacionadas con la CDC2 (CRKs) en el parásito *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

En este trabajo se toma al parásito *Trypanosoma cruzi* como modelo para estudiar los mecanismos que regulan el ciclo de división celular en Tripanosomátidos. Estos son parásitos protozoos que incluyen especies que causan enfermedades con consecuencias socioeconómicas importantes, como el Mal de Chagas, la Leishmaniasis y la enfermedad del sueño.

EL PROTOZOO *Trypanosoma cruzi*.

Ubicación sistemática.

A continuación se detalla la ubicación sistemática de *Trypanosoma cruzi* y la de los tripanosomátidos *Leishamania mexicana*, *Leishmania major*, *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma congolense*.

Tipo: ***Protozoa***
Subtipo: ***Sarcomastigophora***
Clase: ***Zoomastigophora***
Subclase: ***Mastigophora***
Orden: ***Kinetoplastida***
Suborden: ***Trypanosomatina***
Familia: ***Trypanosomatidae***
Género:

- *Leishmania*
  - *Leishmania* (subgénero)
    - *Leishmania major*
    - *Leishmania mexicana*
- *Crithidia*
  - *Crithidia fasciculata*
- *Trypanosoma*
  - *Schizotrypanum* (subgénero)
    - *Trypanosoma cruzi*
  - *Trypanosoon* (subgénero)
    - *Trypanosoma brucei*
  - *Nannosonas* (subgénero)
    - *Trypanosoma congolense*

Los kinetoplástidos (orden Kinetoplastida) son organismos flagelados que se caracterizan por

poseer una única mitocondria, llamada kinetoplato, situada cerca de la base del flagelo, que contiene ADN. La mayoría de los kinetoplastidos flagelados se encuentran parasitando invertebrados o vertebrados.

T. cruzi pertenece al género *Trypanosoma,* donde están comprendidos parásitos digenéticos que tienen en uno de sus estadíos de desarrollo la forma tripomastigote. Este género se divide en dos secciones: *Salivaria* y *Stercoraria* (Hoare, C.A., 1972). En la primera están comprendidos tripanosomas patógenos que se multiplican en el estadío tripomastigote en el mamífero, completan su desarrollo en las glándulas salivales del vector y son transmitidos por inoculación, ej. *T. brucei* y *T. congolense*. En la segunda se agrupan especies no patógenas con excepción de *Trypanosoma cruzi* que se multiplican en el mamífero en forma de amastigote o epimastigote, completan su desarrollo en la parte posterior del vector, y son transmitidos a los huéspedes mamíferos a través de las heces del insecto. En esta clasificación existen excepciones: el *Trypanosoma equiperdum* perteneciente a la sección *Salivaria*, que se transmite directamente de mamífero a mamífero; y el *Trypanosoma rangeli*, perteneciente a la sección *Stercoraria*, que completa su desarrollo en la parte anterior del vector y es transmitido por inoculación. En cuanto al subgénero *Schizotrypanum*, comprende a los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados por medio de fases intracelulres.

Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi presenta un ciclo de vida complejo, que involucra tres formas de desarrollo principales: la forma amastigote no flagelada y las formas epimastigote y tripomastigote flageladas (Figura 1). Las mismas difieren en el hospedador y en sus características replicativas y de localización. El ciclo biológico del parásito involucra el desarrollo dentro de dos huéspedes: un huésped definitivo mamífero y un insecto vector intermediario. Este insecto vector es un triatomino, conocido en nuestro país con el nombre de vinchuca. En el insecto vector predominan la forma epimastigote replicativa, y la tripomastigote metacíclica que es la forma infectiva incapaz de dividirse. El amastigote, que tiene capacidad replicativa, y el tripomastigote sanguíneo, que no la tiene, son formas del hospedador mamífero, siendo el amastigote la forma intracelular.

Los epimastigotes proliferan en el insecto vector y eventualmente se diferencian en el recto a la forma tripomastigote metacíclico. Cuando la vinchuca pica al mamífero, ingiere la sangre y defeca. Las heces, conteniendo el parásito son depositadas cerca del sitio de la picadura. El prurito y rascado posterior permiten la penetración de los tripomastigotes metacíclicos, contenidos en las heces, al torrente sanguíneo del huésped mamífero. Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos (músculo cardíaco e intestino) y se diferencian a amastigotes. Luego de varios ciclos de división, determinados genéticamente, los amastigotes se

diferencian a tripomastigotes sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo por ruptura de la célula huésped. Estos pueden infectar nuevas células o ser ingeridos por el insecto vector cuando éste se alimente con sangre del mamífero infectado. Dentro del insecto, los tripomastigotes sanguíneos provenientes del mamífero se diferencian a epimastigotes al llegar al intestino medio del insecto vector, completándose el ciclo (Fig. 2).

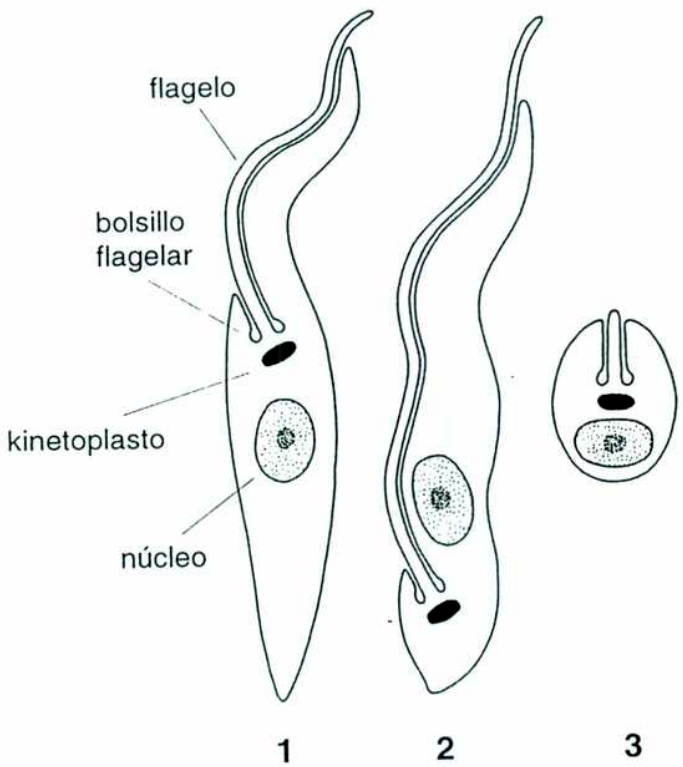


Figura 1. Diagrama de las formas de *Trypanosoma cruzi*.
1, epimastigote; 2, tripomastigote; 3, amastigote (Cox, 1993)

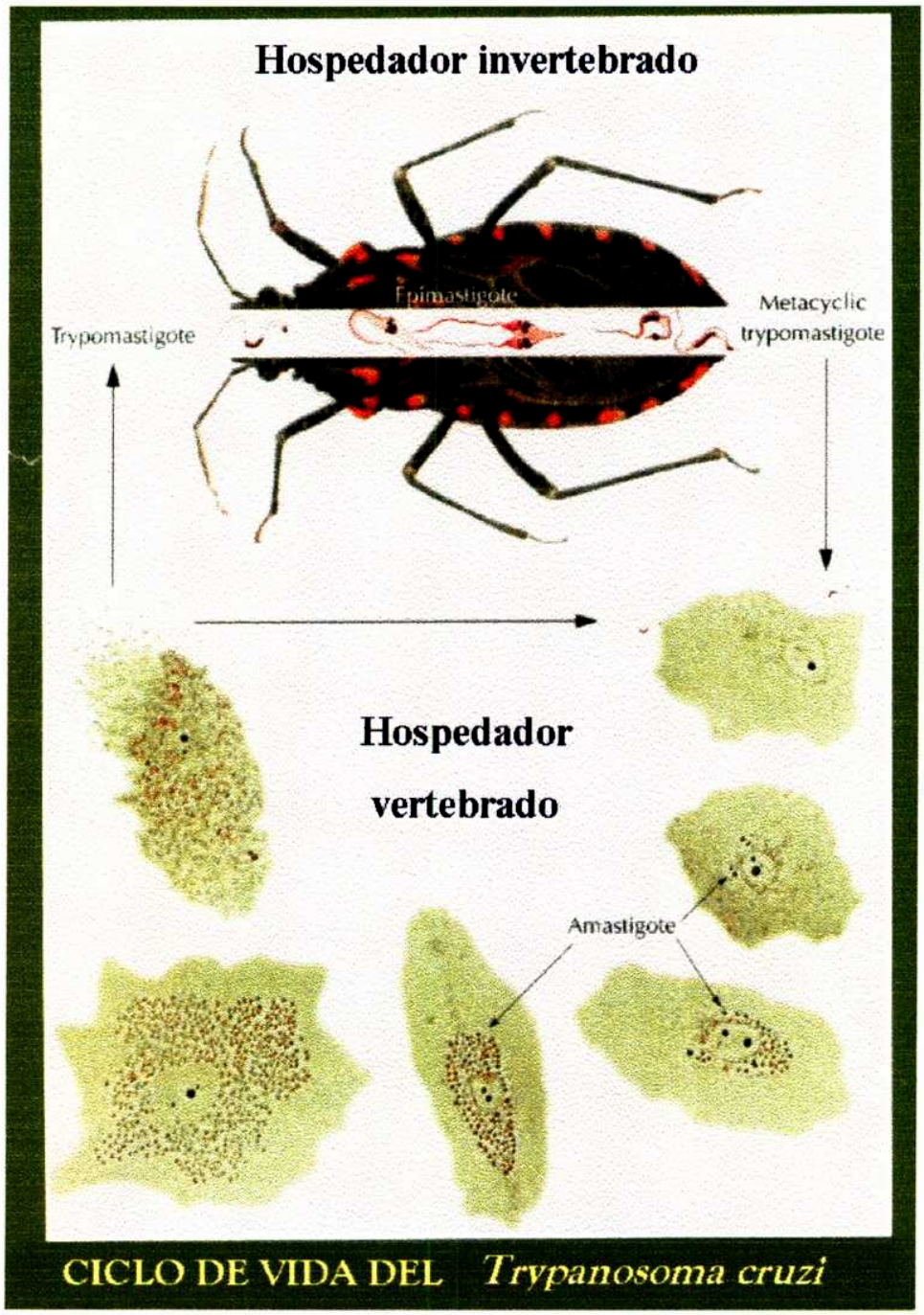


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi.*
Ver texto.

ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Consideraciones Generales.

La Enfermedad de Chagas es una parasitosis, cuyo agente etiológico es el protozoario *Trypanosoma cruzi*. Este parasita el tubo digestivo de más de 80 especies de triatominos y en nuestro país es transmitido principalmente por un insecto que se alimenta de sangre, conocido científicamente con el nombre de *Triatoma infestans*, y en forma popular con el nombre de vinchuca. Otras posibles vías de transmisión de la enfermedad pueden ser la congénita, que se produce por vía transplacentaria, o a través de transfusiones sanguíneas o transplantes, las cuales constituyen las principales vías de infección en zonas no endémicas.

La infección con *T. cruzi* está esencialmente limitada al continente americano. Se extiende desde el sur de los Estados Unidos, particularmente en los estados de California y Texas, hasta el sur de nuestro país, considerándose como límite de su extensión el paralelo 43° S, descontando algunas áreas del Caribe que están excentas de ella (CTD, 1997). Su distribución geográfica coincide con la de los insectos transmisores de hábitos domiciliarios, concentrados sobre todo en áreas rurales.

El número de enfermos chagásicos informados hasta el año 1996 fue de 16 a 18 millones, con alrededor de 5-6 millones de enfermos crónicos. La población de riesgo asciende a los 100 millones de personas. Se calcula que las perdidas económicas causadas por esta zoonosis ascienden a más de $ 6500 millones.

La Enfermedad de Chagas es considerada una enfermedad socioeconómica pura debido a la prevalencia de la misma en sectores de pobreza y subdesarrollo. La proliferación de los insectos transmisores está vinculada con la existencia de viviendas precarias donde los mismos pueden guarecerse, alimentarse y multiplicarse. Esta enfermedad también está relacionada con alteraciones ecológicas producidas por los desmontes masivos que llevan a una ubicua adaptación de los insectos hospedadores en domicilios y áreas peridomiciliarias.

Informes provenientes de la TDR-WHO (*Tropical Disease Research*) indican que, desde 1991, cuando los gobiernos de los países del cono sur decidieron tomar medidas para eliminar la transmisión del Chagas, la prevalencia de la infección se redujo más del 75 % en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Se calcula también que para el año 2003 la incidencia en toda Latinoamérica se reducirá más de un 70%.

Historia

Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico brasileño, fue comisionado por el Ministerio de Salud Pública de Brasil para estudiar la presencia de focos de paludismo en el nordeste de Brasil, más específicamente en la población de Lassance perteneciente al estado de Minas Gerais.

Cuando estudiaba esa población en 1909 (Chagas, C., 1909) halló enfermos que en la sangre

presentaban un parásito, *Trypanosoma*, al cual denomino *cruzi* en honor al investigador y epidemiólogo brasileño Oswaldo Cruz. Estas personas presentaban diversas alteraciones clínicas, fundamentalmente cardíacas y en el aparato digestivo y además, sufrían agrandamiento de la glándula tiroidea, bocio.

Entre sus investigaciones, logró infectar y reproducir en monos la enfermedad que él observaba en humanos mediante la inoculación de tripanosomas que había hallado en la sangre de los pacientes.

En 1912, Carlos Chagas viajó a Buenos Aires y presentó, en los ambientes científicos porteños, la enfermedad por él descubierta y los resultado de los estudios efectuados en Brasil. Su visita le significó críticas científicas y una desilusión personal, pues le fue demostrado el error de haber incluido como manifestación específica de la nueva tripanosomiasis recién descripta, a enfermos con alteraciones en la glándula tiroidea. Ocurría que esta patología correspondía a otras entidades y estados pluricarenciales de la región en la que Chagas efectuó el descubrimiento. Se suponía, entonces, que la tripanosomiasis era un hallazgo casual y que no representaba necesariamente una enfermedad.

Salvador Mazza, médico argentino con formación en bacteriología y patología, a la inversa de muchos, no había sido indiferente a los estudios de Chagas y a su transitorio fracaso en Buenos Aires. Quizás todos los datos aislados, aunque contradictorios, que había escuchado sobre la nueva enfermedad y sus propias investigaciones en animales, lo llevaron a sugerir la creación de un instituto en nuestro país que se dedicara a estudiar las enfermedades propias de la región. En 1926, Mazza organizó la primera sociedad científica de Jujuy. En los meses y años siguientes se fueron creando sucesivas filiales de esa primitiva sociedad en diversas provincias.

En 1928 se crea oficialmente la "Misión de Estudios de la Patología Regional Argentina" (MEPRA) la cual no sólo ratificó la Enfermedad de Chagas cuando ésta era negada internacionalmente y en especial en el orden nacional, sino que logró grandes adelantos en el estudio de los síntomas y lesiones causados por la enfermedad.

Fases de la Enfermedad.

La enfermedad se vincula a un cuadro agudo, prácticamente inmediato a la infección inicial, y a otro crónico, temporalmente alejado y de mayor importancia. El primero puede no advertirse en la gran mayoría de casos. En general evoluciona hacia la curación completa, lo que depende entre otras cosas del estado físico previo del individuo afectado. La inflamación localizada en la puerta de entrada del parásito se llama chagoma. Si el sitio de inoculación de los parásitos fue alrededor del ojo, se forma una congestión local, conocida como signo de Romaña. Los síntomas generales de la etapa aguda son fiebre, agrandamiento del hígado y bazo, edema generalizado y adenomegalia. En el 30% de los casos se presentan anormalidades electrocardiográficas o

radiológicas debidas a miocarditis aguda de diferentes grados. La mortalidad por miocarditis aguda ocurre en el 2-3% de los casos. Una complicación grave en esta etapa es la meningoencefalitis, la cual aparece en niños menores de dos años, siendo la mortalidad del 50%. Durante esta etapa, los parásitos invaden varios tejidos y sistemas de órganos. La etapa aguda puede resultar fatal en niños, pero comúnmente el paciente sobrevive y entra en un período indeterminado hasta la aparición de la etapa crónica.

Desde esa fase aguda se pasa, en forma lenta y gradual, a la fase crónica. Entre estas dos fases, existe una tercera etapa que se caracteriza por la ausencia de síntomas y el enfermo tiene plena capacidad para realizar actividades físicas y sus electrocardiogramas y radiografías torácicas son normales. No obstante, las pruebas serológicas siguen siendo positivas. Durante esta etapa, la mayoría de los pacientes no tienen conciencia de que están infectados con *T. cruzi*, constituyendo un importante reservorio de la enfermedad y contribuyen a mantener el ciclo vital del parásito.

Alrededor del 30% de los pacientes entran en la etapa crónica y sufrirán un daño cardíaco, digestivo o neurológico 20 o 30 años después de haber contraído la enfermedad. En la Argentina, la manifestación clínica más frecuente es la cardiopatía, la cual es la causa primaria de muerte de la enfermedad de Chagas. En el caso de daños digestivos, los segmentos más comúnmente dañados son el esófago y el colon, llevando a la formación de megaesófago y megacolon.

Las bases celulares y bioquímicas que determinan estos daños son el resultado de varios factores tales como efectos citotóxicos directos del parásito o la respuesta inmune hacia él, en la cual pueden incluirse tanto lesiones por inflamaciones como el desencadenamiento de respuestas autoinmunes.

Diagnóstico.

Existen distintos métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Hay métodos parasitológicos, los cuales pueden ser por la observación directa del parásito en sangre, o de una manera indirecta, por xenodiagnóstico. En la etapa aguda se diagnostica la enfermedad por observación directa del parásito en sangre, en cambio en la etapa crónica los parásitos no están en sangre, localizándose en los tejidos, por lo cual se utilizan métodos inmunológicos y PCR. Entre las pruebas serológicas más utilizadas, se emplea la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo enzimático (ELISA) (OMS, 1991)

Tratamientos.

En los tratamientos se tiene en cuenta las etapas en las cuales se encuentra la enfermedad. El tratamiento tripanosomicida es el indicado para pacientes que están en la etapa aguda. Se ha observado que las distintas cepas de *T. cruzi* tienen distintas susceptibilidades a los fármacos utilizados. El nifurtimox y el benznidazole son efectivos en prevenir el esparcimiento de los

parásitos de tejido en tejido. Sin embargo, son frecuentes las recaídas luego del tratamiento, sugiriendo que los amastigotes de los tejidos no se ven afectados por estas drogas (Behnke, J. M. 1990). Pacientes en la etapa crónica, con lesiones orgánicas, no se benefician con el tratamiento tripanosomicida y únicamente se realizan tratamientos sintomáticos (CTD, 1998).

Tanto para la enfermedad de Chagas como para la Leishmaniasis y Tripanosomiasis Africana, actualmente no hay desarrollo de nuevas drogas. La política a seguir para reducir costos en investigación y desarrollo, es analizar el efecto que tienen sobre estas enfermedades drogas utilizadas para tratar otras enfermedades causadas por distintos organismos o drogas usadas para el tratamiento del cáncer.

Control de vectores.

Para poder controlar la enfermedad de Chagas se están implementando estrategias que apuntan a interrumpir el ciclo doméstico de la transmisión de *T. cruzi* atacando al vector. Sería imposible intentar erradicar el parásito ya que tiene un gran número de hospedadores. Para evitar que el vector entre en contacto con los humanos, se están empleando técnicas que incluyen latas fumigadoras y pinturas que tienen una serie de compuestos insecticidas de liberación lenta. También se rocían las áreas peridomiciliarias con piretroides (OMS, 1991). Estos métodos, combinados con la educación y vigilancia domiciliaria, han llevado a disminuir notablemente la prevalencia de la infección.

Enfermedades causadas por otros tripanosomátidos.

Tripanosomiasis Africana.

La Tripanosomiasis Africana, conocida como enfermedad del sueño, afecta a 36 países de Africa y es uno de los mayores problemas de ese continente afectando su desarrollo social y económico. Se estima que anualmente existen 300000 casos nuevos. En humanos, la tripanosomiasis africana es causada por las subespecies *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, los cuales son transmitidos por la mosca tsetse (*Glossina* sp.). El desarrollo y progresión de esta enfermedad varía según la especie y una vez desarrollada, puede ser fatal si no se recibe el tratamiento adecuado, el cual no es del todo efectivo. Existen otras especies de trypanosoma que causan enfermedades similares en animales; *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma vivax* causan enfermedades en el ganado, mientras que *Trypanosoma brucei brucei*, afecta caballos y camellos así como también ganado. Se estima que la pérdidas económicas asciende a más de u$s 5000 millones por año.

Leishmaniasis.

Existen más de 20 especies diferentes del género Leishmania que causan patologías en humanos. Todas son transmitidas por flebótomos, de la especie *Lutzomyia* en América y de la especie *Phlebotomus* en Europa, Asia y Africa. Hay tres tipos de Leishmaniasis, divididas según el tipo de enfermedad: cutánea, visceral y mucocutánea. La leishmaniasis cutánea es la más abundante, se estiman más de 1.5 millones de casos nuevos por año. Es transmitido por más de 12 especies distintas de Leishmania, entre las que se encuentran, *L. mexicana, L. braziliensis* y *L. pifanoi* en América y *L. major* y *L. trópica* en Europa, Asia y Africa. Este tipo de enfermedad consiste en úlceras en la piel y por lo general el propio sistema inmune cura la enfermedad. La leishmaniasis mucocutánea o espundia aparece luego de la cutánea, causa destrucción de las mucosas nasales y faríngeas. En regiones endémicas de Latinoamérica es transmitido por *L. braziliensis*. La leishmaniasis visceral es la más grave y, si no es tratada, causa la muerte. Es causada por *L. donovani* y *L. chagasi*. En la India, esta enfermedad es conocida como kala azar y se estima que la mortalidad es de 50 000- 200 000 personas por año (TDR, 1997)

Características de los Tripanosomátidos.

Organización genómica.

Los tripanosomátidos tienen 2 genomas, uno en el núcleo y otro en el kinetoplasto (ver kinetoplasto), el cual constituye entre el 10 y el 30% del total del ADN. El genoma nuclear es de baja complejidad (5-24 x 10^7 pb), contiendo secuencias alta y medianamente repetidas y secuencias únicas. En general son diploides, aunque existen excepciones como muchos de los genes VSG (VSG=*variable surface genes*) de *T.brucei* que muestran sólo un alelo por cromosoma diploide y están localizados en cromosomas pequeños que se piensa son aneuploides. Por otro lado, estudios cromosómicos mostraron que en general el tamaño de los cromosomas homólogos puede ser diferente dentro de un mismo genoma y entre especies.

El análisis del contenido de ADN en distintos estadíos de una misma especie mostró que, por ejemplo, la forma epimastigote de *T. cruzi* tiene entre 2 y 12 % más de ADN que las otras formas. Por otro lado, el contenido de ADN puede variar hasta un 70% entre cepas distintas de una misma especie (Swindle, J. y Tait, A. 1996)

Organización génica.

Los genes de tripanosomátidos no tienen intrones. En general las regiones intergénicas son cortas, pudiendo variar desde uno a cientos pares de bases. La organización de los genes se puede dividir en 5 clases. En la primer clase, se ubican los genes que tienen entre 1 a 3 copias en un 1 solo locus; en general en esta categoría se encuentran genes que codifican para enzimas

esenciales para el metabolismo normal, ej. aldolasa de *T. cruzi*. Para el mismo gen, este tipo de organización esta bastante conservada entre los distintos tripanosomátidos. En la segunda clase están aquellos genes con 1 a 4 copias en los 2 loci, como por ejemplo la polimerasa de ARN II de *T. brucei*. En las clases 3 y 4 se ubican aquellos genes multicopia que están en un solo locus o en 2 o más loci, respectivamente. Un ejemplo de un gen organizado tipo clase 4 es el gen de la secuencia líder o miniexón (ver trans-*splicing*). Para genes multicopia de las clases 3 y 4, se ha observado que la organización puede no estar conservada entre distintos géneros o especies. En la clase 5 están aquellos genes que conforman familias que se ubican en varios loci, como genes VSG.

Por otro lado, se han descripto secuencias transponibles dispersas en el genoma. También se ha observado que algunas secuencias transponibles ubicadas en loci específicos, están conservados entres distintas especies sugiriendo que son una familia de elementos con posibles funciones relacionadas.

En estos organismos también se ha observado amplificación espontánea del ADN o amplificación en respuesta a drogas de selección o estrés nutricional (Swindle, J. y Tait, A. 1996)

Expresión génica.

La expresión de genes en tripanosomátidos tiene características particulares que hacen que ciertos procesos difieran de los conocidos en otros eucariotas.

El proceso de iniciación de la transcripción no está del todo comprendido, principalmente porque se han identificado muy pocos promotores. Hasta la fecha no se han encontrado secuencias promotoras clásicas. Algunos promotores descriptos presentan características para polimerasas de ARN de tipo I y II, haciendo muy difícil su clasificación; este es el caso del promotor de las VSG y PARP (proteínas repetitivas acídicas procíclicas) de *T. brucei* (Vanhamme, L. y Pays, E., 1995). También se describieron secuencias promotoras para los genes ribosomales y la secuencia líder o miniexón. Una importante característica de la transcripción en estos organismos es que para la mayoría de los genes, la transcripción es policistrónica. Este tipo de organización, donde se tiene una gran unidad transcripcional y donde varios genes se transcriben a la vez, sugiere que se necesitarían pocos promotores para iniciar la transcripción y esta sería la razón por la cual no se han podido encontrar. Por otro lado, es posible que la transcripción se inicie al azar desde cualquier punto dentro de la región intergénica, la cual tiene la característica de ser rica en nucleótidos A y T.

Los transcriptos policistrónicos son procesados para obtener mensajeros maduros individuales. En el extremo 5' se agrega una secuencia denominada secuencia líder o miniexón, por un proceso denominado trans-*splicing*, y el extremo 3' se poliadenila. Como consecuencia, todos los ARNm llevan una secuencia común en el extremo 5'.

El mecanismo de trans-splicing.

El trans-*splicing* es una reacción intermolecular por la cual exones de dos moléculas de ARN son unidas para formar un ARN maduro (Fig. 3). En tripanosomátidos, una secuencia pequeña de ARN se adiciona al extremo 5' de una molécula de pre-ARN. Esta secuencia denominada miniexón (ME) o secuencia líder (SL) tiene un tamaño de 39 nt y proviene de la región 5' de un transcripto de 140 nt, llamado med ARN (Laird, P. W. 1989). Este med ARN es procesado de manera tal que su extremo 5', que corresponde al ME, tiene la 7 metil guanosina y presenta también modificaciones en los 4 primeros nucleótidos y en la posición 6. El mecanismo de trans-*splicing*, al igual que el cis-*splicing* es una reacción que ocurre en dos etapas. En la primera, el med ARN es clivado en su extremo 5', liberando los 39 nt correspondientes al ME. El extremo 5' nuevo del med ARN, se une, formando una unión 2'-5' fosfodiester, a un nucleótido que está río arriba del sitio 3' aceptor de *splicing* del pre-ARN, denominado punto de ramificación (*branching point*) (Fig. 3). En el segundo paso, los dos exones son ligados formando un mensajero que en su extremo 5' tiene la secuencia del ME. En este mecanismo son necesarios los dinucleótidos consenso GU y AG en los sitios aceptores 5' y 3', respectivamente. En el trans-*splicing*, el sitio 5' aceptor esta en el med ARN y el sitio 3' en el pre-ARN. Al igual que para el cis-*splicing* de intrones de mamíferos, río arriba de los sitios aceptores 3', es decir, río arriba del dinucleótido AG, es necesaria una secuencia rica en pirimidinas, la cual, en tripanosomátidos es de secuencia muy variable. En el trans-*splicing*, la inserción del ME ocurre en el primer dinucleótido AG luego de un tracto de polipirimidinas. El proceso de trans-*splicing* esta acoplado con la poliadenilación del transcripto río arriba, pero existen evidencias que indican que primero ocurre el trans-*splicing* y luego la poliadenilación. No se conoce bien cómo es este tipo de acople, pero en ambos procesos es necesaria la secuencia del tracto de polipirimidinas.

No se han encontrado secuencias consenso para la poliadenilación, como la que existe para eucariotas superiores, pero ésta ocurre siempre antes o después de una adenosina y requiere de un sitio 3' aceptor de *splicing* (Ullu, E., y col. 1996).

La transcripción policistrónica de los genes de tripanosomátidos, en la cual se transcriben por igual muchos genes, mostró que la regulación de la expresión es postranscripcional. El nivel de ARNm maduro presente está regulado por la velocidad de adición del ME y poliadenilación, por la tasa de degradación de los pre-ARN y ARNm y por la tasa de exportación al núcleo.

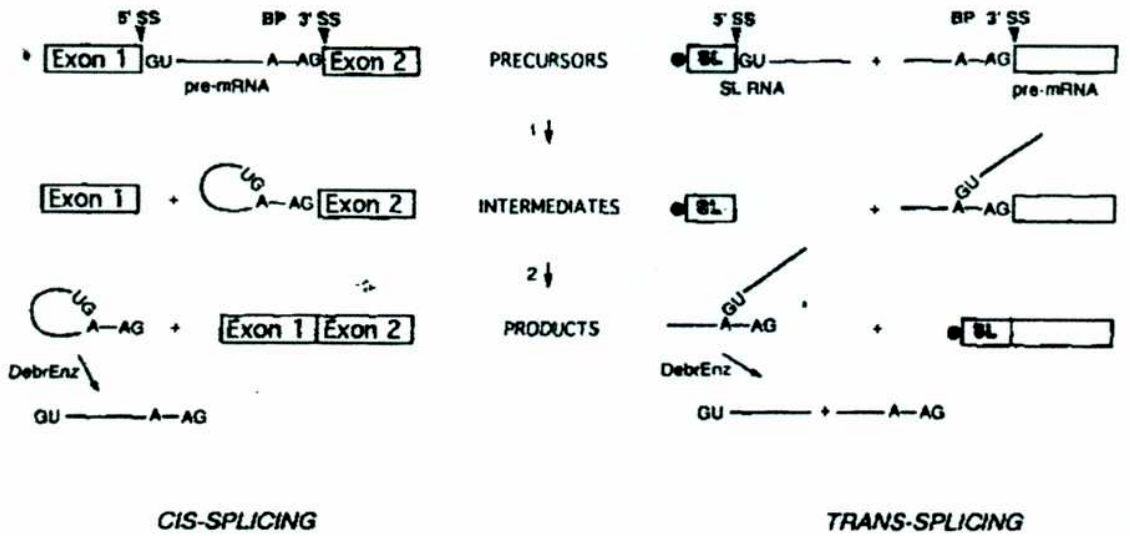


Figura 3. Esquema de los mecanismos de trans-*splicing* y cis-*splicing*
Los exones se muestran como cajas. Los intrones se indican como líneas y tienen en el sitio 5' aceptor de *splicing* (5'SS) el dinucleótido GU y en el sitio 3'aceptor de *splicing* (3'SS), el dinucleótido AG. BP, (*branching point*) punto de ramificación. DebrEnz, enzima desramificante (Ullu, E. y col.1996).

El Kinetoplasto.

En tripanosomátidos, existe una única mitocondria, que incluye la organella denominada kinetoplasto. El ADN mitocondrial es el ADN del kinetoplasto por lo que se denomina ADNk. La particularidad de este ADN, es que a diferencia del ADN mitocondrial de organismos sin kinetoplasto, está organizado formando una malla que contiene cientos de círculos de ADN concatenados entre sí. Estos círculos son de dos tipos: 1) minicírculos, cuyos tamaños oscilan entre 0.5 y 2.8 kilobases según la especie y tienen entre 5000 y 10000 copias por kinetoplasto, no necesariamente iguales; 2) maxicírculos, cuyos tamaños varían entre de 20 a 37 kilobases y presentan entre 25 a 50 copias idénticas.

Los maxicírculos, al igual que el ADN mitocondrial de levaduras o mamíferos, codifican para ARN ribosomal y un número pequeño de proteínas que, en su mayoría están involucradas en el proceso de obtención de energía. El ARN transcripto por esos genes sufre un complejo procesamiento de edición necesario para crear marcos abiertos de lectura.

Los minicírculos codifican para ARN guía, el cual es necesario para la correcta edición de los transcriptos provenientes de los maxicírculos (ver Editado del ARN)

El ADNk se replica durante la fase S del ciclo celular, a diferencia del ADN mitocondrial de

otros organismos que se replica durante todo el ciclo. Cada uno de los círculos se replica solo una vez por división celular. Una característica importante de la replicación de los minicírculos es que los mismos, para ser replicados, deben ser liberados de la malla y en un determinado momento, solo algunos cientos están libres de la red. En cambio, los maxicírculos se replican unidos a la malla (Englund, P. y col. 1996).

Editado de ARN.

El editado de ARN es un proceso por el cual la secuencia de un ARN es cambiada, difiriendo así de la secuencia del gen a partir del cual se transcribió. Estos cambios pueden ser deleciones, adiciones o conversiones nucleotídicas. Este mecanismo puede crear un nuevo codón de iniciación, desplazar el marco de lectura o incluso puede crear nuevos marcos abiertos de lectura. Este fenómeno fue observado por primera vez en ARN mensajeros del kinetoplato de tripanosomas (Arts y Benne, R., y col. 1986). La edición de mensajeros, ocurre en todos los kinetoplástidos y se ha demostrado que también existe en algunos transcriptos de otros protozoos, mamíferos, plantas y virus. En tripanosomátidos, la edición consiste en la deleción o inserción de uridinas en ARNm transcriptos a partir de ADNk. En cambio, en otros organismos, también puede ocurrir en ARN ribosomal, y se ha observado la adición de guanosinas, adenosinas y citidinas además de uridinas. Los mecanismos de edición varían de acuerdo a si ocurre una inserción/deleción o una conversión nucleotídica.

Para la edición de ARN de kinetoplástidos son necesarios ARN guías (ARNg). Estos son pequeños transcriptos de 45-60 nucleótidos, de secuencia complementaria a una porción de los ARN editados. En su región 3', todos los ARNg tienen una cola de poliU de 5-15 nt, que se adiciona post-transcripcionalmente. La presencia de esta cola de poliU llevó a proponer que los ARNg podrían servir de dadores o aceptores de U durante la edición. Los ARNg están codificados en los minicírculos del kinetoplasto. En algunos kinetoplástidos, los maxicírculos también pueden codificar para algunos ARNg. La cantidad de ARNg y la cantidad de ARNm editados varía según la especie.

La maquinaria necesaria para la edición se conoce con el nombre de "editosoma". Es un complejo de alto peso molecular formado por proteínas, riboproteínas, ARNg y ARNm a ser editado (Hajduk, S. y Sabatini, R. 1996).

EL CICLO CELULAR.

La división celular es el proceso por el cual el material celular se divide entre dos células hijas nuevas. En organismos unicelulares, aumenta así el número de individuos en la población. En organismos multicelulares, es el medio por el cual el organismo crece a partir de una sola célula

y también por el cual los tejidos lesionados se reparan. Al dividirse, las células pasan por una secuencia regular de crecimiento y división que se conoce como ciclo celular. El ciclo consta de cuatro etapas principales: G_1, S, G_2 y M (G = *gap*, intervalo; S=síntesis; M=mitosis). El conjunto de las fases G_1, S y G_2 se conoce como interfase y normalmente abarca el 90 % o más del tiempo total del ciclo celular. Durante la etapa S, el ADN es duplicado, se sintetizan proteínas asociadas con el ADN y comienza la duplicación de los centríolos. La fase G_1, consecutiva a la mitosis y previa a S, es un período de intensa actividad bioquímica, donde las células deben duplicar su masa y todos los elementos que ésta contiene. En la fase G_2, consecutiva a la etapa S y previa a la mitosis, las células ensamblan las estructuras especiales necesarias para la separación de los cromosomas y las dos células hijas durante la mitosis.

Los diferentes tipos de células muestran, al dividirse, variaciones en el patrón general del ciclo celular. Los organismos unicelulares y ciertas células de los centros de crecimiento de plantas y animales, pasan por ciclos celulares sucesivos durante toda la vida del organismo. Existen otras células muy especializadas que pierden la capacidad de replicarse una vez que maduran y otras, tienen la capacidad de dividirse en circunstancias especiales. Los tiempos para completar el ciclo varían desde pocas horas hasta varios días. La principal diferencia entre las células que se dividen rápidamente y las que se dividen con lentitud reside en el tiempo que pasan en la fase G_1. El tiempo para que una célula pase del inicio de la etapa S hasta el final de la mitosis es notablemente constante, independiente de la velocidad de división.

En circunstancias en que las células dejan de crecer, como sucede cuando se agotan los nutrientes o en la inhibición por contacto, se detienen en la etapa G_1. Una vez que las células pasan la fase G_1 se ven obligadas a completar las etapas S, G_2 y M. Al final de la fase G_1 se ha identificado un punto sin retorno, conocido como punto de restricción (R) en vertebrados, e inicio (*Start*) en levaduras el cual una vez superado, las células completan el resto del ciclo.

Durante la mitosis los cromosomas son movilizados de modo que cada célula nueva recibe una réplica completa de cada uno. Durante la fase S cada cromosoma se ha replicado formando cromátidas hermanas unidas en un punto llamado centrómero. Cada par de centríolos conforma un centro mitótico, y antes de M se hallan situados uno junto al otro, cerca de la envoltura nuclear. Por convención, el proceso de la mitosis se ha dividido en 5 etapas, denominadas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. No todas estas etapas son visibles u ocurren en todos los tipos celulares. En líneas generales, durante la profase, la cromatina, que se halla difusa en la interfase, se condensa lentamente formando cromosomas bien definidos, los nucleólos se decondensan y desaparecen progresivamente y los pares de centríolos se separan formando el huso mitótico que esta formado por microtúbulos que se extienden de polo a polo. La prometafase se inicia bruscamente con la desintegración de la envoltura nuclear y el huso, que hasta ahora estaba fuera del núcleo, penetra en el área nuclear. En los centrómeros de cada cromosoma se desarrollan unas estructuras especializadas, los cinetocoros. Estos se unen a un

conjunto especial de microtúbulos denominadas fibras cinetocóricas, que a su vez, entran en contacto con las fibras del huso mitótico. Durante la metafase, los cromosomas son arrastrados hacia el plano ecuatorial de la célula y son ubicados con sus ejes longitudinales en ángulo recto con el eje del huso. La anafase comienza bruscamente cuando los cinetocoros apareados de cada cromosoma se separan, permitiendo que cada cromátida sea arrastrada lentamente hacia los polos opuestos del huso. Durante estos movimientos anafásicos, a medida que las cromátidas se acercan a los polos, las fibras cinetocóricas se acortan, y las fibras del huso se alargan, aumentando la distancia entre los polos. En la telofase, las fibras cinetocóricas de las cromátidas que han llegado a cada uno de los polos, desaparecen, y las fibras del huso se alargan aún más. Las envolturas nucleares se forman alrededor de cada grupo de cromátidas hijas, el ADN se decondensa y expande, y los nucleólos se vuelven a formar. Es en este punto donde la mitosis llega a su fin. La división celular termina cuando las dos células nuevas separan sus citoplasmas por medio de un proceso llamado citoquinesis. La citoquinesis se produce por segmentación comenzando en algún punto durante la telofase. Es de esta manera como, al final del ciclo celular, se obtienen dos células hijas que ahora comenzaran otra ronda de ciclo celular.

EL CONTROL DEL CICLO CELULAR: CONSIDERACIONES GENERALES.

Durante el ciclo celular se necesita coordinar y regular, en espacio y tiempo, todos los procesos ocurridos en G_1, S, G_2 y M. El estudio de diferentes sistemas ha revelado que el ciclo celular está controlado de maneras similares y se ha establecido una teoría general sobre su regulación. En un principio se pensaba que, de alguna manera, cada proceso dentro del ciclo celular era capaz de controlar la iniciación del siguiente. La identificación de componentes claves para la regulación del ciclo celular, independientes de los necesarios para los procesos esenciales como, la replicación del ADN, condensación y segregación de cromosomas, etc., ha llevado a desechar esta teoría y establecer la existencia de un sistema de control en el cual existen proteínas que coordinan e inducen cada uno de los procesos de la división celular. Existen sistemas que monitorean cada uno de los eventos e informan al sistema de control cuando ocurre alguna falla para inhibir el inicio de los procesos siguientes. Estos sistemas de vigilancia se han denominado puntos de control (*checkpoints*) ya que la célula verifica cada proceso para poder continuar con el siguiente. A pesar de que se lo llama punto de control, este término no se refiere a un punto dentro del ciclo celular sino a un sistema intracelular de transducción de señales. Los puntos de control son también sensibles a perturbaciones extrínsecas permitiendo así responder a señales ambientales. Estos sistemas aseguran la dependencia de procesos bioquímicamente independientes. Para poder identificar puntos de control, primero se debe establecer una dependencia entre procesos y segundo, esta dependencia debe poder ser anulada por mutación. Utilizando este criterio se han podido identificar dos puntos de control a lo largo del ciclo celular. Uno en el pasaje de G_1 a S, donde la entrada en S está regulada por daños al ADN y otro

en el pasaje de G_2 a M, donde la entrada en mitosis está regulada por daños al ADN, replicación del ADN y polimerización de microtúbulos. A pesar de que sólo se han identificado dos puntos de control, experimentos con mutantes termosensibles de *S. cerevisiae* definieron al menos seis estados donde el ciclo celular se detiene, pero aún no se han encontrado mutantes que anulen la dependencia de los procesos tardíos sobre los procesos tempranos (Hartwell, L., 1995; Elledge, S., 1996). Estos resultados indicarían la posible existencia de otros puntos de control a lo largo del ciclo celular.

El sistema de control del ciclo celular está basado en fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas, que regulan actividades, asociaciones, localizaciones subcelulares, etc. En la mayoría de las células eucariotas se han podido identificar quinasas de proteínas que serían las responsables de la coordinación de todos estos cambios de estado. Estas quinasas forman la familia de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs = *cyclin dependent kinases*) que, como su nombre indica, su actividad está regulada por la asociación con proteínas llamadas ciclinas, las que conforman otra familia de proteínas.

Factores que controlan el ciclo celular: MPF y SPF.

Un poco de historia.....

La primera evidencia de la existencia de factores que regulan el ciclo celular fue descripta en el myxomycete *Physarum polycephalum*, en el cual la división nuclear esta naturalmente sincronizada, haciéndolo un buen modelo para el estudio de los mecanismos que controlan la entrada en M (Rush y col. 1966). Experimentos de fusión en distintas etapas del ciclo celular demostraron la existencia de un regulador positivo del inicio de la mitosis, cuya actividad fluctuaba durante el ciclo celular, llegando a un máximo antes de la entrada en M. También se demostró que era necesaria la síntesis de proteínas y que este factor era traslocado del citoplasma al núcleo justo antes del inicio de M. Por otro lado estudios de fusión con células humanas demostraron también la existencia de un factor positivo de la mitosis (Johnson, R. T. y Rao, P. N. 1970). Cuando células sincronizadas en G_1, S o G_2 eran fusionadas con células bloqueadas en M, había una inducción temprana de la condensación de cromosomas en células interfásicas. Estos experimentos demostraron la existencia de un factor que promueve la mitosis al cual denominaron MPF (MPF= *M-phase promoting factor*). Estos mismos autores demostraron también la existencia de un factor que regulaba la entrada en la fase S (Rao, P. N. y Johnson, R. T. 1970). Utilizando el mismo abordaje de fusión celular mostraron que, al fusionar células sincronizadas en G_1 y S, había una rápida inducción de la síntesis de ADN en los núcleos en G_1, indicando la existencia de un factor que promueve la fase S, SPF (SPF= *S-phase promoting factor*).

Otros estudios realizados con ovocitos de sapo describieron la existencia de un factor que

promovía la maduración de los mismos, al cual denominaron también MPF (*maturation promoting factor*) (Masui, Y. y Markert, C. L. 1971). El ciclo meiótico de ovocitos inmaduros está detenido en el pasaje de G_2/M de la meiosis I. La maduración de los mismos consiste en la inducción para completar la meiosis I, entrar en la meiosis II y detenerse en metafase. El ciclo puede finalizar cuando los ovocitos son fertilizados. El MPF fue descripto en experimentos donde la inyección de extractos de ovocitos detenidos en metafase II (maduros), en ovocitos inmaduros, indujo la maduración de los mismos. Experimentos posteriores demostraron que extractos mitóticos de blastómeros de embriones anfibios y de organismos como levaduras y células humanas, eran capaces de inducir también la maduración de ovocitos de sapo (Wasserman, W. J. y Smith, L. D. 1978; Sunkara, P. S. y col. 1979; Nelkin, B. y col. 1980; Kishimoto, T. y col. 1982). Estos resultados sugirieron que tanto el factor que promovía la maduración de ovocitos como el factor que promovía la fase M serían de la misma naturaleza.

Mientras se intentaba purificar el MPF, estudios genéticos en levaduras empezaron a identificar mutaciones en genes involucrados en la regulación del ciclo celular, genes cdc, (cdc = *cell division cycle*). Experimentos en levaduras de fisión de la cepa *Schizosaccharomyces pombe* identificaron un gen al cual denominaron cdc2 cuyo producto era necesario en G_1, para la entrada en S y en G_2, para el control de la mitosis (Nurse, P. y Bissett, Y. 1981). Este gen codificaba para una proteína de 34 kDa. Por otro lado, se aislaron los genes homólogos a cdc2 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Beach, D. y col. 1981) y de células humanas (Lee, M. G. y Nurse, P.1987), por rastreo de secuencias de ADN que pudieran suprimir mutaciones termosensibles para el gen cdc2 de *S. pombe*. El gen homólogo a cdc2 de *S. cerevisiae* resultó ser un gen ya identificado, denominado cdc28. Tanto estos resultados como los obtenidos con los ovocitos de sapo sugerían que, en células eucariotas, los mecanismos reguladores de la entrada en mitosis estaban conservados a lo largo de la evolución.

Se determinó que la proteína codificada por el gen cdc2 de *S. pombe* era una quinasa activada específicamente durante el ciclo celular (Simanis, V., y Nurse, P., 1986). En *S. pombe* también se clonaron los genes p13suc1 y cdc13, cuyas proteínas eran capaces de interactuar con CDC2 y regular su actividad (Hayles, J., y col. 1986; Booher, R. y Beach, D. 1987).

En paralelo con estos resultados, se logró purificar el MPF de huevos de *Xenopus laevis*. El mismo presentaba actividad de quinasa y estaba compuesto por dos proteínas de 32 y 45 kDa. (Lohka, M. J. y col. 1988). El polipéptido más pequeño era reconocido por anticuerpos contra una región conservada de la proteína CDC2 de *S. pombe*, indicando que un componente de MPF podría llegar a ser el homólogo de CDC2 (Gautier, J. y col. 1988). Por otro lado se demostró que el producto del gen p13suc1 de *S. pombe* podía unirse a la homóloga de la CDC2 de Xenopus y que la actividad de MPF podía ser separada al pasar una preparación cruda de MPF por una columna de p13SUC1-agarosa (Dunphy, W. G., y col. 1988).

En otra línea de investigación, se identificó una actividad de quinasa, capaz de fosforilar *in vitro*

la histona H1, que aumentaba en la entrada en M. Esta quinasa fue purificada de ovocitos de erizo de mar y uno de sus componentes resultó ser una proteína de 34 kDa que era reconocida por anticuerpos anti CDC2, e interactuaba fuertemente con la proteína p13SUC1.

Todos estos resultados impactaron considerablemente en el estudio del ciclo celular y llevaron a la conclusión que el pasaje de G_2 a M es un mecanismo altamente conservado a lo largo de la evolución. En cambio, estudios sobre la regulación de la transición G_1/S mostraron diferencias entre distintos organismos. Mientras que en levaduras el gen cdc2/cdc28 es el responsable del control de la transición G_1/S y G_2/M del ciclo celular, en vertebrados, el gen cdc2 esta involucrado solamente en la entrada en mitosis. En estos organismos, proteínas con similitud a la CDC2 controlan las distintas fases del ciclo celular. El pasaje de G_1/S requiere de la integración de señales de crecimiento internas y externas que determinan la decisión de una célula a proliferar. Es muy probable que durante la evolución, las vías de transducción de señales de diferentes tipos de células hayan divergido ya que deben responder a estímulos externos distintos. Como consecuencia de esta divergencia, la maquinaria que regula el ciclo celular ha desarrollado diferentes sistemas SPF. En cambio, la transición de G_2/M esta menos sujeta a la regulación de estímulos externos; células que han iniciado S están programadas para finalizar la división celular. Esta característica podría explicar porque está tan conservada la regulación del sistema de entrada en mitosis.

Ciclinas: proteínas regulatorias de la CDC2.

La actividad de la CDC2 está regulada por asociación con diferentes proteínas y por fosforilación y defosforilación de aminoácidos específicos. Existe una familia de proteínas, denominadas ciclinas, cuya asociación con la CDC2 es necesaria para la actividad de la misma. Las ciclinas fueron identificadas por primera vez en huevos fertilizados de erizo de mar y almeja, como proteínas que eran sintetizadas constitutivamente durante la interfase y luego eran degradadas rápidamente en mitosis (Evans, T., y col. 1982, 1983). La acumulación de estas proteínas en cada ciclo estaba sincronizada con la activación e inactivación de MPF, indicando una posible correlación. Estas proteínas recibieron el nombre de cilcinas porque, precisamente, su concentración oscilaba en ciclos a lo largo del ciclo celular. El análisis de las secuencias de los primeros genes de ciclinas llevó a la identificación y conformación de una familia de proteínas que se denominaron ciclinas. La existencia de una región conservada, la caja de ciclina (*cyclin box*), identificó dos subfamilias, denominadas A y B. En vertebrados, el posterior clonado de otros genes agregó más subfamilias, ciclinas C - H, y demostró que no todas las ciclinas muestran una síntesis y degradación dependiente del ciclo celular. Actualmente, para que una proteína sea considerada una ciclina, debe presentar en su secuencia homología con el *cyclin box* e interactuar con alguna CDK.

Las evidencias que sugirieron que las ciclinas estaban involucradas en el control de la entrada en M surgieron de la similitud encontrada entre el gen cdc13 de *S. pombe* y ciclinas B. Experimentos genéticos mostraron que CDC13 era capaz de interactuar con CDC2 y participar en la transición G_2/M (Booher, R. y Beach, D. 1987). Por otro lado, se demostró que el complejo CDC2-CDC13 presentaba actividad quinasa en mitosis y que la CDC13 se acumulaba en G_2 y era degradada en la transición metafase/anafase. Coincidente con la degradación de CDC13, había un abrupta disminución en la actividad de la CDC2 (Booher, R. y col 1989). Posteriormente se demostró que el complejo MPF de Xenopus estaba formado por la CDC2 y una ciclina de tipo B. Estos experimentos mostraron que la regulación de la entrada en mitosis es un mecanismo muy conservado entre distintos eucariotas.

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

Gran parte del conocimiento sobre la regulación del ciclo celular proviene de estudios realizados en levaduras. Los dos tipos de levaduras utilizados como modelo son *S. pombe* y *S. cerevisiae*. En ambos organismos se han clonado y caracterizado distintos genes involucrados en la regulación del ciclo celular y se han establecidos sistemas de control que en muchos casos se han podido extrapolar a eucariotas superiores.

S. pombe vs *S. cerevisiae.*

Estos dos tipos de organismos son considerados, erróneamente, como especies muy cercanas evolutivamente, pero están tan distantes entre sí como de los humanos. Existen diferencias importantes entre ambas. *S. pombe* se divide por fisión, mientras que *S. cerevisiae* lo hace por gemación. Otra diferencia importante es que durante la mitosis, en *S. pombe*, se puede diferenciar claramente un estado de condensación cromosómica, mientras que en *S. cerevisiae* la condensación es casi indetectable.

A pesar de existir diferencias entre ambos organismos, se ha demostrado que el control del ciclo celular es un mecanismo muy conservado, haciendo posible la identificación de genes homólogos por complementación de funciones. Así fue el caso del gen cdc2 de *S. cerevisiae*, el cual fue clonado por su capacidad de complementar mutantes termosensibles de *S. pombe* para el gen cdc2. El gen de *S. cerevisiae* correspondía a un gen ya identificado por su capacidad de controlar *Start*, denominado cdc28. Experimentos posteriores demostraron que en ambos organismos la proteína CDC2/CDC28 controla el pasaje de G_1/S y la entrada en mitosis. Una diferencia en la regulación del ciclo celular entre estas levaduras, es que, en *S. cerevisiae* el pasaje por *Start* es el principal punto de control, mientras que en *S. pombe*, es la entrada en mitosis. Esta podría ser la razón por la cual se ha tomado principalmente a *S. cerevisiae* como modelo para estudiar los mecanismos de regulación de *Start* y a *S. pombe* para estudiar la entrada en mitosis. Igualmente, en ambos organismos, mutantes termosensibles para estos genes frenan el ciclo celular en G_1 o en G_2, dependiendo de la etapa en la que se encuentren al colocar las

levaduras a la temperatura restrictiva.

Estas quinasas, CDC2/CDC28, se expresan en forma constitutiva sin variar sus niveles a lo largo del ciclo celular. Durante G_1 se unen con ciclinas de G_1 controlando el pasaje por el punto *Start*, mientras que para la transición G_2/M, se asocian con ciclinas de G_2. Esta capacidad de actuar en etapas diferentes del ciclo celular, estaría dada por la disponibilidad de sustratos en las distintas fases y/o por una diferente especificidad de sustrato adquirida por la unión con las distintas ciclinas.

La transición G_2/M: entrada en mitosis.

La transición de G_2 a M ha sido muy bien caracterizada en *S. pombe*. La actividad de la CDC2 esta regulada por asociación con distintas proteínas y por fosforilación y desfosforilación de la propia CDC2 (Fig 4). Como se ha explicado anteriormente, el complejo MPF esta formado por las proteínas CDC2 y CDC13. La CDC13 es una ciclina de tipo B cuya concentración varía a lo largo del ciclo celular. Su expresión es máxima en G_2 tardío y es degradada al final de la mitosis. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que la CDC13 esta involucrada en la localización de la CDC2 en el núcleo (Booher, R.N. y col. 1989). En algunos experimentos se demostró que la formación del complejo MPF no es el que regula el tiempo de entrada en M, indicando que la asociación de la CDC2 con CDC13 no es suficiente para pasar a mitosis.

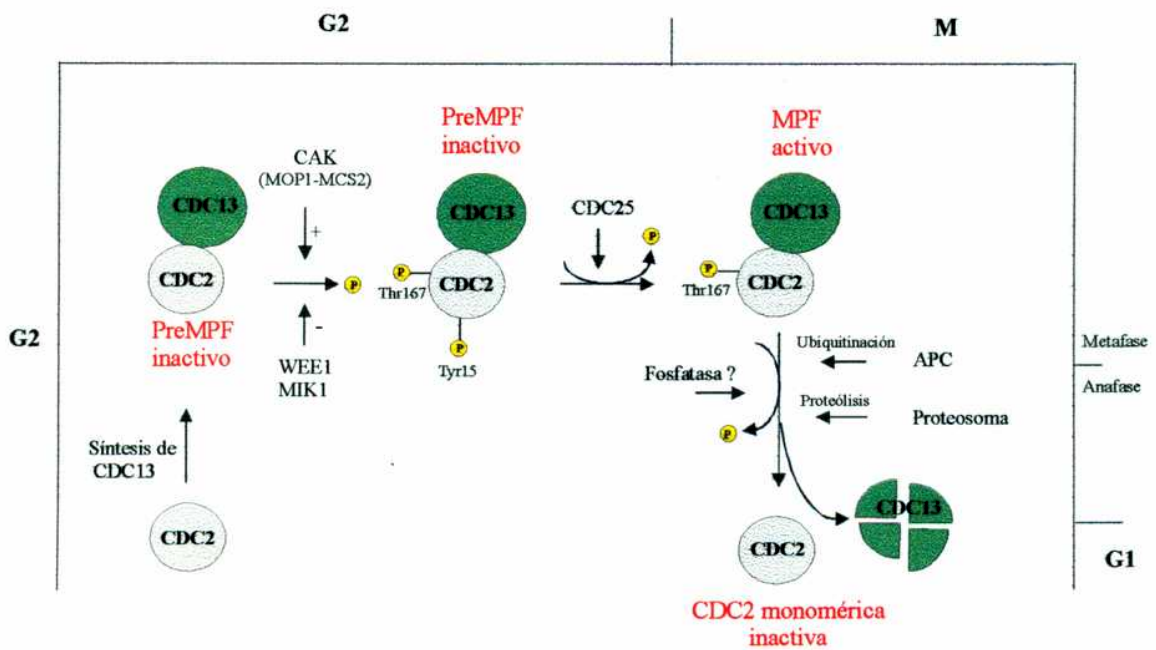


Figura 4. Control de la activación del complejo MPF en *S. pombe*.
Al final del período G_2 hay un aumento de la síntesis de ciclina CDC13 formándose el complejo inactivo CDC2-CDC13. La CDC2 es fosforilada por las quinasas WEE1 o MIK1 en Tir15 y por el complejo CAK en Tre161. Para activar este complejo es necesaria la desfosforilación del aminoácido Tir15 por la fosfatasa CDC25. El complejo activo permite la entrada en M. Al final de la metafase, el APC (*anaphase promoting complex)* ubiquitina el complejo CDC2-CDC13 llevando a su degradación, la cual es necesaria para el pasaje a anafase. Fosfatasas no identificadas desfosforilan la Tre161 de la CDC2.

Durante el período de G_1 a G_2 la CDC2 es fosforilada en Tir15 por las quinasas WEE1 y MIK1 (Lundgren, K. y col. 1991). Esta fosforilación inhibe la actividad de la CDC2, haciendo necesaria la defosforilación de este aminoácido para el pasaje G_2/M (Gould, K.L. y Nurse, P. 1989) (Fig 4). La CDC25 es la fosfatasa que desfosforila la Tir15. Se ha demostrado que el tiempo de entrada en M esta controlado por el estado de fosforilación de Tir15, regulado por el balance entre las actividades de las quinasas WEE1 y MIK1 y la fosfatasa CDC25. La actividad de estas proteínas, a su vez esta regulada por eventos de fosforilación. Los niveles proteicos de la fosfatasa CDC25 fluctúan a lo largo del ciclo celular, llegando a un máximo en la transición de G_2/M (Moreno, S. y col. 1990). Existen evidencias que muestran que la fosfatasa CDC25 puede ser fosforilada por la CDC2, participando de un proceso de realimentación positivo (Izumi, T. y Maller, J.L. 1993) (Fig 5). Otros experimentos han demostrado que la actividad de CDC25 es inhibida por proteínas involucradas en el punto de control que determina la correcta replicación del ADN (Zeng, Y. y col. 1998), mostrando que la actividad de esta fosfatasa es necesaria para la entrada en M. La actividad de la quinasa WEE1 también está regulada por eventos de fosforilación. La quinasa NIM1 (NIM= *never in mitosis*) fosforila a WEE1 inhibiendo su actividad y permitiendo la entrada en mitosis (Wu, L. y Russell, P. 1993). A su vez existen fosfatasas que activan a WEE1, inhibiendo así el pasaje de G_2/M (Millar, J.B. y col. 1992) (Fig 5). En proteínas homólogas a CDC2 de eucariotas superiores, aparte de la fosforilación de Tir15, existe otro aminoácido, la Tre14, cuya fosforilación también inhibe la actividad de la quinasa.

Aparte de la fosforilación de Tir15, existe otro aminoácido, Tre167 (Tre161 en eucariotas superiores) que debe ser fosforilado para activar la CDC2 (Gould, K.L. y col. 1991). La fosforilación de este aminoácido estabiliza el sitio de unión a sustratos, denominado "rulo T". La quinasa que fosforila este sitio, CAK (*CDC2 activating kinase*), fue purificada de Xenopus y correspondía a una proteína ya identificada, la quinasa de serina y treonina MO15 (Solomon, M.J. y col. 1993). Esta quinasa pertenece a la familia de las CDKs, por lo cual se la redenominó CDK7, y su actividad está regulada por asociación con la ciclina H (Mäkelä, T.P. y col. 1994). En *S. pombe*, el complejo CAK esta formado por la quinasa MOP1/CRK1 asociada a la ciclina MCS2 (Buck, V. y col. 1995; Damagnez, V. y col. 1995) las cuales son similares a la CDK7 y ciclina H de eucariotas superiores, respectivamente.

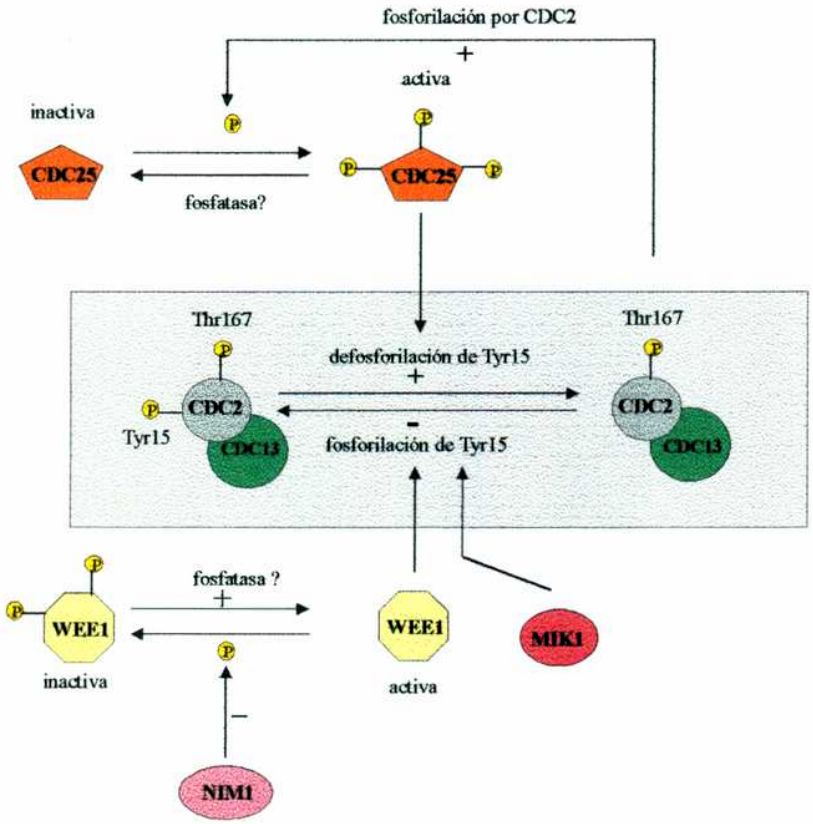


Figura 5. Regulación del estado de fosforilación de la Tir15 de la CDC2 por WEE1 y CDC25.
El área sombreada muestra la regulación de la entrada en mitosis por fosforilación y desfosforilación de la CDC2 por la quinasas WEE1 y MIK1 y la fosfatasa CDC25. La activación ocurre por desfosforilación de la Tir15 de la CDC2 por la CDC25. En la parte de arriba se muestra la regulación de la actividad de la fosfatasa CDC25; una vez activada, se dispara un mecanismo de retroalimentación positivo por el cual esta quinasa fosforila a la CDC25, inactivándola. En la parte de abajo se muestra la regulación de WEE1; la quinasa NIM1 fosforila a WEE1 antes de la entrada en M, inactivándola.

Regulación de la salida de Mitosis.

Para la entrada en mitosis es necesaria la activación de la quinasa CDC2. Esta actividad induce la profase y metafase de la mitosis. Para poder salir de M el complejo MPF debe ser inactivado. Durante la metafase se activa un sistema proteolítico, el cual degrada la ciclina B CDC13 y proteínas que inhiben el inicio de la anafase. Este sistema, denominado APC (*anaphase promoting complex*) cataliza la ubiquitinación de proteínas las cuales son marcadas para su posterior proteólisis por el proteosoma (King, R. y col. 1996). En la región amino-terminal de las ciclinas mitóticas existe una secuencia muy conservada de 9 aminoácidos, denominada la caja de destrucción o caja D (*destruction box /D-box*), la cual es necesaria para la ubiquitinación y

posterior degradación. La actividad del APC fluctúa a lo largo del ciclo celular. Durante la metafase este complejo es activado por mecanismos poco claros, pero existen evidencias que involucran fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas que forman el APC. Existe una proteína, la CUT2, que es ubiquitinada por el APC durante la metafase y degradada. Su proteólisis es necesaria para la segregación de las cromátidas hermanas durante la anafase (Funabiki, H. y col. 1996). En *S. cerevisiae* y células de mamíferos se ha demostrado que este sistema proteolítico se mantiene activo hasta la activación del complejo CDC2-ciclinas G_1 en la fase G_1 (Amon, A. y col. 1994; King, R. y col. 1996).

En Xenopus, para la inactivación de MPF, también es necesaria la desfosforilación de la Tre161. En *S. pombe* existen evidencias que sugieren, que también sería necesaria la desfosforilación del aminoácido activador (Tre167). Cepas mutantes donde la Tre167 fue reemplazada por un ácido glutámico, son multinucleadas, multiseptadas y eventualmente se detienen con un huso mitótico corto (Gould, K.L y col. 1991). En cambio, en *S. cerevisiae* la desfosforilación del aminoácido activador equivalente, Tre169, no es necesaria para la salida de mitosis (Lim, H.H. y col. 1996).

Regulación del pasaje G_1/S.

CDC2/CDC28 y las ciclinas de G_1 (CLN).

Se ha denominado *Start* al conjunto de eventos durante el ciclo celular que comprometen a una célula a dividirse. Estos eventos incluyen la duplicación de los centríolos, gemación, iniciación de síntesis de ADN y la represión de la vía que lleva al apareamiento (Andrews, B. y Measday, V. 1998)

El control de *Start* ha sido muy bien caracterizado en *S. cerevisiae*. En levaduras, la regulación de la división por estímulos externos y la coordinación entre el crecimiento celular y la división ocurre en la fase G_1. Existen dos tipos de señales que frenan el ciclo en G_1: (1) limitación de nutrientes y (2) feromonas inductoras del apareamiento. Las células no pueden pasar por *Start* en condiciones de falta de nutrientes y están sujetas a quedarse en G_1 y entrar en G_0. En el caso de ser haploides las feromonas sexuales inducen el apareamiento. Por otro lado, el pasaje por *Start* esta coordinado con el crecimiento celular. La actividad de la CDC28 (CDC2) es la que controla el pasaje por *Start* y lleva a las células a dividirse. La CDC28 es activada por fosforilación y desfosforilación, y por asociación con ciclinas (Fig 6). Existen 3 ciclinas de G_1, CLN 1, 2 y 3 (tabla 1) (Richardson, H. E., y col. 1989). Estudios genéticos determinaron que estas proteínas tienen roles que se superponen. Cepas mutantes para dos de estas ciclinas son capaces de dividirse con un tamaño alterado, pero, cuando se eliminan las 3 ciclinas, las células se detienen en G_1 y no son capaces de pasar por *Start*. Por otro lado cuando se sobreexpresan o cuando se usan mutantes activadas, el pasaje por *Start* es más rápido (Andrews, B. y Measday, V. 1998). Existen diferencias entre la CLN 3 y las CLN 1 y 2. La expresión de las CLN 1 y 2 está regulada

a lo largo del ciclo celular, llegando a un máximo en la transición G_1/S y a un mínimo durante G_2/M (Wittemberg, C. y col. 1990). En cambio, la CLN 3 está presente durante todo el ciclo celular, aumentando su expresión al inicio de G_1 (Tyers, M. y col. 1993). La expresión periódica de los genes cln 1 y 2 depende del factor de transcripción SBF (*SCB binding factor*) (Ogas, J. y col. 1991). SBF es un heterodímero formado por las proteínas SWI4 y SWI6. Este complejo se une a una secuencia nucleotídica, conocida como caja del ciclo celular (SCB= *SWI4 cell cycle box sequence*), presente en regiones promotoras de ciertos genes que se activan en *Start*. Las regiones promotoras de los genes cln 1 y 2 tienen la secuencia SCB. Estudios genéticos sugieren que el complejo CLN3-CDC28 se activa cuando las células llegan a un tamaño determinado. Este complejo activa los factores de transcripción SBF y MBF los cuales, a su vez, activan la transcripción de genes involucrados en el pasaje de G_1/S y en la síntesis de ADN, incluyendo los genes cln 1 y 2 (Fig 6). MBF (*MCB binding factor*), al igual que SBF es un heterodímero formado por las proteínas SWI6 y MBP1 que se une a la secuencia MCB (*Mlu I cell cycle box*) presente en muchos promotores. Algunos genes activados por este factor de transcripción son: las ciclinas de la fase S, clb5 y 6 (Fig 6) y los genes involucrados en la síntesis de ADN, ADN polimerasa I (polI), timidilato sintetasa (tmp1) y ribonucleótido reductasa (rnr1) (Koch, C. 1993). El mecanismo por el cual el complejo CLN3-CDC28 activa a SBF y MBF no se ha determinado aún. El aumento de la concentración de las ciclinas CLN1 y 2, lleva a la formación y activación de los complejos CLN1,2-CDC28; existen evidencias que indican que en G_1 también es necesaria la actividad de CAK para la activación de la CDC28 (Sutton, A. y Freiman, R., 1997). Para poder pasar por *Start* e iniciar la replicación del ADN, es necesaria la activación de los complejos formados por CDC28 y ciclinas de la fase S, CLB5 y 6. Estos complejos se forman en G_1 tardío por aumento de la transcripción de las ciclinas CLB 5 y 6, pero son inactivados por la unión con el inhibidor SIC1 (Mendenhall, M. D. 1993). Existen evidencias que sugieren que una de las funciones principales de los complejos CLN1,2-CDC28 es la fosforilación de SIC1 (Fig 6) (Verma, R. y col. 1997). SIC1 fosforilado es ubiquitinado y degradado por un complejo formado por la enzima conjugadora de ubiquitinas CDC34 y las proteínas CDC4, CDC53 y SKP1 (Feldman, R.M. y col. 1997). De esta manera, se activan los complejos formados entre CDC28 y las CLB 5 y 6. Por otro lado, los complejos CLN1,2-CDC28 participan en la inhibición de la degradación de ciclinas B (Amon, A. y col. 1994; Dirick, L. y col. 1995), inhiben la capacidad de células haploides de responder a feromonas de apareamiento (Oehlen, L.J. y Cross, F.R. 1994) y disparan la polarización del citoesqueleto, evento necesario en *S. cerevisiae* para la formación de gemas (Lew, D.J y Reed, S. I. 1993). Todos estos eventos llevan al pasaje por *Start* y a la activación de la replicación del ADN (Fig 6).

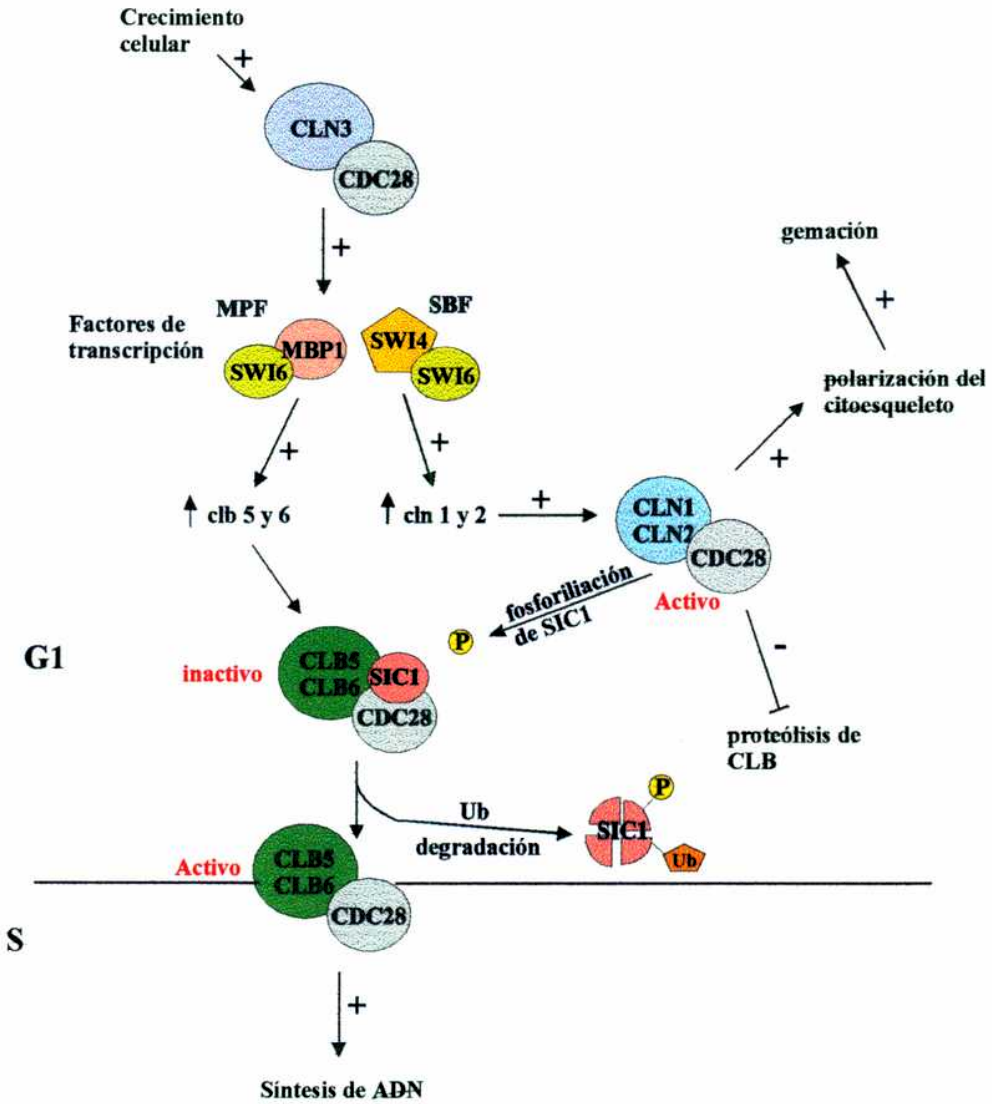


Figura 6. Regulación del pasaje G_1/S por CDC28 en *S. cerevisiae*.
El complejo CLN3-CDC28 se activa cuando las células llegan a un tamaño determinado. Este complejo activa los factores de transcripción SBF y MBF los cuales, a su vez, activan la transcripción de los genes cln 1 y 2 y clb5 y 6, respectivamente, llevando a la formación de los complejos CLN1,2-CDC28 y CLB5,6-CDC28. El complejo de CLB, es inactivado por SICI. El complejo CLN1,2-CDC28 fosforila a SICI, el cual es ubiquitinado y degradado, permitiendo la activación del complejo CLB5,6-CDC28. Por otro lado CLN1,2-CDC28 inhibe la proteólisis de CLB e induce la polarización del citoesqueleto

CDC2/CDC28 y las ciclinas B (CLB).

En *S. cerevisiae* se han descripto 6 ciclinas de tipo B, CLB 1-6 (tabla 1). La expresión de todas ellas varía a lo largo del ciclo celular. Como se ha explicado anteriormente, las primeras en ser transcriptas en G_1 tardío, son las ciclinas de la fase S, CLB 5 y 6. Su expresión está bajo el control del factor de transcripción MBF, el cual es activado por el complejo CLN3-CDC28 (ver arriba). Las ciclinas mitóticas, CLB 3 y 4, aparecen durante la fase S, y las CLB 1 y 2 en la fase G_2.

Las CLB 5 y 6 son necesarias para la correcta iniciación temporal de la replicación del ADN en la fase S. Al igual que para las ciclinas de G_1 (CLN) existen experimentos que muestran redundancia y superposición de funciones, haciendo difícil la identificación de roles específicos en el control del ciclo celular. Cepas mutantes para CLB 5 y 6 muestran que el ADN puede ser replicado bajo el control de las otras CLB (Epstein, C.B. y Cross, F.R., 1992; Kuhne, C. y Linder, P. 1993; Schwob. E. y Nasmyth, K. 1993). Por otro lado, CLB 5 puede promover la mitosis en cepas mutantes para las ciclinas clb3 y 4 (Schwob. E. y Nasmyth, K. 1993).

Las ciclinas mitóticas son CLB 1, 2, 3 y 4. Experimentos con cepas mutantes para estas cuatro proteínas mostraron que, en condiciones normales no participan en la replicación del ADN y que son necesarias para la formación del huso mitótico (Fitch, I. y col. 1992). La actividad de las CLB también es necesaria para frenar el crecimiento de la gema, el cual es iniciado en *Start* por las ciclinas de G_1 (Lew, D.J. y Reed, S.I. 1993). Por otro lado, existen evidencias que sugieren que los complejos de CLB-CDC28 estarían involucrados en la regulación de la localización del factor de transcripción SWI5. La proteólisis de las CLB en la transición metafase/anafase, permitiría la entrada de SWI5 al núcleo que activaría la expresión de genes, incluyendo la del inhibidor SIC1 (Knapp, D. y col. 1996; Toyn, J.H 1997). Otro posible factor de transcripción regulado por las CLB es SWI4, un componente de SBF (Fig 6), que regula la transcripción de las CLN 1 y 2. Se ha propuesto que SWI4 estaría asociado con complejos mitóticos de CDC28, inhibiendo de esta manera la actividad de SBF (SBF=SWI4/SWI6) (Amon, A. y col. 1993).

Las CLB son proteolizadas durante la mitosis. Antes de iniciar la anafase, el APC ubiquitina las ciclinas B, marcándolas para su degradación (Zachariae, W. y col. 1996).

Ciclina	Expresión durante el ciclo celular	Factores de transcripción que controlan su expresión.	Sustratos
CLN1, CLN2	G1 tardío	SBF	SIC1
CLN3	G1 temprano	MCM1	SBF ?
CLB1, CLB2	G2 tardío	MCM1	SWI4, CDC6, SWI5
CLB3, CLB4	S	¿?	SWI5
CLB5, CLB6	G1 tardío	MBF	CDC6?, ORC?, MCM?

Tabla 1. Ciclinas que regulan la actividad de la CDC28 de *S. cerevisiae*.
Se muestra la etapa en la cual cada una de las ciclinas es expresada durante el ciclo celular, los factores de transcripción que controlan su expresión y los sustratos que fosforila el complejo formado por la ciclina indicada y la CDC28. CLN, ciclina de G1; CLB, ciclina tipo B.

REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN.

El sistema de replicación del ADN más estudiado es el de *S. cerevisiae*. Durante la fase S, los cromosomas se replican una sola vez. La replicación es bidireccional y se inicia desde secuencias específicas en varios puntos del genoma (orígenes de replicación). Existe una secuencia esencial para la formación de un origen de replicación, denominada elemento A. Adyacente a esta secuencia hay 2 o 3 elementos, B1, B2 y B3, que individualmente no son esenciales, pero influyen en la frecuencia con que un origen es utilizado (Marahrens, Y. y Stillman, B. 1992). Los elementos A y B1 forman la secuencia central que es reconocida por un complejo de 6 proteínas, el complejo reconocedor del origen (ORC= *origin recognition complex*) (Bell, S.P. y Stillman, B. 1992). El elemento B3 funciona como *enhancer* de la replicación uniendo la proteína denominada ABF1 (*ARS binding factor*; ARS= *autonomously replicating sequence*) (Sweder, K.S. y col. 1988). El complejo ORC se une a los orígenes de replicación durante todo el ciclo celular, pero estos se disparan sólo una vez por ciclo en la fase S (Nasmyth, K. 1996). Las secuencias adyacentes al sitio de unión del ORC permanecen libres hasta G_1, donde son ocupadas por una proteína inestable denominada CDC6. Esta proteína junto con el ORC forman el complejo pre-replicativo (PRC= *pre-replicative complex*) necesario para disparar la replicación (Cocker, J.H. 1996). Existen otras proteínas necesarias para iniciar la replicación del ADN, denominadas MCM (MCM2-7) las cuales se unen a la cromatina al final de la mitosis (Stillman, B. 1996; Tanaka, T. y col. 1997). La proteína CDC6 puede formar complejos con CDC28, CLB5 y CLB2 y es fosforilada *in vitro* por CLB-CDC28 (Piatti, S., 1996; Elsasser, S. y col. 1996). No se ha determinado aún como es que las CLB de la fase S afectan la función de CDC6 o las proteínas MCM, pero su actividad es necesaria para iniciar la replicación de ADN e inhibir la formación de nuevos PRC (Dahmann, C. 1995).

LA FAMILIA CDK.

La proteína CDC2 fue la primer quinasa identificada cuya función está involucrada con la regulación del ciclo celular. En levaduras, la CDC2 regula tanto el pasaje de G_1 a S como la transición G_2/M. En cambio, en vertebrados las proteínas homólogas a CDC2 solo regulan la entrada en mitosis. Las otras etapas están controladas por proteínas relacionadas con la CDC2, tanto en la estructura primaria como en la capacidad de asociarse con proteínas de la familia de las ciclinas. Esta característica llevó a la formación de la familia de proteínas denominada quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La CDC2 se redenominó CDK1, pero actualmente se la sigue llamando CDC2. En células de mamíferos se han descripto 13 CDKs distintas: CDK1-8, PCTAIRE 1-3, PITAIRE y $p58^{GTA}$, de las cuales, algunas están directamente involucradas en la regulación del ciclo celular y otras en procesos biológicos diferentes, que incluyen, regulación de la transcripción, metabolismo del fosfato, etc. En levaduras de *S. cerevisiae* se han identificado, aparte de la CDC28, cuatro CDKs denominadas, PHO85, KIN28, SRB10 y CTK1 (Andrews, B. y Measday, V. 1998).

Desde la identificación del gen CDC2, en muchos organismos se han clonado genes relacionados con la CDC2, CRKs (*CDC2- related kinases*), los cuales presentan similitud con genes de la familia de las CDKs. La función de las proteínas codificadas por estos genes es poco clara y no necesariamente están involucradas en el control del ciclo celular.

Relación Estructura-Función.

En las proteínas CDC2, existen dominios conservados los cuales son importantes en la regulación de su actividad. Existen cuatro dominios principales aparte del dominio común a todas las quinasas del tipo serina/treonina (Fig 7). Uno de los dominios más característicos de este tipo de proteínas es el formado por los 16 aminoácidos EGVPSTAIREISLLKE, conocido como caja PSTAIRE. Esta secuencia esta implicada en la unión con ciclinas y debido que se encuentra cerca del dominio de reconocimiento de sustratos, se cree que la unión de ciclinas al dominio PSTAIRE participa en el reconocimiento de sustratos. Todos los miembros de la familia CDK tienen un motivo tipo PSTAIRE, el cual tiene modificaciones que las caracterizan y les confiriere la especificidad de unión con distintas ciclinas.

Otros dos dominios conservados son los que contienen los aminoácidos fosforilables que regulan la activación o inhibición de la CDC2. Los aminoácidos Tre14 y Tir15, que al ser fosforilados inhiben la actividad de la quinasa, se encuentran en el dominio de unión del ATP. Cabe aclarar que la Tre14 no es fosforilado en la CDC2 de levaduras. La fosforilación de la Tre161 en la CDC2 humana y las treoninas en posiciones equivalentes en CDC2 homólogas, deben ser fosforiladas para la activación de la quinasa. El análisis de secuencia de otras CDKs, mostró que estas quinasas tienen en posiciones equivalentes putativos residuos inhibitorios y activadores. La

CDK2, tiene un estructura primaria semejante a la de la CDC2. Esta quinasa es fosforilada y desfosforilada por las mismas proteínas que la CDC2. El estudio de la CDK2 cristalizada sugirió que la Tre161 estaría formando parte de un rulo con un plegamiento tal que inhibiría la unión de la quinasa a sustratos. La asociación con ciclinas desplazaría el rulo activando la quinasa, y la fosforilación de la Tre161 evitaría que el rulo vuelva a inhibir el sitio de unión del sustrato. Este modelo, también sugiere que tanto la unión con ciclinas como la fosforilación de la Tre161, induciría una reorientación de los fosfatos β y γ del ATP, de manera tal que pueda ocurrir la fosfotransferencia (Basi, G. y Draetta, G. 1995)

Otro dominio conservado es el conocido como caja DSEI, formado por los aminoácidos GDSEID. Esta región esta involucrada en el control de la fosforilación de la Tre161 y la unión con ciclinas. Este dominio no esta conservado entre las distintas CDKs, sugiriendo que existen distintas quinasas activadoras (CAK) para cada tipo de CDK.

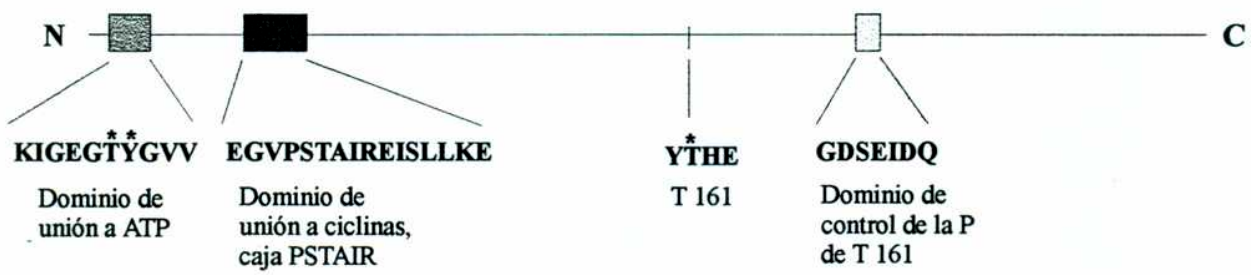


Figura 7. Diagrama representativo mostrando los dominios más conservados de proteína de la familia de las CDC2. Los asteriscos indican los aminoácidos que son fosforilados. N, anino-terminal; C, carboxi terminal.

COMPLEJOS CDKS-CICLINAS DE MAMÍFEROS Y LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

Consideraciones Generales.

En células de mamíferos, los múltiples complejos CDKs-ciclinas están regulados en los distintos puntos del ciclo celular por procesos muy diversos: transcripción, proteólisis, inhibición estérica, localización subcelular y fosforilación. Esta gran versatilidad de mecanismos permite integrar señales positivas y negativas y controlar así la proliferación celular.

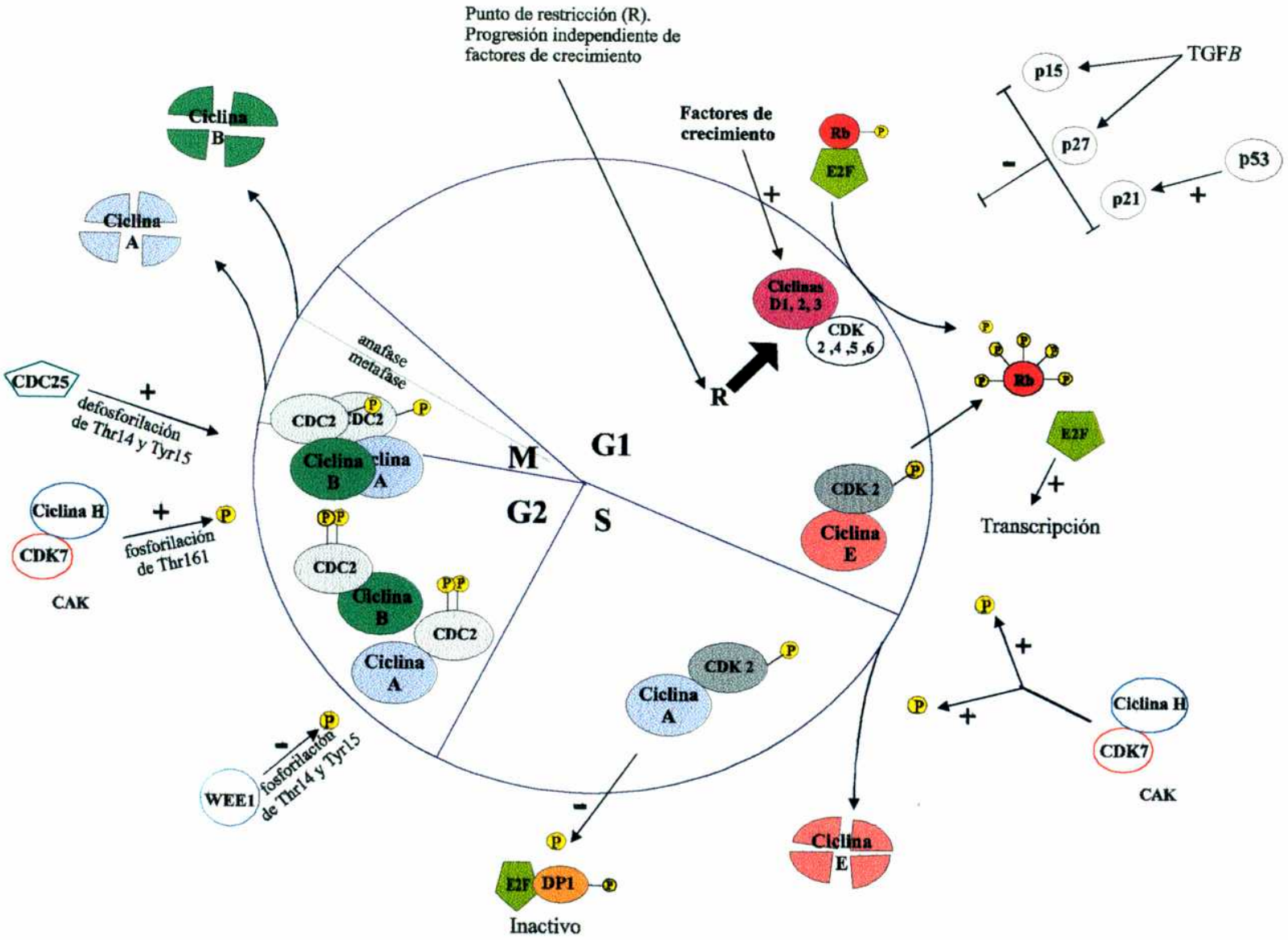
En células de mamíferos, al menos 7 de las CDKs identificadas tienen un rol en la regulación del ciclo celular. Las CDKs 4, 5 y 6 están involucradas en la fase G_1, la CDK2 en la transición G_1/S y la fase S, la CDC2 (CDK1) en la entrada en mitosis, y la CDK7 es la quinasa que activa la

CDC2 y CDK2, fosforilándolas en Tre161 o Tre160, respectivamente. Estas quinasas, al igual que la CDK de levaduras, son reguladas por la unión con distintas ciclinas, proteínas inhibitorias y fosforilación de aminoácidos específicos. En células de mamíferos se han identificado un gran número de ciclinas, A-H. Las que actúan en G_1 son las ciclinas C, D y E (ciclinas de G_1) y las involucradas en la entrada en mitosis son las ciclinas A y B (ciclinas mitóticas). La ciclina H es la subunidad regulatoria de la CDK7. Las ciclinas G y F no se pueden ubicar en ninguna de estas categorías, pero existen evidencias que indican que la ciclina F regula eventos del ciclo celular diferentes a los que regulan las otras ciclinas (Bai C. y col. 1994) y la ciclina G estaría involucrada en el control del pasaje de G_2/M (Shimizu, A. y col. 1998). A nivel de estructura primaria existen diferencias entre las ciclinas de G_1 y las mitóticas, que tienen importancia en la estabilidad de las mismas en el ciclo celular. Las ciclinas de G_1 tienen una vida media muy corta. En su extremo carboxi-terminal tienen la secuencia PEST, la cual estaría involucrada en la degradación de proteínas. Las ciclinas mitóticas, A y B, son estables durante la interfase, pero son rápidamente degradadas durante la mitosis por un mecanismo dependiente de ubiquitinas (ver Salida de Mitosis).

Al igual que la CDC2, la CDK2 tiene aminoácidos activadores e inhibidores que deben ser fosforilados y desfosforilados, respectivamente, para activar la quinasa. Las CDK4, 5 y 6 tienen aminoácidos regulatorios en posiciones equivalentes pero no se conocen aún los mecanismos de regulación por fosforilación. A diferencia de la CDC2 y CDK2 de eucariotas superiores, estas quinasas no tienen la Tre14 inhibitoria equivalente, solo aparece la tirosina en el sitio de unión del ATP (Pines, J. y Hunter, T. 1995).

La figura 8 muestra un esquema de la regulación del ciclo celular en células de mamíferos. A continuación se detalla la participación de cada complejo en la regulación del ciclo celular.

Figura 8. Esquema de la regulación del ciclo celular en células de mamíferos.
Factores de crecimiento estimulan la síntesis de ciclinas D las cuales activan la CDK4/6, y permiten el pasaje por el punto de restricción R. El complejo CycD-CDK4/6 fosforila la proteína Rb. Rb fosforilado libera el factor de transcripción E2F, permitiendo la transcripción de genes involucrados en la síntesis de ADN. TGFβ previene la entrada en S por activación de los inhibidores p15 y p27. Daños en el ADN, activan la transcripción del inhibidor p21 vía el factor de transcripción p53. La síntesis de la ciclina E es máxima en la transición G1/S, activando el complejo CycE-CDK2 el cual fosforila Rb y la proteína p107, liberando los factores de transcripción E2F. Al entrar en S, comienza la síntesis de ciclina A, activando el complejo CycA-CDK2. Este complejo permite la progresión de la síntesis de ADN y fosforila el complejo de transcripción E2F-DP1 inhibiendo su actividad. En G2 la ciclina A se une a la CDC2. En G2 comienza la síntesis de ciclina B la cual se asocia con la CDC2. Estos complejos son inactivados por la quinasa WEE1 al fosforilar los aminoácidos Tre14 y Tir15. Antes de entrar en mitosis, el complejo se trasloca al núcleo, la CAK (CDK7-CycH) fosforila a la CDC2 en Tre161 y la fosfatasa CDC25 remueve los fosfatos en Tre14 y Tir15. La ciclina A es degradada en mitosis temprana y la degradación de la ciclina B es necesaria para el pasaje a anafase.


Punto de restricción (R).
Progresión independiente de factores de crecimiento
Factores de crecimiento
TGFB
p15
p27
p21
p53
Rb
E2F
Ciclinas D1, 2, 3
CDK 2 ,4 ,5 ,6
R
Ciclina B
Ciclina A
anafase
metafase
M
G1
G2
S
CDC25
defosforilación de Thr14 y Tyr15
CDC2
Ciclina B
Ciclina A
Ciclina H
CDK7
CAK
fosforilación de Thr161
CDK 2
Ciclina E
Transcripción
WEE1
fosforilación de Thr14 y Tyr15
Ciclina A
CDK 2
Ciclina H
CDK7
CAK
E2F
DP1
Inactivo
Ciclina E

CDK4-Ciclinas D.

Existen 3 tipos de ciclinas D, D1, D2 y D3. Estos 3 tipos de ciclinas varían en cantidad en diferentes tejidos y tipos celulares. La función de las 3 ciclinas D no es redundante. Las ciclinas D se pueden unir a la CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6, pero la actividad del complejo formado con la CDK4 es la más importante para la proliferación celular. Estos complejos actúan en G_1 medio y tardío permitiendo la entrada en S. La transcripción del ARNm de ciclinas D está regulada por factores de crecimiento. Al remover éstos del medio, la transcripción de las ciclinas D baja rápidamente y, debido a la vida media corta de las mismas, los niveles proteicos disminuyen bruscamente. La sobreexpresión de estas proteínas está correlacionada con transformación celular. Se ha demostrado que en muchos tipos de tumores existe amplificación de estos genes (Pines, J y Hunter, T. 1995)

El complejo CycD-CDK4 fosforila la proteína retinoblastoma, inactivándola. La proteína Rb hipofosforilada une factores de transcripción de la familia de E2F. Al ser fosforilada en G_1 tardío, se disocia de los mismos, permitiendo la transcripción de genes involucrados con al síntesis de ADN. Existen evidencias que sugieren que la principal función de este complejo sería la fosforilación de Rb.

CDK2-Ciclina E.

La ciclina E se une principalmente a la CDK2 y esta involucrada en la regulación de la transición de G_1/S y en la iniciación de la replicación del ADN. Los niveles de ciclina E y la actividad del complejo CycE-CDK2 llegan a un máximo en la transición de G_1/S y disminuyen durante la fase S (Dulic, V. y col. 1992). Esta proteína se une a la proteína relacionada con retinoblastoma, p107, la cual, al igual que Rb, se une a factores de transcripción de la familia de E2F, inhibiendo su actividad. Existen evidencias que indican que la asociación de la ciclina E al complejo p107-E2F, permitiría la activación de la transcripción vía E2F. Por otro lado el complejo de cycE-CDK2 también fosforila Rb manteniéndolo en su estado hiperfosforilado e inhibiendo así su asociación con proteínas E2F.

Células que sobreexpresan ciclina E, acortan los tiempos de las fases G_1 y S y disminuyen los requerimientos de factores de crecimiento para la replicación (Ohtsubo, M. y Roberts, J.M. 1993). Por otro lado se ha detectado una amplificación de la ciclina E en varios tumores de mama (Keyomarsi, K. y Pardee, A.B. 1993).

CDK2/CDC2-Ciclinas A.

Existen dos tipos de ciclinas A, A1 y A2. Las ciclinas A1 están involucradas en meiosis mientras que las A2 en el ciclo celular mitótico. La síntesis de ciclina A2 comienza cuando las células

entran la fase S y en este punto se encuentra asociada únicamente con la CDK2 (Tsai, L.H. y col. 1991). Existen evidencias que indican que el complejo de ciclina A-CDK2 está involucrado en la progresión de la síntesis del ADN y no en la iniciación de la replicación. Por otro lado, se ha demostrado que la actividad de ciclina A-CDK2 regula la transición S/G_2. Este complejo es capaz de unirse y fosforilar el complejo de transcripción E2F1-DP1, inhibiendo su actividad (Krek, W. y col. 1994). Cuando las células entran en la fase G_2, la ciclina A se asocia con la CDK1 (Pagano, M. y col. 1992). Un posible rol para los complejos CycA-CDK1,2 en G_2 sería el de la reorganización del citoesqueleto para entrar en mitosis.

CDC2-Ciclinas B.

Existen dos tipos de ciclinas B, B1 y B2. La transcripción de estas ciclinas aumenta en G_2 y son capaces de asociarse solo con la CDC2 (CDK1). Durante las fases S y G_2, los complejos ciclina B-CDC2 se acumulan en el citoplasma asociándose con los centrómeros (Bailly, E. y col. 1992). Al comienzo de la profase, los complejos ciclina B-CDC2 entran en el núcleo. Existen evidencias que sugieren que la actividad de los mismos sería la responsable de la ruptura de la envoltura nuclear por fosforilación de la lamina (Peter, M. y col. 1990). Una vez en el núcleo, el complejo se asocia con el huso mitótico; existen evidencias que sugieren que la actividad de los mismos es importante en la reorganización de los microtúbulos durante la mitosis (Verde, F. y col. 1992).

La regulación de la actividad del complejo ciclina B-CDC2 está explicado en la sección Regulación de la transición G_2/M y Salida de mitosis. A diferencia de la CDC2 de levaduras, la CDC2 de mamíferos tiene dos aminoácidos inhibitorios, la Tir15 y la Tre14, y el aminoácido activador es la Tre 161.

Regulación de los complejos Cyc-CDKs por inhibidores específicos (CKI).

La actividad de los complejos ciclina-CDKs también está controlada por la unión con proteínas inhibitorias, CKI (CKI= *CDK inhibitors*). Estos inhibidores se pueden separar en dos subfamilias de acuerdo a similitud aminoacídica y función: (1) la subfamilia denominada INK4 (INK4= *inhibitors of CDK4*), formada por $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INKc}$ y $p19^{INK4d}$ (Serrano, M. y col. 1993; Hirai, H. y col. 1995) bloquean los complejos formados por ciclinas D-CDK4/6, frenando el ciclo celular en G1; (2) la subfamilia de KIP/CIP que incluyen a $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ y $p57^{KIP2}$, son inhibidores capaces de unirse e inhibir varios complejos ciclina-CDK (Hartwell, L., 1995; Lee, M.H. y col. 1995)

Los inhibidores tipo INK4, poseen una secuencia repetida de anquirinas, las cuales están involucradas en interacciones proteína-proteína. Estos inhibidores se unen a CDK4/6,

desplazando la unión con ciclinas D (Serrano, M. y col. 1993; Hirai, H. y col. 1995). Los inhibidores p16 y p15 mapean en el locus 9p21, región implicada en tumorogénesis en varios tipos de cánceres. Se ha observado que los niveles de p15 aumentan en células tratadas con TGFβ frenando el ciclo en G_1 (Hannon, G.J. y Beach, D. 1994).

Los inhibidores de la subfamilia KIP/CIP pueden unirse tanto a los complejos ciclinas-CDKs como a las subunidades aisladas. Los miembros de esta subfamilia tienen una identidad de 38-44% en sus porciones N-terminal, las cuales están involucradas en la unión e inhibición de los complejos. La transcripción de $p21^{CIP1}$ es controlada por el gen supresor p53. Los niveles de $p21^{CIP1}$ aumentan en células en G_0, células senescentes y células que han sido irradiadas en la fase G1. En condiciones en las cuales el ADN es dañado, el factor de transcripción p53 se estabiliza, activando la transcripción de $p21^{CIP1}$ y bloqueando las células en G_1. El inhibidor $p27^{KIP1}$ está involucrado en el control del punto de restricción (R). Los niveles de $p27^{KIP1}$ son altos en células en G_0 y bajan cuando entran en el ciclo celular, manteniéndose constantes a lo largo del mismo. Existen evidencias que indican que $p21^{CIP1}$ y $p27^{KIP1}$ inhiben la actividad de CAK, bloqueando la fosforilación del aminoácido activador en las CDKs. p27KIP1 está involucrado en la inhibición del ciclo celular inducido por TGFβ (Toyoshima, H. y Hunter, T. 1994;) por un mecanismo que incluye al inhibidor $p15^{INK4b}$ (Reynisdottir, I. y col. 1995).

CDKs y Ciclinas Involucradas En Procesos Diferentes Al Ciclo Celular.

Las CDKs y ciclinas fueron identificadas por su rol en la regulación del ciclo celular. Luego del clonado de la primer CDK, la CDC2, se identificaron, en muchos organismos, proteínas pertenecientes a la familia de las CDKs cuyas funciones no están del todo determinadas. Por otro lado, se clonaron genes que pertenecen a la familia de las cdks o ciclinas, cuyas proteínas participan en procesos biológicos diferentes a la regulación del ciclo celular. Estos procesos incluyen mecanismos tan diversos como, regulación de la transcripción, la inhibición de la síntesis de glucógeno y la inhibición de la expresión de genes que participan en el metabolismo del fosfato.

El complejo CDK7-Ciclina H y la regulación de la transcripción.

La transcripción de genes que codifican proteínas requiere de la formación, en la región promotora de los genes, de un complejo formado por la ARN polimerasa II y factores de transcripción basales, denominados TFII (TF= *transcription factors*). El factor de transcripción basal TFIIH es un complejo mutliproteico con varias funciones. Entre sus funciones, fosforila el dominio carboxi-terminal (CTD= *carboxi-terminal domain*) de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II y participa en la reparación del ADN. En células de mamíferos se ha determinado que el complejo CDK7-ciclina H, el cual forma la CAK (*CDK activating kinase*; ver arriba), es

un componente de TFIIH y sería el responsable de la fosforilación de CTD y participaría en mecanismos de reparación (Poon, R. Y., y Hunter, T. 1995). A diferencia de CAK, el complejo CDK7-ciclina H formando parte de TFIIH, tiene otra proteína unida denominada MAT1 (MAT= *Ménage a Trois*). Esta proteína estabiliza el complejo, aumentando la actividad quinasa del mismo y, por otro lado, le confiere especificidad de sustrato hacia la fosforilación de CTD vs. la de CDKs (Yankulov, K.Y. y Bentley, D.L. 1997). La actividad del complejo CDK7-ciclina H llevó por primera vez a relacionar la regulación del ciclo celular con el control de la transcripción y reparación, pero no se ha podido establecer aún el mecanismo por el cual este complejo relaciona estos procesos.

Complejos PHO85-Ciclinas.

En *S. cerevisiae* se ha descripto una quinasa perteneciente a la familia de las CDKs, denominada PHO85, cuya actividad no es esencial para la viabilidad de las células. Esta CDK es capaz de asociarse con al menos 10 ciclinas diferentes (PHO80, Clg1, PCL1, 2, 5-10). Los complejos formados por PHO85 y distintas ciclinas están involucrados en varios procesos biológicos que incluyen, la regulación de ciertas etapas del ciclo celular, la expresión del gen para la fosfatasa ácida y la actividad de la glucógeno sintetasa.

PHO85-PHO80 en la regulación del metabolismo del fosfato.

La quinasa PHO85 fue descripta por primera vez por su participación en la regulación de la expresión de la fosfatasa ácida, proteína conocida como PHO5. La transcripción del gen pho5 es activada por los factores de transcripción PHO2 y PHO4. En condiciones de alto fosfato, el complejo CDK- ciclina, formado por la quinasa PHO85 y la proteína del tipo ciclina, PHO80, fosforila el factor de transcripción PHO4. Se ha demostrado que PHO4 no fosforilado está localizado en el núcleo y es capaz de activar la transcripción de pho5; en cambio, cuando PHO4 está fosforilado se localiza en el citoplasma no pudiendo activar la expresión de la fosfatasa ácida (Fig. 9) (O'Neill, E. M. y col. 1996). La actividad del complejo PHO85-PHO80 es inhibida por la proteína PHO81. Este inhibidor se encuentra unido al complejo tanto en condiciones de alto como de bajo fosfato. Se ha determinado que en condiciones de alto fosfato, PHO81-PHO80 están asociados con el factor de transcripción PHO4, pero, en medios con bajo fosfato, PHO4 se disocia del complejo permitiendo la transcripción de pho5. En estas condiciones, PHO81 inhibe la actividad de PHO85, disminuyendo la fosforilación de PHO4 (Poon, R. Y. C. y Hunter, T., 1995).

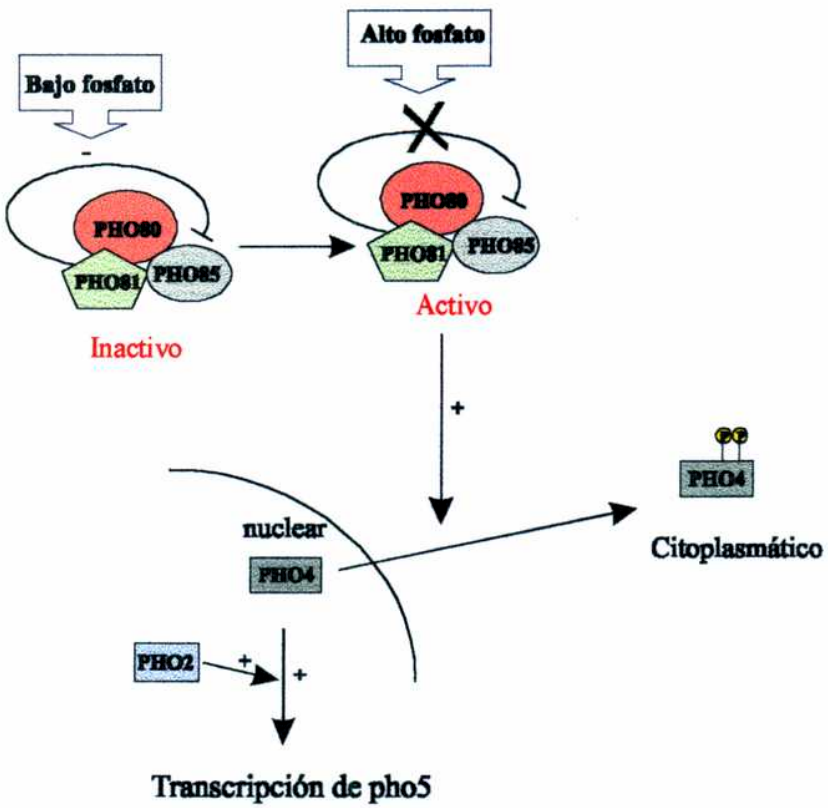


Figura 9. Regulación del metabolismo del fosfato por el complejo CDK-Ciclina, PHO85-PHO80. En condiciones de bajo fosfato, la actividad del complejo PHO85-PHO80 esta inhibida por PHO81. El factor de transcripción PHO4 no fosforilado esta en el núcleo, activando, junto con el factor de transcripción PHO2, la transcripción de pho5 (fosfatasa ácida). En condiciones de alto fosfato, PHO81-PHO80 se unen a PHO4, PHO81 pierde su capacidad de inhibir la actividad de PHO85-PHO80. Este complejo fosforila PHO4 el cual se trasloca el citoplasma no pudiendo activar la transcripción de pho5.

PHO85-PCL8 y 10 en la regulación de la glucógeno sintetasa.

La síntesis del glucógeno requiere de varias enzimas, siendo la glucógeno sintetasa la enzima limitante en esta vía metabólica. La fosforilación de esta proteína lleva a la inhibición de la actividad de la misma y a la inhibición de la síntesis de glucógeno. Experimentos utilizando cepas Δpho85 demostraron que la proteína PHO85 no es esencial para la viabilidad de las células, pero presentan varias alteraciones fenotípicas. Entre ellas, se observa la hiperacumulación de glucógeno por falta de fosforilación de la glucógeno sintetasa.

Experimentos posteriores demostraron que la CDK PHO85 es la quinasa responsable de la fosforilación de 2 de los 3 sitios fosforilados de la glucógeno sintetasa, siendo PCL8 y PCL10 las ciclinas que regulan esta actividad (*PCL=PHO85 cyclin*) (Huang, D., y col. 1998).

PHO85-PCL1,2 y 9 en el ciclo celular.

PHO85 no es esencial para la viabilidad de la células pero en ausencia de las ciclinas CLN1 y CLN2, (Ver arriba) los complejos de PHO85 formados con las ciclinas PCL1 y 2 son esenciales para pasar por el punto *Start*. Tanto la deleción de pho85 como la de las ciclinas pcl1 y 2 frenan el ciclo en G_1 cuando CLN1 y 2 están ausentes. Por otro lado se ha determinado que la expresión de PCL1 y 2, al igual que CLN1 y 2, llegan a sus niveles máximos en G_1, y su transcripción esta controlada por el mismo factor de transcripción, SBF (Andrews, B. y Measday, V. 1998). Otra ciclina de PHO85, PCL9, aumenta su expresión en mitosis tardía/G_1 temprana sugiriendo un posible rol del complejo PHO85-PCL9 en el control del pasaje M/G_1 (Tennyson, C.N. y col 1998).

CDK-CICLINAS DE TRIPANOSOMÁTIDOS.

El control del ciclo celular en tripanosomátidos (tripanosomas, leishmania y Crithidia) juega un rol importante no solo en la proliferación celular sino también en el sistema de desarrollo que controla la transferencia del parásito entre distintos huéspedes. El ciclo de vida de estos protozoos incluye estadíos con división celular y otros sin división celular. Otra característica importante en la biología de los mismos es la necesidad de replicar y segregar el núcleo, el kinetoplasto y el flagelo solo una vez durante cada ciclo celular. Estudios que analizaron la iniciación y el tiempo de duración de la fase S en la forma replicativa de *T. brucei*, determinaron que la replicación del ADN del kinetoplasto y la del núcleo no está totalmente sincronizada, ambas comienzan al mismo tiempo, pero la replicación del ADN del kinetoplasto finaliza antes. Tanto los mecanismos que controlan la coordinación de la replicación del ADN nuclear y del kinetoplasto, como cada una de las etapas del ciclo celular y la diferenciación en tripanosomas no se han determinado aún.

El auge del estudio del control del ciclo de división celular en células eucarióticas y el descubrimiento de las CDKs, ciclinas e inhibidores de CDK (CDI) llevó a investigar si en tripanosomátidos existen proteínas homólogas a las ya descriptas que regulen el ciclo celular y el ciclo de vida de éstos. Por técnicas de biología molecular se han podido identificar genes relacionados a la quinasa CDC2 "CRKs" (CDC2 *related kinases*). Genes crks fueron clonados en *L. mexicana*, lmmcrk1 (Mottram, J. y col 1993) y lmmcrk3 (Grant, K., y col.1998), *L. major*, lmajcrk3 (Wang, Y. y col. 1998), *T. brucei*, tbcrk1, 2 y 3 (Mottram, J. y Smith G. 1995), *T.congolense*, tccrk1 (N.B. Murphy, comum. pers.) y *Crithidia fasiculata*, cfcrk4 (Brown, L. y

col. 1992) (tabla 2). La nomenclatura utilizada para nombrar estos genes se basó en los genes clonados de *T. brucei*. En este protozoo los genes crk se denominaron de acuerdo al tiempo en que fueron clonados, crk1, 2 y 3. Los genes de los otros tripanosomátidos fueron nombrados según la identidad presentada con la secuencia aminoacídica deducida de los genes de *T. brucei*. Las secuencias nucleotídicas de todos los genes crk1 de tripanosomátidos, clonados hasta el momento, codifican para proteínas con 301 aa con peso molecular de 33 kDa. La identidad aminoacídica entre las proteínas CRK1 varía entre 72 y 89 %. La identidad con las CDC2 humana y de levaduras varía entre 51 y 54 % (tabla 2), mientras que con la TbCRK2 es de 40-41% y con las CRK3 es de 44-45%.

Organismo	Nombre del gen	Número de aa	PM (kDa)	Identidad con HsCDC2 (%)
humano	hscdc2	297	34	100
L.mexicana	lmmcrk1	301	34	53
T. congolense	tccrk1	301	34	52
T. brucei	tbcrk1	301	34	51
T. brucei	tbcrk2	345	39	42
T. brucei	tbcrk3	311	35	50
L. mexicana	lmmcrk3	311	35	50
L. major	lmajcrk3	311	35	50
C. fasciculata	cfcrk4	474	54	~ 46

Tabla 2. Genes CRKs clonados en Tripanosomátidos.

Hasta el momento solo se ha clonado un tipo de crk2, tbcrk2, que codifica para una proteína de 39 kDa. Su región amino posee una extensión de 40 aminoácidos comparando con la secuencia de las CDC2 humana y de levaduras. Esta proteína tiene 42 % de identidad con la CDC2 humana (tabla 2) y entre 47 y 50 % con las CRK3.

Los genes crk3 codifican para proteínas de 35 kDa. La identidad aminoacídica entre estas proteínas varía entre 77 y 99 % (99 %, es la identidad entre LmmCRK3 y LmajCRK3) y tienen una identidad del 50% con HsCDC2. Todas las proteínas CRK3, al compararlas con la CDC2, tienen una extensión de 19 aminoácidos en su región amino-terminal. La secuencia de esta región esta poco conservada, teniendo solo un residuo común, una arginina en posición 10.

El gen cfcrk4 codifica para una proteína de 53 kDa. que posee dos insertos, de 66 y 77

aminoácidos. La función de estos dominios en la proteína de Crithidia no ha sido determinada aún. Al comparar los dominios con homología, la identidad de CfCRK4 con la HsCDC2 es de aproximadamente 46%.

El porcentaje de identidad entre las CRKs de tripanosomátidos y las diferentes CDKs es muy similar, por lo cual no se puede predecir cual es la función de estas proteínas en el ciclo celular. Proteínas con homología a la CDC2 se han clonado por complementación funcional de levaduras mutantes para esta proteína (CDC2 en *S. pombe* o CDC28 en *S. cerevisiae*). Un experimento clásico para determinar si algún gen con identidad a genes de la familia de la cdc2 es el homólogo, es estudiar si las proteínas codificadas por los mismos son capaces de complementar levaduras mutantes termosensibles para CDC2/CDC28. Experimentos realizados con LmmCRK1 y 3 y TbCRK1, 2 y 3 mostraron que ninguna de estas quinasas es capaz de complementar la función de la CDC2 (Mottram, J. 1994; Grant, K., y col. 1998). En un trabajo recientemente publicado, se determinó que la CRK3 de *L. major* es capaz de rescatar levaduras mutantes de *S. pombe* termosensibles para la CDC2. En estos experimentos, el gen lmajcrk3 fue subclonado bajo el control de un promotor fuerte inducible. Los autores observaron que cuando los niveles de expresión de la LmajCRK3 eran altos, ésta inhibía el crecimiento de las levaduras mutantes a la temperatura permisiva, indicando que interfería específicamente con la función de la CDC2. Al disminuir los niveles de expresión de la proteína de *L. major*, ésta fue capaz de complementar la actividad de la CDC2 sugiriendo que es su homóloga funcional (Wang, Y. y col. 1998).

La proteína LmmCRK1 se expresa en los tres estadíos del parásito, promastigote, metacíclico y amastigote. Esta proteína es capaz de fosforilar *in vitro* la histona H1, que es un sustrato utilizado para estudiar la actividad quinasa de proteínas de la familia de la CDC2. A pesar de que está presente en los tres estadíos del parásito en cantidades equivalentes, se encontró una alta actividad en la forma replicativa promastigote, baja actividad en la forma no replicativa metacíclica y sin actividad en la forma replicativa amastigote (Mottram, J. y col. 1993). Experimentos de Southern blot mostraron que lmmcrk1 es un gen de copia única. Al intentar hacer el knock-out para este gen, fue imposible obtener mutantes nulas, sugiriendo que la función de esta quinasa es esencial para el parásito. Por otro lado, estos mismos autores, mostraron que la actividad de la CRK1 de *T. brucei* puede complementar la función de la CRK1 de *L. mexicana* (Mottram, J., y col. 1996).

En *Leishamania mexicana*, también se ha clonado un gen cuya proteína tiene identidad con la proteína p13SUC1. La proteína p13SUC1 fue primero identificada en levaduras de *S. pombe* y luego se vio que estaba presente en *S. cerevisiae*, denominada CKS1, y en células humanas, donde se clonaron dos tipos, ckshs1 y ckshs2 (Richardson, H., y col 1990). Estas proteínas, denominadas CKS, conforman una familia muy conservada a lo largo de la evolución, cuyos PM varían entre 9 y 18 kDa. Son esenciales para la viabilidad de las células y se unen

específicamente con la CDC2 y CDK2. Estudios realizados con p13SUC1 demostraron que *in vitro* esta proteína tiene una alta afinidad por la CDC2 pero que *in vivo* sólo un pequeño porcentaje se encuentra asociada. Esta característica llevó a utilizar la proteína p13SUC1, unida a agarosa, para purificar proteínas tipo CDC2 de distintos organismos. Experimentos utilizando p13SUC1-agarosa mostraron que en extractos de *L. mexicana* existe una actividad quinasa que precipita con p13SUC1. La putativa CRK recibió el nombre de SBCRK (*SUC1 binding CRK*) y es activa solamente en las formas replicativas del parásito. Por otro lado, en *L. mexicana*, se clonó y caracterizó el gen p12cks1, que es el homólogo de p13suc1. Ensayos con levaduras mutantes para p13SUC1 mostraron que p12CKS1 de leishmania complementa la actividad de p13SUC1. La proteína p12CKS1 es capaz de unirse con alta afinidad a SBCRK de leishmania y a las CDC2 de levaduras y mamíferos (Mottram, J. y Grant, K. 1996). La CRK1 de *L. mexicana* no se une a p13SUC1 pero sí es capaz de asociarse con p12CKS1, indicando que SBCRK no es LmCRK1. En cambio, LmCRK3 se asocia con p13SUC1 y con p12CKS1 sugiriendo que podría ser la SBCRK. Otra evidencia que sugiere esto es que tanto LmCRK3 como SBCRK tienen un PM de 35 kDa (Grant, K., y col. 1998). Estos resultados indican que varias CRKs son capaces de unirse con p12CKS, como se ha demostrado para la CKS1 humana, la cual se asocia con alta afinidad a la CDC2 y CDK2 y débilmente con CDK3. Por otro lado, al igual que para el gen lmcrk1, lmcrk3 es un gen de copia única y tampoco fue posible construir el knock-out del mismo, sugiriendo que su proteína es esencial para la viabilidad de la célula. Experimentos realizados con la CRK3 de *L. major*, mostraron que la actividad de una proteína recombinante, HA-LmajCRK3, expresada en la forma promastigote, tiene una alta actividad quinasa en la fase logarítmica de crecimiento y baja en la fase estacionaria (Wang, Y., y col. 1998)

En *T.brucei* también se clonó un gen, denominado cyc1, cuya secuencia aminoacídica deducida presenta similitud con las ciclinas mitóticas A y B. Por ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti CYC1 se observo que junto con esta proteína co-precipitaba una proteína de 34 kDa que presentaba actividad quinasa. Por otro lado, esta ciclina fue capaz de complementar la función de la ciclina CDC13 de *S. pombe* y se determinó que sus niveles varían a lo largo del ciclo celular (Affranchino, J., y col 1993). Este último resultado es muy controvertido ya que en el trabajo de Affanchino, los parásitos fueron sincronizados con hidroxiurea y otro grupo demostró que *T. brucei* no puede ser sincronizado con este reactivo y mostró que al emplear las condiciones de sincronización publicadas, los niveles proteicos de CYC1 se mantenían constantes (Hua, S., y col. 1997). Este mismo grupo, mostró que los niveles de CYC1 son 3 veces mayores en la forma procíclica que en la sanguínea, y que los niveles aumentan durante la diferenciación de la forma sanguínea a la procíclica, sugiriendo un rol de esta proteína en la diferenciación (Hua, S., y col. 1997).

MATERIALES Y METODOS

1 - CEPAS BACTERIANAS DE *E. COLI* UTILIZADAS.

DH5αF': F'/endA1 hsdR17(r_k^- m_k^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF)$_{U169}$ (m80lacZΔM15).

HB101: Δ(gpt-proA)62 leuB6 thi-1 lacY1 hsdS_B20 recA rpsL20 (Str^r) ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB_B

BL21/Lys: F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal (DE3) dcm pLysS, (cam^R)

2 - ANTICUERPOS COMERCIALES UTILIZADOS.

- Anticuerpos policlonales de conejo, IgGs (Santa Cruz): cycA (C-19), cycE (M-20), cycD$_2$ (M-20), cycD3 (C-16), PSTAIRE (Sc-53).
- Anticuerpos monoclonal de ratón, IgG$_1$: cycD$_1$ (HD11) (Santa Cruz), HA (BAPTO)

3 - OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Sec. aminoacídica que codifica

3.1-Oligonulceótidos generales.

EL-1: sentido 5'-GGIGA(A/G)GGIACITA(T/C)GG (GEGTYG)
EL-2: sentido 5'-GA(A/G)GGIGTICCI(A/T)G(T/C)ACIGCIAT (EGVPSTAI)
EL-3: antisentido 5'-IGG(T/C)TTIA(G/A)(A/G)TCIC(G/T)(A/G)TG (HRDLKP)
EL-4: antisentido 5'-(A/G)TACCAIA(G/A)IGTIACIAC (VVTLWY)

ME: sentido 5'-AACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG

5'pVP16 SP: 5'-GGAATTGACGAGTACGGT
T3: 5'-ATTAACCCTCACTAAAG
T7: 5'-AATACGACTCACTATAG

3.2- Oligonucleótidos utilizados para el clonado de tzcrk1:

TC1et2a: antisentido 5'- CTCTCTAATGGCAGTGCATGG (PCTAIRE)
TC1et2-I: antisentido 5'- GGCACCCCTTCCTCTTCTGT (TEEEGVP)
TC1et2-II: antisentido 5'- ATCAAGACGAATGCGCTTCA (LKRIRLD)
TC1et2-III: antisentido 5'- ACAGTGGCACCCGTAGCTGT (TATGATV)

TC1et3-I: sentido 5'- GATCAGGAAGAGGGCAATTT (DQEEGNL)
TC1et3-II: sentido 5'- CAAGACTTCATGCGGGAC (QDFMRD)
TC1et3-III: sentido 5'-AATGGAGTGCGATTTTGTTC (NGVRFCS)

TC1-5': sentido 5'-TCGCGGATCCATGAGCACTCGATACGAGCG (MSTRYER)
TC1-3':antisentido 5'-AAAAGGCCTTCAAAACTCCACGGAAAAGTACG (PYFSVEF)

3.3- Oligonucleótidos utilizados para el clonado de tzcrk3:

TC3et2:antisentido 5'-TTCTCGAAGAGCCGTTTGAGG (PQTALRE)

TC3et3-I: sentido 5'- AGGGGCTGTACTTTTACAGG (RGCTFTG)
TC3et3-II: sentido 5'- CAGCTTCTTGATGGTCTATT (QLLDGLF)
TC3et3-III: sentido 5'- TGCCACAGACATCGAATTGT (CHRHRIV)

TC3-5': sentido 5'-TCGCGGATCCATGACTACTCTCACTACCTTGC (MTTLTTL)
TC3-3':antisentido 5'-AAAAGGCCTTTACGTTCTAATTTCACTGAACC (WFSEIRT)

4 - PARÁSITOS.

Se utilizaron principalmente formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahén, población Tul 2. En algunos experimentos se utilizaron epimastigotes de las cepas RA o CLE. Se usaron amastigotes y tripomastigotes de las cepas RA o CLE. En los ensayos de localización se utilizaron amastigotes de la cepa Miranda, clon 83 (M/83).

El cultivo de epimastigotes se efectuó en un medio modificado de Engel o en medio LIT a 30°C. Los amastigotes y tripomastigotes de la cepa RA fueron cedidos gentilmente por la Bqca. Berta Cazzulo. Los mismos se obtuvieron de cultivos celulares en monocapa de células Vero (Andrews y Colli, 1982).

Los amastigotes y tripomastigotes de la cepa CLE se obtuvieron por infección de células NIH3T3 cultivadas en medio DMEM+2% suero fetal bovino. Los amastigotes se separaron de los tripomastigotes por precipitación con un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno de superficie, presente únicamente en la forma amastigote.

Los amastigotes M/83 fueron obtenidos de cultivos axénicos crecidos en medio LIT (Engel, J. C. y Dvorak, J., 1988).

Medios.

Medio modificado de Engel: 3.3%p/v infusión de cerebro-corazón, 0.3%p/v triptosa, 3.2%p/v Na_2HPO_4, 0.04%p/v KCl, 0.03%p/v glucosa, 0.1%v/v hemina, 10 %v/v suero fetal bovino, 100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina.

Medio LIT (cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*): (1 litro) disolver y autoclavar 5gr. infusión de hígado, 5gr. triptosa, 68ml de 1M NaCl, 5.3ml de 1M KCl, 22ml 1M HPO_4Na_2, 10ml 20% glucosa. Agregar 1ml hemina (1gr. 50ml 0.2M NaOH), 100 ml de suero fetal bovino (10% final), estreptomicina/penicilina.

5 - MEDIOS Y SOLUCIONES GENERALES.

5.1- Medios.

LB: 1%p/v bacto-triptona, 0.5%p/v extracto de levaduras, 1%p/v NaCl.

LB-agar: LB + 1.5%p/v bactoagar.

Medio Rico para bacterias (*Terrific*); (1 litro) disolver 12 gr.bacto-triptona, 24 gr.extracto de levaduras, 4 ml glicerol en 900 ml de H_20, autoclavar, y agregar 100 ml de una solución estéril de 0.17 M KH_2PO_4, 0.72 M K_2HPO_4.
Concentración de ampicilina utilizada: 50 μg/ml.
Concentración de IPTG para placas: 0.1M; disolver 120 mg en 5 ml de H20. Agregar 100 μl/placa (concentración finalp/placa: 0.5 mM)
Concentración de X-gal para placas: 50 mg/ml, (disolver en dimetilformamida). Agregar 50 μl/placa (concentración final p/placa: 40 μg/ml)

5.2- Soluciones.
TE: 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8.
TBE 10x: (1 litro) 108 gr. Tris base, 55 gr. ácido bórico, 40 ml 0.5 M EDTA pH8.
TAE 50x: (1 litro) 242 gr. Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml 0.5 M EDTA pH8.
Buffer de siembra para muestras de ADN, 6x: 0.25%p/v azul de bromofenol, 0.25%p/v Xylen Cyanol y 30% v/v glicerol.
Buffer de siembra para muestras de RNA 6x: 1mM EDTA pH8, 0.25%p/v azul de bromofenol, 0.25%p/v Xylen Cyanol, 50%v/v glicerol.
Buffer de siembra para geles de secuencia: 80% formamida, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% Xylene Cyanol, 1x TBE
Buffer de siembra para muestras de proteínas, 5x: 50% v/v glicerol, 7.7% p/v DTT, 10% p/v SDS, 0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 0.002% p/v azul de bromofenol.
Buffer MOPS 10x: 0.2 M MOPS, 0.5 M acetato de sodio pH 7, 0.01 M Na_2EDTA.
Buffer Tris-glicina-SDS 10x: (1 litro) 30.3 gr. Tris base, 144 gr. glicina y 1%v/v SDS.
TBS 10x: 0.25 M Tris-HCl pH 8, 9% p/v NaCl,
TBS-T 1x: TBS 1x + 0.05% v/v Tritón X-100.
Buffer *Taq* 1x: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9, 0.1% TritonX-100.
SSC 20x: 3 M NaCl, 0.3 M Na_3citrato pH 7.
PBS: (1 litro) 8 gr. NaCl, 0.2 gr.KCl, 1.15 gr. Na_2HPO_4, 0.2 gr. KH_2PO_4.
Denhardt 50x: 1%p/v BSA, 1% Ficoll, 1%, polivinylpirrolidona.
Coomassie blue: 0.25%p/v Coomassie R250, 30% Metanol, 10% ácido acético.
Reactivo de Bradford: (1 litro) disolver 100 mg de Coomassie G250 en 50 ml de etanol 95 %, agregar 100 ml de ácido fosfórico 85%, completar a volumen con H_20, filtrar y guardar en frasco oscuro.
Alternativamente se usó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de BioRad según las instrucciones del fabricante.

6 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL CLONADO YANÁLISIS DE LOS GENES tzcrk1y tzcrk3.

6.1- Purificación fenólica y precipitación de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos a ser purificados se llevaron a más de 200 µl con H_2O o buffer TE. Para remover proteínas y lípidos se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico pH 8 (25:24:1) (PIC) y se tomó la fase acuosa (superior). Para remover restos de fenol, se agregó 1 vol de cloroformo:isoamílico (24:1) (CI) y se tomó la fase aucosa. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 1/10 volúmenes de 3 M acetato de sodio pH 5.2 o pH 4.8, o con 1/3 vol de 7.5 M acetato de amonio pH 5.2, con el agregado de 2.5 vol de etanol 100%. Se dejó a -70 °C por 20-30 min y se centrifugó a máxima velocidad por 20 min. El *pellet* se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió con H_2O o buffer TE.

6.2- Electroforesis.

6.2.1- Geles de agarosa nativos.

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TBE 1x o TAE 1x al 0.7-1.5 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo *Baby-Imager* de Applied Oncor.

6.2.2- Geles de agarosa con formaldehído.

Se prepararon geles de agarosa al 2% con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH7. Las muestras a sembrar se resuspendieron en buffer MOPS 1x conteniendo 50 % formamida y 6 % formaldehído. Las mismas se calentaron a 65°C por 10 min, se colocaron en hielo y se les agregó bromuro de etidio y buffer de siembra. La corrida electroforética se realizó con buffer MOPS 1x conteniendo 6% formaldehído a 5-10 V/cm.

6.2.3- Geles de poliacrilamida desnaturalizantes para secuenciación.

Se prepararon geles de acrilamida al 6 % con 8 M urea en buffer TBE 1x. Se usaron geles verticales de 40 x 35 cm. con espaciadores de 0.4 mm. Las muestras se resuspendieron en el buffer de siembra provisto por los *kits* de secuenciación utilizados y se calentaron, antes de ser sembradas, a 70°C por 2 min. La corrida se realizó a 60 W de potencia. Finalizada la migración, los geles se secaron a 80°C durante 1 hr. y se expusieron a placas autoradiográficas.

6.3- Cuantificación de ADN, ARN y oligonucleótidos.

Muestras de ADN, ARN y oligonucleótidos se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm. Las concentraciones se calcularon conociendo que $1DO_{260nm}$ de ADN= 50 µg/ml, $1DO_{260nm}$ de ARN= 40 µg/ml y $1DO_{260nm}$ de oligonucleótidos= 33µg/ml y teniendo en cuenta el factor de dilución. Muestras de ADN también se cuantificaron por gel, comparando las intensidades observadas al UV con las intensidades dadas por un marcador de masa conocida.

6.4- Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de ADN plasmídico o genómico se realizaron en los buffers indicadas por el fabricante. Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs, Promega o GibcoBRL. Se utilizaron de 3 a 5 unidades de enzima por µg de ADN y las incubaciones se hicieron a las temperatura recomendadas por el fabricante.

6.5- Reacciones de ligación de ADN.

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 20 y 50 ng de vector. Se hicieron diferentes relaciones molares de inserto:vector (1:1, 3:1, 5:1 y 10:1) manteniendo constante la masa de vector y variando la de inserto. Los volúmenes de reacción fueron de 10 o 15 µl utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (GibcoBRL). Para ligar extremos romos se usó 1 U de enzima y para extremos cohesivos 0.1 U. Las incubaciones fueron a 16°C durante toda la noche o a 37°C por 1 hr, respectivamente.

6.6- Preparación de bacterias competentes.

Cepa DH5α y BL21/Lys: se utilizó una modificación del método descripto por Hanaham (1985). A partir de una placa fresca se picó una colonia aislada y se inoculó a 7 ml de LB en Erlenmeyer de 125 ml. Se creció con agitación a 37°C hasta una DO_{550nm}=0.3. Luego, se pasaron 5 ml de este cultivo a 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml. Alternativamente se inoculó 1 ml de un cultivo en fase estacionaria a 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml. Se creció con agitación a 37°C hasta una DO_{550nm}=0.48 y luego se colocó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió cuidadosamente en 40 ml de solución Tfb1 fría y se dejó en hielo 5 min. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió cuidadosamente y siempre en hielo con 4 ml de TfbII preenfriado. Se incubó en hielo por 15 min. Las células se alicuotaron en *eppendorf* estériles en volúmenes de 50 a 200 µl, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a - 70°C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizaron 50 µl.

Soluciones.

TfbI: 30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15 %v/v glicerol, el pH se ajustó a 5.8 con acético 0.2 M.

TfbII: 10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 15% glicerol, el pH se ajustó a 6.5 con KOH.

6.7- Preparación de ADN plasmídico.

6.7.1- Minipreparación: en la mayoría de los casos se utilizó el método alcalino descripto en el manual "*Current protocols in Molecular Biology*, cap.1 (editado por Ausubel, F. y col. 1996).

6.7.2- Minipreparación de alta pureza para secuenciación (PEG). Se utilizó una modificación del método de Birnboin y Doly (1979). Se partió de 3-5 ml de un cultivo bacteriano crecido

durante toda la noche en medio LB o *Terrific* + amplicilina.

- Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 5' a Ta.
- El *pellet* sé resuspendió en 300 µl de solución I.
- Se agregaron 300 µl de solución II, preparada en el momento, se mezcló suavemente y se dejó 5' en hielo.
- Se agregaron 300 µl de solución III, se mezcló suavemente y se dejó en hielo 5'.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min y se tomó el sobrenadante.
- Se agregaron 50 µg/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y se incubó por 30 min a 37°C.
- Se hicieron 2-3 extracciones con 400 µl de cloroformo.
- Se precipitó con el agregado de 1 volumen de isopropanol 100% y centrifugación a máx velocidad por 10 min a Ta.
- El *pellet* se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 32 µl de H_20 estéril.
- Se agregaron 8 µl de 4 M NaCl y 40 µl de PEG_{8000} 13%, se mezcló muy bien y se incubó en hielo por 30 min.
- Se centrifugó a máx velocidad por 20 min a 4°C.
- El *pellet* se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20 µl de H_20.

Soluciones.

Solución I: 25 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8.
Solución II: 0.2 N NaOH, 1 % SDS.
Solución III: 3 M acetato de potasio pH 4.8 o 3 M acetato de sodio pH 5.2.

6.8- Transformación de bacterias.

Se utilizó el método de golpe de calor descripto en el manual "*Current protocols in Molecular Biology*, cap 1. (editado por Ausubel, F. y col. 1996).

6.9- Secuenciación.

La secuenciación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Para ello se utilizó el *kit fmol* (Promega). Se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. Como templados se utilizaron plásmidos doble cadena purificados por el método de lisis alcalina/PEG. Los oligonucleótidos iniciadores usados variaron según el vector o el inserto a ser secuenciado.

6.10- Preparación de sondas radioactivas.

6.10.1- Marcación de fragmentos de ADN doble cadena de más de 250 pb.

Las sondas radioactivas se prepararon con el kit *RadPrime DNA labeling system* (GibcoBRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. La marcación se realizó utilizando 25-50 ng de

ADNdc por iniciación al azar de la polimerasa utilizando una batería de hexámeros inespecíficos. Como nucleótido radioactivo se usó [^{32}P]α-dCTP. Luego de la marcación, la sonda se precipitó 2 veces con acetato de amonio pH 5.2 y etanol 100 % y se resuspendió en 100 µl de TE. Alternativamente la sonda se purificó utilizado columnas de Pharmacia Biotech (*MicroSpin™ CombiPack*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.10.2- Marcación de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se marcaron por el agregado en el extremo 5' de un fosfato radioactivo. Se marcaron 150 ng con 10 U de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (GibcoBRL) en el buffer indicado por el fabricante. La reacción se hizo en un volumen de 25 µl con 50 µCi de [γ-^{32}P] dATP (6000 Ci/mmol), durante 25 min a 37°C. La reacción se frenó con el agregado de 2.8 µl de 50 mM EDTA; el volumen se llevó a 100 µl, se le agregó ADN de esperma de salmón sonicado como *carrier* y se precipitó 2 veces.

6.11- Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

En la mayoría de los casos, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit *Geneclean* (Bio101). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1x y luego se siguieron las instrucciones del fabricante.

6.12- Preparación del vector pBS SK+ para ligar productos de PCR con extremos romos: digestión y remoción de fosfatos 5'.

El vector utilizado fue el plásmido BlueScript SK+ (pBS) (Invitrogen), el cual tiene resistencia al antibiótico ampicilina y permite la selección blanca/azul. 10 µg del mismo se digirieron con la enzima de restricción EcoRV que crea extremos romos. La reacción se realizó por 3 hrs a 37°C en un volumen de 50 µl. Luego, el plásmido se purificó y precipitó

Se agregaron 10 U de fosfatasa alcalina de ternero (CIP) (GibcoBRL) y el buffer correspondiente, con el fin de removerle los fosfatos 5' a los extremos del vector y evitar que el mismo se vuelva a ligar durante la reacción de ligada. Luego se purificó con PIC, CI y se precipitó. El plásmido digerido y tratado con fosfatasa se resuspendió con agua y se cuantificó.

6.13- Preparación de los productos de PCR para subclonado: obtención de extremos romos y fosforilación en 5'.

El total de reacciones de amplificación o fragmentos purificados se incubaron por 30 min a 37°C con 1 U de la enzima Klenow (GibcoBRL) para el rellenado, *fill in*, de los extremos de los productos de PCR. Luego, el volumen se llevó a 200 µl con H_20, se hizo 1 PIC, 1 CI y se precipitó. El *pellet* se resuspendió con H_20 y se procedió a la fosforilación en 5'de los productos con 1 U de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4, PNK (GibcoBRL), en buffer PNK 1x, 2 mM de ATP, en un volumen final de 25 µl. La reacción se incubó por 30 min a 37°C y luego la

enzima se inactivó a 75°C por 10 min. Los fragmentos se cuantificaron por gel de agarosa utilizando ADN de ϕX174 RF digerido con HaeIII (GibcoBRL) como marcador de masa.

6.14- Ensayos de Southern Blot y Northern Blot.

6.14.1- Transferencia de ADN a membranas de nylon.

Muestras de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa 0.7-1.5% con bromuro de etidio. Al finalizar la migración los geles se incubaron por 20 min en 0.25N de HCl (solución de depurinación). Luego, se lavaron con agua bidestilada y se incubaron por 15 min en una solución 0.4N de NaOH. La transferencia se realizó durante toda la noche, por capilaridad ascendente, a membrana de nylon *Hybond N+* (Amersham) utilizando 0.4M NaOH siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se verificó por visualización al UV del ADN en los filtros. Los mismos se lavaron con 2xSSC y se guardaron húmedos a 4°C hasta el momento de la hibridación.

6.14.2- Transferencia de ARN a membranas de nylon.

Muestras de ARN de epimastigotes de *T. cruzi* fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa con formaldehído. Al finalizar la migración los geles se transfirieron durante toda la noche por capilaridad ascendente a membrana de nylon *Hybond N+* (Amersham) usando 0.05 N de NaOH como solución de transferencia siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se verificó por visualización al UV del ARN en los filtros. Los mismos se lavaron con 2xSSC y se guardaron húmedos a 4°C hasta el momento de la hibridación.

6.14.3- Hibridación con sondas >= a 300 pb.

La prehibridación e hibridación se realizaron en horno rotatorio a 65°C. Las membranas se prehibridaron durante 1-3 hrs con solución de hibridación. Luego, las correspondientes sondas se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 min y se agregaron a la solución de hibridación. Se incubaron con agitación durante toda la noche y luego se lavaron según el siguiente protocolo: 2 lavados de 10 min a Ta con 2xSSC/0.1%SDS, 1 lavado de 10 min a Ta con 1xSSC/0.1%SDS, 1 lavado de 30 min a 65°C con 1xSSC/0.1%SDS, 1 lavado 65°C con 0.1xSSC/0.1%SDS. Entre los lavados se monitorearon los filtros con contador Geiger y, según la marca de los mismos, se decidía o no continuar con los lavados. Las membranas se expusieron a películas autorradiográficas de rayos X (Agfa Gevaert CURIX) en presencia de una pantalla amplificadora.

Alternativamente se uso la solución *QuickHyb* (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Solución de hibridación: 5x Denhartd, 6x SSC, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 25 mM buffer fosfato de sodio pH7.5, 200 µg/ml ADN de esperma de salmón sonicado (sss).

6.14.4- Hibridación con sondas de oligonucleótidos.

Los filtros se prehibridaron con solución de hibridación durante 1.5-3 hrs. a 55°C en horno rotatorio. Luego, el oligonucleótido marcado radioactivamente se agregó a la solución y se incubó durante toda la noche a 60°C. Las membranas se lavaron 2 veces por 5 min a Ta con 6xSSC/0.1%SDS y 1 lavado de 15 min a 55°C con 6xSSC/0.1%SDS.

Solución de hibridación: 0.9M NaCl, 0.09M Tris-HCl pH7.5, 6 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 µg/ml ADNsss.

6.15- Hibridación de colonias.

6.15.1- Transferencia del ADN.

Colonias bacterianas crecidas durante toda la noche a 37°C en caja de petri se transfirieron a filtros de nylon *Hybond N* (Amersham) según las indicaciones del fabricante. El ADN se fijó al UV utilizando el horno *UV Stratalinker 1800* de Stratagene.

6.15.2- Hibridación.

(ver hibridación con sondas de oligonucleótidos)

6.16- Transcripción reversa (RT): síntesis de ADNc.

La síntesis de ADNc se realizó por transcripción reversa utilizando como molde entre 10-700 ng de ARN total de distintas formas de *T. cruzi*. La enzima transcriptasa reversa AMV (Promega) se utilizó en todas las reacciones en el buffer RT indicado por el fabricante, con 5 mM de $MgCl_2$, 4 mM de dNTPs, un inhibidor de ARNasas (RNAsin, Promega) y 5 µM de hexámeros diseñados al azar, en un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó por 30 min a 37°C y luego la enzima se inactivó por calentamiento durante 5 min a 95°C.

6.17- Preparación de ADN genómico de epimastigotes de *T.cruzi*.

El ADN se purificó utilizando el reactivo DNAzol™ (*Molecular Research Center)* según las instrucciones del fabricante.

6.18- Preparación de ARN total de epimastigotes de *T.cruzi*.

6.18.1- Para pequeñas cantidades de parásitos-(10^8 células.)

*Pellet*s de parásitos, 10^8 células, se resuspendieron en 500 µl de GTC+0.1 M β-mercaptoetanol y se pasaron 40 veces, por jeringa G21

Se le agregaron 50 µl de 3 M acetato de sodio pH 4 y se mezcló bien.

Se le agregaron 550 µl de fenol saturado en agua y se mezcló con vortex.

Se le agregaron 100 µl de una solución de cloroformo:isoamílico, 49:1, se incubó por 15 min a 0°C y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min a 4°C.

Se tomó la fase acuosa y se precipitó con el agregado de 1 volumen de isopropanol,

incubación por 30 min a -70°C y centrifugación a 10000 rpm por 20 min a 4°C.
El *pellet* se resuspendió en 50 µl de GTC+0.1 M β-mercaptoetanol y se agitó con vortex.
Se le agregó 1 volumen de isopropanol, se incubó por 20 min a -70°C y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min a 4°C.
El *pellet* se secó y se resuspendió en 500 µl de agua + 50 µl de 3 M acetato de sodio pH4.
Se extrajo 2 veces con PIC y 4 veces con eter
Se le agregó 1 volumen de isopropanol, se incubó por 20 min a -70°C y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min a 4°C.
El *pellet* se lavó 3 veces con etanol 70%, se lo dejó secar y se resuspendió en 20 µl de agua.

6.18.2- Para grandes cantidades de parásitos (500 mg).

El *pellet* se resuspendió en 2.5 ml de una solución de GTC+0.1 M M β-mercaptoetanol y se pasó por jeringa G-23.
Se agitó con vortex por 5 min y todo el volumen se sembró en un colchón de 7 ml de 6M ClCs + 0.1M EDTA, el tubo se completó con GTC y se centrifugó a 27000 rpm, en rotor SW28, a 4°C durante 19 hrs.
Se sacó la fase superior de GTC + 500 µl de ClCs, se lavaron las paredes del tubo 3 veces con 500 µl de GTC.
Se sacó todo el ClCs con mucho cuidado (fase con ADN) y el *pellet* (ARN) se resuspendió con 400 µl de GTC.
El volumen se dividió en 2 tubos y se les agregó 3 volúmenes de etanol 100 %, se incubó por 50 min a -70°C y se centrifugó a 10000 rpm por 30 min a 4°C.
Los *pellet*s se lavaron con 1 ml de etanol 70%, se secaron y se resuspendieron en 400 µl de H_20 DEPC.

7 - CLONADO DE LOS GENES tzcrk1 Y tzcrk3: PROCEDIMIENTO.

El clonado de los genes completos para TzCRK 1 y 3 se realizó en cuatro etapas.
Etapa 1: Clonado y secuenciación de la región media de los genes tzcrk1 y 3.
Etapa 2: Clonado y secuenciación de la región 5' de los genes tzcrk 1 y 3.
Etapa 3: Clonado y secuenciación de la región 3' de tzcrk 1 y 3.
Etapa 4: Clonado de los genes completos tzcrk1 y tzcrk3.

7.1- Etapa 1: Clonado y secuenciación de la región media de los genes tzcrk1 y 3.

- Amplificaciones por PCR.

A partir de secuencias ya conocidas de otras CDKs se diseñaron los oligonucleótidos degenerados EL-1, EL-2, EL-3 y EL-4, que se usaron en reacciones de amplificación por PCR.

La mezcla de amplificación estaba compuesta por: 500 ng de ADN de epimastigotes de *T. cruzi*, 100 ng de cada uno de los oligonuclecleótidos utilizados, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, buffer *Taq* 1x y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa. El volúmen final fue de 100 µl. Los tiempos y temperaturas de las reacciones fueron:

5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
1 min a 95°C (desnaturalización) ┐
1 min a 50°C (anidado) ├ x 30 ciclos
1 min a 72°C (elongación) ┘
10 min a 72°C (elongación final)

Las reacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

- Clonado y análisis de los fragmentos de PCR.

Todos los fragmentos de PCR obtenidos en la amplificación con los oligonucleótidos EL-1 y EL-3 se rellenaron con la enzima *Klenow* y se fosforilaron en 5'. Luego se ligaron al vector pBS SK+ digerido con EcoRV y tratado con fosfatasa. La mitad de la reacción de ligación se usó para transformar bacterias competentes de la cepa DH5α. Las mismas se sembraron en LBagar+ampicilina+IPTG+X-gal y se incubaron durante toda la noche a 37°C. De las colonias obtenidas se repicaron las blancas y algunas celestes, y se les extrajo el plásmido. Luego, se analizaron por digetión con la enzima PvuII, que digiere el pBS SK+ (sin inserto) en 2 sitios liberando un fragmento de 450 pb. Todos aquellos plásmidos con insertos de 350 se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos T3 y T7.

7.2- <u>Etapa 2</u>: Clonado y secuenciación de la región 5' de los genes tzcrk 1 y 3.

Para el clonado de la región 5' de los genes tzcrk 1 y tzcrk 3 se realizaron ensayos de RT/PCR.
En las reacciones de RT se utilizaron 700 ng de ARN total empleando hexámeros diseñados al azar como secuencias iniciadoras para la actividad de la enzima.
Como oligonucleótido 5' en las reacciones de PCR se utilizó el ME. Los oligonucleótidos 3' empleados en las reacciones de PCR se diseñaron a partir de las secuencias identificadas en la etapa 1 para tzcrk 1 y 3.

7.2.1- Región 5' de tzcrk3.

- Amplificaciones por PCR.

Mitad de la reacción de RT se empleó como molde en la PCR (50 µl) usando 100 ng de los oligonucleótidos ME y TC3et2 con una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP y 2.5 U de ADN *Taq* polimerasa. Los tiempos y temperaturas de la PCR fueron:

5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
30 seg a 95°C (desnaturalización) ┐
30 seg a 68°C (anidado) ├ x 35 ciclos
1 min a 70°C (elongación) ┘
10 min a 70°C (elongación final)

5 µl de cada reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.4 %.

- Clonado de los productos de PCR y secuenciación.

Los productos del resto de la PCR (45 µl) se rellenaron con *Klenow*, se fosforilaron en 5' y se ligaron al vector pBS SK+ digerido con EcoRV y tratado con fosfatasa. Mitad de la reacción se usó para transformar bacterias competentes (cepa DH5α) las que se sembraron sobre LBagar+ampicilina+X-gal+IPTG. 10 colonias blancas se repicaron en medio LB+ampicilina y se les extrajo el plásmido. Los mismos fueron digeridos con la enzima de restricción Pvu II para determinar si tenían inserto. Aquellos con insertos del tamaño esperado (aprox. 300 pb), se secuenciaron y analizaron.

7.2.2- Región 5' de tzcrk 1.

- Amplificaciones por PCR.

Se realizó una PCR (50 µl) (PCR I) con los oligonucleótidos ME y TC1et2-I usando como templado 10 µl de la RT. 1 µl de esta PCR se empleó como templado en una segunda PCR (PCR semianidada) con los oligonucleótidos ME y TC1et2-II. Los tiempos y temperaturas de ambas PCRs fueron:

5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
30 seg a 95°C (desnaturalización) ┐
1 min a 68°C (anidado) ├ x 30 ciclos
1 min a 72°C (elongación) ┘
10 min a 72°C (elongación final)

- Análisis por Southern blot, clonado y secuenciación.

5 µl de cada PCR (I y II) se sembraron en un gel de agarosa 1%; los fragmentos sometidos a elecctroforesis se transfirieron por capilaridad ascendente a nylon *Hybond N+*. La misma se bloqueó e hibridó con el oligonucleótido TC1et2-III marcado por *end labeling*. Luego de los lavados, la membrana se expuso a una película autorradiográfica.

Los 45 µl restantes de la PCR II (ME/TC1et2-II) se clonaron en el vector pBS SK+ digerido con EcoRV y tratado con fosfatasa. Aquellos plásmidos con insertos del tamaño esperado se secuenciaron.

7.3- Etapa 3: Clonado de la región 3' de tzcrk 1 y tzcrk 3.

Para el clonado de la región 3' de ambos genes se aplicó la técnica *jumping PCR*. Esta técnica sirve para amplificar regiones de ADN que esten bordeando alguna secuencia ya conocida (ver concepto teórico en sección Resultados)
Se diseñaron, para cada quinasa, 3 oligonucleótidos a partir de los extremos 3' ya identificados en la etapa 1.

7.3.1- Jumping PCR para tzcrk 1 y tzcrk 3
(ver figura 14, sección Resultados).

- Amplificaciones por PCR.
Las primeras PCRs (PCRsI) para tzcrk3 y 1 se realizaron con 50 ng de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, a una temperatura de anidado de 50°C. Como iniciadores 5' se emplearon los oligonucleótidos TC3et3-I para tzcrk3 y TC1et3-I para tzcrk1 y como iniciadores 3', 14 oligonucleótidos con secuencias totalmente inespecíficas. Cabe aclarar que se realizaron 14 PCRsI independientes para cada quinasa, todas con el mismo iniciador sentido, TC3et3-I o TC1et3-I, y los distintos iniciadores antisentido (inespecíficos). 1 µl de estas PCRs se usó como molde en segundas PCRs (PCRs II), con los mismos oligonucleótidos inespecíficos y TC3et3-II para tzcrk3 y TC1et3-II para tzcrk1. La temperatura de anidado se fijó en 60 °C.

PCRI
5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
1 min a 95°C (desnaturalización) ┐
1 min a 50°C (anidado) ├ x 30 ciclos
1 min 30 seg a 72°C (elongación) ┘
10 min a 72°C (elongación final)

PCRII
5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
1 min a 95°C (desnaturalización) ┐
1 min a 60°C (anidado) ├ x 30 ciclos
1 min 30 seg a 72°C (elongación) ┘
10 min a 72°C (elongación final)

- Análisis por Southern blot, clonado y secuenciación.
5 µl de las PCRs I y II correspondientes a las amplificaciones para cada quinasa fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa 1%. El ADN se transfirió a membranas de nylon *Hybond N+*, las que se hibridaron con TC3et3-III para tzcrk3 o TC1et3-III para tzcrk1 y se

expusieron a películas autorradiográficas de rayos X. Luego se seleccionaron aquellas PCRs en las cuales la sonda reveló bandas de un tamaño mayor a 600 pb. Los 45 µl restantes de estas PCRs se ligaron a pBS digerido con EcoRV y tratado con fosfatasa y se transformaron bacterias competentes las cuales se sembraron en LB+amp.+X-gal+IPTG. Las colonias se transfirieron a filtros de nylon *Hybond N*, se hibridaron con las sondas TC3et3-III o TC1et3-III y se expusieron a placas autorradiográficas. Cinco colonias positivas de cada placa se repicaron en medio líquido (LB+amp) y se minipreparaton. Los plásmidos se digirieron con PvuII y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los clones cuyos insertos eran del tamaño esperado se secuenciaron.

7.4- Etapa 4: Clonado de los genes completos tzcrk1 y tzcrk3.

Se diseñaron los oligonucleótidos TC3-5' y TC3-3' para tzcrk3 y TC1-5' y TC1-3' para tzcrk1, a partir de las secuencias 5' y 3' obtenidas en las etapas 2 y 3 repectivamente. En el extremo 5' de los iniciadores sentido, TC3-5' y TC1-5,' se agregó la secuencia de corte para la enzima de restricción BamHI y en el extremo 5' de los iniciadors antisentido, TC3-3' y TC1-3', se agregó la secuencia de corte para StuI. Estos oligonucleótidos se emplearon en PCRs usando como templado 50 ng de ADN de epimastigotes de *T. cruzi*. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1 % y las bandas correspondientes a tzcrk3 (930 pb) y tzcrk1 (900 pb) se purificaron del gel con el kit *geneclean*. Los fragmentos se digirieron con las enzimas BamHI y Stu I y se subclonaron en el sitio BamHI/SmaI del vector de expresión pGEX4T-3 en marco con la proteína glutatión S-transferasa (GST).

PCR

5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
1 min a 95°C (desnaturalización) ┐
1 min a 60°C (anidado) │ x 30 ciclos
1 min 30 seg a 72°C (elongación) ┘
10 min a 72°C (elongación final)

8 - ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE tzcrk1 y tzcrk3: PROCEDIMIENTO.

10 µg de ADN de epimastigotes de *T. cruzi* se digirieron por separado con las enzimas de restricción BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI y SacI. Las digestiones fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa 0.7% y al finalizar la migración el ADN se transfirió a membranas de nylon. La hibridación se realizó con la solución QuickHyb (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Como sondas se utilizaron los fragmentos BamHI/NotI de los clones pGEX4T-3-tzcrk1 y pGEX4T-3-tzcrk3, correspondientes a los genes completos.

9 - ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT: PROCEDIMIENTO.

20 µg de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa con formaldehído y se transfirieron a membranas de nylon. Los fragmentos utilizados como sondas para tzcrk1 y tzcrk3 se obtuvieron por digestión de los clones obtenidos en la etapa 1 con las enzimas HindIII/EcoRI y AccI/PstI, respectivamente. Los fragmentos se purificaron de gel y se marcaron por *random primming*.

10 - ESTUDIO POR RT/PCR DE LA EXPRESIÓN DE tzcrk1 Y tzcrk3: PROCEDIMIENTO

ARN total de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL se extrajo por el método de fenol-ácido. Se realizaron reacciones de RT con distintas concentraciones, 10, 50, 200 y 500 ng de ARN total de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*. Las PCRs para tzcrk3 y tzcrk1 se hicieron con 10 µl de las RTs con los oligonucleótidos ME y TC3et2 o ME y TC1et2-I. Los tiempos y temperaturas de las PCRs fueron:

5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADNc)
30 seg a 95°C (desnaturalización) ┐
30 seg a 65°C (anidado) ├ x 30 ciclos
1 min a 72°C (elongación) ┘
5 min a 72°C (elongación final)

5 µl de cada una de las PCRs se resolvieron en gel de agarosa 1 %.

11 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS TzCRK1 Y TzCRK3.

11.1- Cultivo de células COS-7.

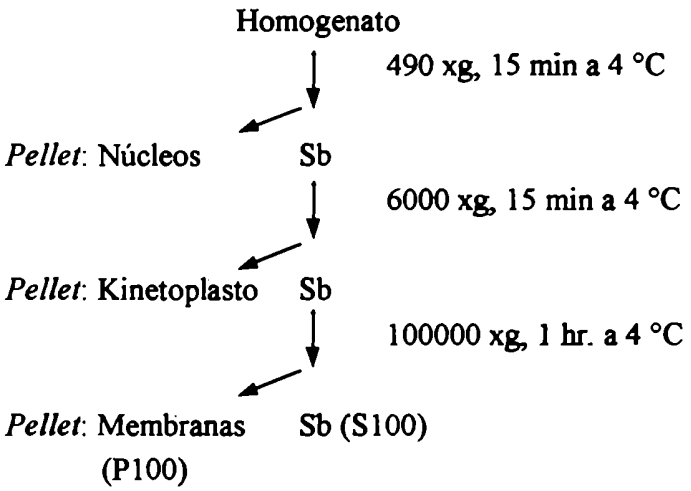
Células COS-7 se crecieron en estufa a 37°C con atmósfera de CO_2 en medio DMEM+10% de suero fetal bovino.

11.2- Preparación de extractos proteicos.

11.2.1- Parásitos.

Pellets celulares de distintos estadíos del parásito se resuspendieron en solución de lisis y se incubaron por 30 min a 4°C. Luego, se centrifugaron por 10 min a 8400 xg y la concentración proteica del sobrenadante se determinó por Bradford.
Alternativamente, *pellets* celulares de la forma epimastigote se resuspendieron en solución SK+inhibidores de proteasas y se sometieron a 3-5 ciclos de congelamiento y descongelamiento. La ruptura se confirmó por visualización al microscopio. Los homogenatos se centrifugaron

diferencialmente, en rotor SS34 o Ti865, para obtener fracciones parcialmente purificadas, según el siguiente esquema:



En casos en los cuales se partió de muy poco material, los *pellets* celulares se resuspendieron en solución SK+inhibidores de proteasas, se rompieron por congelamiento y descongelamiento y las centrifugaciones se realizaron en microcentrífuga hasta obtener un sobrenadante de 23000xg.

Soluciones.

Solución de lisis: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM NaF, 0.1 mM VO_3Na, 5 mM EDTA, 5 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 25 U/ml aprotinin

Solución SK: 0.25 M sacarosa, 5 mM KCl

Inhibidores de proteasas y fosfatasas: 0.5 mM TLCK, 1 mM benzamidina, 1 mM PMSF, 25U/ml trasylol, 10 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml inhibidor de tripsina, 0.1 mM VO_3Na y 10 mM NaF.

11.2.2- Células COS-7.

Células COS-7 se lavaron 3 veces con PBS frío y se les agregó 0.6-1 ml de solución de lisis. Se incubaron en frío por 5 min y se cosecharon. Los homogenatos se centrifugaron a 15000 xg por 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se cuantificaron por Bradford.

Solución de lisis: 20 mM HEPES pH 7.5, 1% NP-40, 10 mM EGTA, 2.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 40 mM β-glicerofosfato, 1 mM PMSF, 2 mM VO_3Na, 3 µg/ml de aprotinina y 3 µg/ml de leupeptina.

11.3- Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se utilizó el método de Laemmli (1970). Se armaron geles desnaturalizantes (0.1 % SDS) discontinuos en celdas BioRad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los

volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5 x y calentándolas por 3-5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usó tris-glicina-SDS 1x. Los marcadores de peso molecular usados fueron los de GibcoBRL de 14.3 a 200 kDa.

11.4- Ensayos de Western blot.

Extractos proteicos (15-100 µg) fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 10-12 % y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C). La transferencia se hizo en cuba de inmersión (Bio-Rad) utilizando tris-glicina 1x/20% metanol durante 1-1.5 hrs a 100-80 V. Las membranas fueron incubadas durante 20 min - 1 hr. con solución de bloqueo (5 % leche descremada o 4% BSA en buffer TBS-T) y luego con los correspondientes anticuerpos primarios durante 1 - 2 hrs a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T, se incubaron durante 20 min - 1hr. con los correspondientes segundos anticuerpos acoplados a peroxidasa y se volvieron a lavar. Como sustrato para la peroxidasa se usó el kit de quimioluminiscencia Renaissance (NEN-Dupont). Los anticuerpos se diluyeron en 5% leche descremada o 0.4% BSA.

11.5- Purificación de proteínas recombinantes.

11.5.1- Purificación de proteínas fusionadas a GST.

Cultivos saturados de *E. coli*, cepa DH5α transformadas con pGEX4T-3/Rb o pGEX4T-3/tzcrk1 se diluyeron 1/20 con medio LB + ampicilina y se incubaron a 37°C hasta una DO_{555}=0.5. Luego se les agregó IPTG hasta una concentración final de 0.2 mM y se dejaron crecer 3 hr. El cultivo bacteriano se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis. Posteriormente se les agregó TritónX-100 hasta una concentración final de 0.1 % y 50 µg/ml de lisozima y se incubó por 15 min en hielo; luego se agregó 1 volumen de solución alta-sal y se centrifugó 1 hr. a 100000xg a 4°C. El sobrenadante se incubó 1hr a 4°C con 300 µl de glutatión-agarosa (Pharmacia), se centrifugó 5 min a 3000 rpm y el *pellet* se lavó con buffer de lisis. La proteína recombinante (GST-TzCRK1) se eluyó con 10 mM de glutatión y se cuantificó por SDS-PAGE.

Soluciones.

Solución de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 % sacarosa, 0.1 mM EDTA, 10 mM ß-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2 µg/ml de aprotinina, 2 µg/ml de leupeptina.

Solución alta-sal: 50 mM Tris-HCl pH8, 0.6 M KCl, 10 mM ß-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2 µg/ml de aprotinina, 2 µg/ml de leupeptina.

11.5.2- Purificación de proteínas que forman cuerpos de inclusión (His-TzCRK3).

Cultivos saturados de *E. coli*, cepa DH5α transformadas con pRSET-tzcrk3 se diluyeron 1/20 con medio LB + ampicilina + cloranfenicol y se incubaron a 37°C hasta una DO_{555}=0.5. Luego

se les agregó IPTG hasta una concentración final de 0.2 mM y se dejaron crecer 3 hr. El cultivo bacteriano se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis + 100 µg/ml de lisozima. Luego de 20 min se le agregó deoxicolato de sodio y se lo incubó a 37°C hasta ver la formación de una solución viscosa. La misma se trató con DNAsa I y luego se centrifugó a 12000 xg. El *pellet* obtenido se resuspendió en buffer de lisis y se centrifugó a 12000 xg; el *pellet* se lavó con agua y se resuspendió en buffer de siembra el cual permite la desnaturalización de los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión desnaturalizados se sembraron en una columna de niquel, que tiene la capacidad de unir aminoácidos como la histidina. De esta manera la proteína his-TzCRK3 queda retenida a la misma. La elución se hizo con 300 mM de imidazol. Luego se procedió a la renaturalización de la enzima por remoción de la urea. La fracción eluida se colocó en una bolsa de diálisis (*cut off* 12000 kDa) y se procedió con la diálisis utilizado sucesivas soluciones de concentraciones decrecientes de urea hasta remover todo el agente caotrópico.

Soluciones.

Solución de lisis: 0.5% Tritón X-100, 10 mM EDTA, inh de proteasas.

Solución de siembra: 6M urea, 40 mM imidazol, 4M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH7.9, 0,1% NP-40.

Soluciones de diálisis: 50 mM Tris-HCl pH6.8, 10 mM β-mercaptoetanol, concentraciones de urea de 2 M, 1 M y sin urea.

11.6- Preparación de los antisueros GST-TzCRK1 e His-TzCRK3.

Para cada quinasa se injectaron subcutámeamente 2 conejos con 0.5-1 mg de las proteínas recombinantes mezcladas con adjuvante de Freund completo. A los 30 días se los volvió a injectar con la misma preparación antigénica y se sangraron un mes más tarde. La especificidad del antisuero GST-TzCRK1 fue ensayados de Western blot.

11.7- Purificación de IgGs de conejo.

1 ml de sueros totales se precipitaron con 40 % sulfato de amonio. Los *pellet*s obtenidos se resuspendieron en 1 ml de PBS y se dializaron contra 50mM de buffer fosfato de sodio pH 6.5. Los dializados se sembraron en una columna de DEAE previamente equilibrada con 50mM de buffer fosfato de sodio pH 6.5. Se tomaron fracciones de 0.5 ml a las cuales se les midió la actividad por Western blot. Las fracciones capaces de reconocer a la TzCRK1 en la fracción citosólica se juntaron y se guardaron a 4°C.

11.8- Ensayos de inmunoprecipitación y co-precipitacón.

Extractos solubles se incubaron con los correspondientes anticuerpos o con la proteína p13SUC1 unida a agarosa. Las fracciones fueron previamente preclarificadas con proteína A-agarosa durante 20 min a 4°C. Las incubaciones con los sueros y p13-agarosa se hicieron durante 1.5-2

hs a 4°C. Las fracciones con los sueros se incubaron con la proteína A-agarosa durante 30 min a 4°C y se precipitaron. Los *pellets* de p13-agarosa y proteínaA-agarosa se lavaron 3 veces con 500 µl de PBS 1x y se utilizaron en ensayos de quinasa o se resuspendieron en buffer de siembra y se resolvieron por SDS-PAGE.

11.9- Ensayos de Actividad de Quinasas de proteínas.

Según la fuente de enzima y los sustratos utilizados, se realizaron distintos tipos de ensayos para determinar actividad de quinasa.

11.9.1- Ensayos analizados por SDS-PAGE.

- Para las proteína recombinates GST-TzCRK1 e His-TzCRK3.

La medición de la actividad se realizó con distintas concentraciones de las mismas empleando histona H1 y GST-Rb como sustratos. El buffer de reacción estaba compuesto por 50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 2.5 mM EGTA, 5 mM $MnCl_2$, 0.5 mM NaF, 0.4 mM ortovanadato de sodio y 5 µCi [γ-^{32}P]ATP. El ensayo de quinasa para histona H1 se realizó con 0.2 mg/ml de la misma y, según la quinasa, distintas concentraciones de ATP no marcado. Para la proteína retinoblastoma, se emplearon 0.025 mg/ml de una proteína recombinante GST-Rb y 0.01 mM de ATP no marcado. El tiempo de reacción fue de 30 min a 30°C en un volumen final de 30µl; la reacción se detuvo con 10 µl de buffer de siembra 5x. Las muestras se hirvieron por 2 min y se sembraron en un SDS-PAGE 12 %.

- Para proteínas inmunoprecipitadas o co-precipitadas con p13-agarosa:

Luego de las precipitaciones, los *pellets* fueron utilizados como fuentes de enzima; los mismos se resuspendieron en 30 µl de buffer de reacción conteniendo histona H1 o la proteína Rb con concentraciones variables de ATP no marcado. El tiempo de reacción fue de 30 min a 30°C y se detuvo con 10 µl de buffer de siembra 5x. Las muestras se hirvieron por 2 min y se sembraron en un SDS-PAGE 12 %.

11.9.2- Ensayos utilizando P81.

Como fuente de enzima se usaron distintas concentraciones de la proteína recombinante His-TzCRK3. Las proteínas utilizadas como sustratos fueron histona H1 (0.5mg/ml), histona HII (1mg/ml), histona HIV (1mg/ml), histona HVII (1mg/ml), histona HVIII (1mg/ml), protamina (1mg/ml), y los péptidos GS (25 µM) y sintide-2 (25 µM). La reacción se inició con el agregado de la mezcla radioactiva [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 2.5 mM EGTA, 5 mM $MnCl_2$, 0.5 mM NaF, 0.1 mM ortovanadato de sodio y 10 µM [γ-^{32}P]ATP (1000 cpm/pmol)] y se incubó durante 10 minutos a 30°C. Luego de la incubación, la reacción se detuvo colocando 40 µl sobre papeles de fosfocelulosa Whatman P-81 (2x2 cm), que se sumergieron inmediatamene en 75 mM ácido fosfórico (en baño de hielo) y se lavaron tres veces

por 10 min en la misma solución (Roskoski, 1983). Los papeles se secaron y se contó la radioactividad en una solución centelleante de tolueno-omnifluor.

11.10- Sincronización de cultivos por el método de la hidroxiurea.

La sincronización se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Galanti, Universidad de Chile, Santiago. Se sincronizaron cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* con hidroxiurea según Galanti, N. et al 1994. La sincronización de los parásitos se determinó por medición de la incorporación de timidina H^3 (Galanti, N. et al 1994). Se tomaron muestras a los tiempos 0, 2, 4, 12, 15, 18 y 24 hs. luego de la remoción de la hidroxiurea. Los *pellets* de epimastigotes se lavaron con PBS y se congelaron a -70°C hasta su utilización.

11.11- Sincronización de amastigotes.

Amastigotes axénico de la cepa Miranda, clon 83 fueron sincronizados en colaboración con el Dr. Engel, Universidad de San Francisco, USA, según Engel, J.C., 1988.

11.12- Inmunocitoquímica, microscopía electrónica.

Los amastigotes sincronizados fueron fijados con 2% paraformaldehido-0.05%glutaraldehido en 0.1M buffer fosfato, pH7.4, por 2-4 hrs a 4°C. Luego, los amastigotes fueron crioprotegidos, congelados y seccionados. Estos se incubaron con IgGs purificadas del suero anti-TzCRK1 y luego de los lavados, se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgGs de conejo marcado con oro. Como control negativo se usó un suero normal de conejo.

11.13- Transfección de células COS-7.

Una placa confluente de células COS-7 se diluyó ¼ el día anterior a la transformación. Se preparó, en un volumen de 600 µl, una mezcla de ADN conteniendo 1-5 µg de ADN plasmídico, 300 µg/ml de DEAE-dextrano y PBS. En el momento de la transformación las células se lavaron 2 veces con PBS. Luego del segundo lavado se aspiró todo el líquido y se agregó la mezcla de ADN asegurándose que toda la superficie de la placa quede totalmente cubierta. Las placas se colocaron en estufa a 37°C con atmósfera de CO_2 por exactamente 30 min., mezclando cada 5-10 min para que todas las células esten en contacto con la solución. Luego se le agregaron 6 ml de medio DMEM+12 µl de una solución 80 mM de cloroquina (concentración final 160 µM). Las placas se colocaron en estufa a 37°C con atmósfera de CO_2 por 2.5-3.5 hrs. El medio se aspiró y las células se dejaron incubando en estufa con 8-10 ml de medio DMEM+10% suero fetal bovino. Al día siguiente se cambió el medio y las células se cosecharon luego de 48 hrs.

11.14- Ensayos de inhibición de la actividad quinasa.

Inmunoprecipitados utilizando el antisuero anti TzCRK1 y 1 µg de la proteína recombinante GST-TzCRK1 se incubaron con distintas concentraciones de los inhibidores flavopirindol, olomucina y roscovitina y se estudió la capacidad de la quinasa de fosforilar histona H1. Se

ensayaron concentraciones de los inhibidores hasta 100 µM para roscovitina, hasta 1 mM para olomucina y hasta 500 µM para flavopiridol. Los ensayos de quinasa se realizaron utilizando 50 µM de ATP y las reacciones se resolvieron por SDS-PAGE. Como controles positivos se ensayaron las quinasas sin el agregado de los inhibidores. Las soluciones concentradas para los 3 inhibidores se prepararon disolviendo los mismos en DMSO, según las instrucciones de los fabricantes. En el momento de usar se prepararon diluciones de los mismos utilizando agua.

12 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ENSAYOS CON LEVADURAS.

12.1- Transformación de levaduras.

12.1.1- Pequeña escala.

Se inocularon 10 ml de medio YPD con una colonia grande de las levaduras a ser transformadas. Se dejó crecer, según la cepa de levadura, a 23°C o 30°C durante toda la noche.

Se diluyó en 50 ml de YPD hasta una DO_{600nm} =0.5 y se dejó crecer con agitación durante 2-4 hrs a las temperaturas correspondientes.

Se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm y Ta. El *pellet* se resuspendió en 40 ml de TE o H_20 y se volvió a centrifugar a 2500 rpm y Ta.

El *pellet* se resuspendió en 2 ml de solución LiAc y se incubó por 10 min a Ta.

1-2 µg de plásmido a ser transformado se mezcló con 50 µl de una mezcla de ADN *carrier* preparada en el momento.

Preparación de ADN *carrier*: se hirvieron por 5-10 min 200 µl de ADN de esperma de salmón sonicado de concentración 10-20 µg/ml. Se le agregaron inmediatamente 800 µl de solución LiAc, se mezcló vigorosamente y se colocó en hielo hasta que alcanzó a Ta.

A la mezcla de ADN (plásmido+ADN carrier) se le agregaron 100 µl de las levaduras en solución LiAc y se mezclaron bien.

Luego se le agregaron 700 µl de la solución PEG-LiAc, se mezcló con vortex y se incubó con agitación por 30 min - 1 hr. a 23°C o 30°C.

Se incubó a 42°C por 7-10 min. (golpe de calor).

Se centrifugaron a máx velocidad por 20 segundos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* de levaduras sé resuspendió en 150 µl de TE y se plaqueó en los correspondientes medios de selección.

12.1.2- Gran Escala

Se partió de levaduras L40 transformadas con el vector pBTM116-tzcrk1 y seleccionadas en placas Yc-TULys.

- Se creció un cultivo de 5 ml de L40/lexA-tzcrk1 en medio Yc-TULys durante toda la noche a

30°C.
Se inocularon los 5 ml en 100 ml del mismo medio y se dejó crecer durante toda la noche a 30°C.
El cultivo saturado se diluyó hasta una DO_{600nm}=0.3-0.5 en 300 ml de medio YPD+40 µg/ml de adenina y se dejó crecer en agitación a 30°C durante 4 hrs.
Las levaduras se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm por 5 min a Ta.
El *pellet* se resuspendió en 250 µl de TE y se volvió a centrifugar.
El *pellet* se resuspendió en 10 ml de solución LiAc y se incubó por 10 min a Ta.
Se le agregó una mezcla de ADN compuesta por 250 µg de la biblioteca plasmídica y 1 ml de ADN *carrier*.
Se le agregaron 70 ml de solución PEG-LiAc, se mezcló bien y se incubó con agitación por 30 min a 30°C.
Se le agregaron 6 ml de DMSO, se mezcló bien y se incubó a 42°C por 6 min (golpe de calor) agitando ocacionalmente para permitir una temperatura homogénea.
Se enfrió rápidamente hasta Ta en baño de agua y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a Ta.
Las levaduras se lavaron con 300 ml de TE. El *pellet* se resuspendió en 500 ml de YPD y se incubó con agitación por 1 hr. a 30°C.
Las levaduras se centrifugaron y se volvieron a lavar con 300 ml de TE.
Se sembraron $1/10^4$ del volumen total en placas Yc-TUL para medir la eficiencia de transformación y las levaduras se volvieron a centrifugar a 2500 rpm por 5 min a Ta.
El *pellet* se resuspendió en 500 ml de Yc-TUL y se incubó con agitación a 30°C por 16 hrs.
Las levaduras se cosecharon y se lavaron con 250 ml de TE.
El *pellet* final se resuspendió en 5 ml de TE.
Se sembraron 200, 150, 100, 50 y 10 µl en placas Yc-THULL y se dejaron en estufa a 30°C por 3-5 días.

Medios.

YPD: 2%p/v de peptona, 1%p/v extracto de levaduras, 2% dextrosa.

Medios Yc (para levaduras L40): (1 litro) disolver 1.2gr.base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos y sulfato de amonio, 5gr. sulfato de amonio, 10gr. ácido succínico, 6gr. NaOH, 0.1 gr. de los aminoácidos ade, arg, cis, (leu), (lys), tre, (trp), ura y 0.05 gr. de los aminácidos asp, (his), ile, met, phe, pro, ser, tir, val, en 900 ml de agua, autoclavar, y agregar 20% de glucosa.
Aminoácidos entre paréntesis: aminoácidos excluidos en medios *drop-out* (excluyentes) según corresponda.
Medios *drop-out* (para levaduras L40):
Yc-TULys: Yc sin trp, ura, lys.
Yc-THULL: Yc sin trp, his, ura, leu, lys.
Yc-TUL: Yc sin trp, ura, leu.

Yc-TULL: Yc sin trp, ura, lue, lys.

Soluciones.
Solución LiOAc: 0.1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8.
Solución PEG-LiOAc: 40%p/v PEG_{3350}, 0.1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8.

12.2- Medición de actividad β-galactosidasa.
Se midió la actividad de β-galactosidasa de levaduras L40 transformadas con pBTM116-tzcrk1 y la biblioteca de cDNA, capaces de crecer en el medio de selección Yc-THULL.

Se transfirieron colonias de levaduras a filtros de nitrocelulosa.

Las membranas se colocaron, colonias hacia arriba, sobre un soporte de aluminio que flotaba en nitrógeno líquido. Luego de 30 segundos se sumergieron por 5 segundos.

Los filtros se colocaron, colonias hacia arriba, sobre papel Whatman™ 3MM y se los dejó descongelar a Ta.

Luego se colocaron dentro de la tapa de una caja de petri (10 cm diámetro) sobre papel Whatman™ 3MM humedecido con buffer Z + 50 µl de 25 mg/ml X-gal. La caja se tapó y colocó a 30°C durante 30 min a 1 hr.

Buffer Z: 60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$ pH7.

12.3- Preparación de extractos proteicos.
Cultivos de levaduras crecidos hasta 1-2 $x10^7$ células/ml se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. A partir de este momento, las levaduras se mantuvieron en hielo o a 4°C. Los *pellets* se resuspendieron en 250 µl de solución de lisis y se les agregó un volumen equivalente a 200 µl de bolitas de vidrio lavadas (0.45-0.5 mm). Se agitaron en vortex, a máxima velocidad, 6 veces durante 1 min cada vez. Luego, se les agregaron 250 µl de solución de lisis, se mezcló bien y el líquido se pasó a otro tubo. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad y los sobrenadantes se cuantificaron por bradford y guardaron a -70°C.
Solución de lisis: 100 mM Tris-HCl pH8, 1 mM DTT, 20% glicerol, 1 mM PMSF, 25 U/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina.

12.4- Preparación de bacterias competenes, cepa HB101.
5 ml de un cultivo en estado estacionario se inocularon en 500 ml de LB en erlenmeyer de 2L. Se creció con agitación a 37°C hasta una DO_{550nm}=0.4-0.6. Luego se colocó en hielo por 30 min y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C. El *pellet* bacteriano se resuspendió cuidadosamente en 100 ml de 100 mM $MgCl_2$ y se dejó en hielo por 30 min; se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 10 ml de una solución 100 mM $CaCl_2$,

15 % glicerol. Las células se alicuotaron en *eppendorf* estériles en volúmenes de 200-500 µl, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y guardaron a - 70°C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizaron 150 µl.

12.5- Minipreparación de plásmidos de levadura para transformar bacterias.

Las levaduras se crecieron en 5 ml de medio Yc-TUL durante toda la noche y se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm durante 5'a Ta.

El *pellet* se resuspendió en 0.3 ml de solución de lisis y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Se le agregaron 150 µl de bolitas de vidrio (0.45-0.5 mm) y 0.3 ml de fenol:cloroformo (1:1). Se agitó por 5' en vortex.

Se centrifugó por 5' a máx velocidad y se tomó la fase acuosa.

Para transformar se utilizaron 5-8 µl de la fase acuosa.

Solución de lisis: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8.

12.6- Transformación de bacterias HB101 con minipreparaciones de levaduras.

Bacterias competentes de la cepa HB101 se descongelaron en hielo; 150 µl de las mismas se mezclaron con 5-8 µl de la minipreparación de levaduras y se incubó por 30 min en hielo. Luego se les dio un golpe de calor a 45°C por 45 seg – 1 min y se resuspendieron en medio NZY. Se incubaron con agitación a 37°C por 1 hr. y se plaquearon en medio mínimo M9 + prolina + ampicilina. Se dejaron en estufa a 37°C por 48 hrs.

Medios:

Medio NZY: 1%p/v peptona, 0.5%p/v extracto de levaduras, 0.5%p/v NaCl, 0.094%p/v $MgCl_2$ (anhídro).

Sales M9, 5x: (1 litro) 64 gr. $Na_2HPO_4.7H_2O$, 15gr. KH_2PO_4, 2.5 gr.NaCl, 5gr.NH_4Cl.

Medio mínimo M9 + prolina: sales M9 1x, 20 % glucosa, 2 mM prolina.

13 - COMPLEMENTACIÓN EN LEVADURAS: PROCEDIMIENTO.

13.1- Subclonado de los genes tzcrk1 y 3 en los vectores pYes2(trp), YCpIF2 e YCpIF16.

Los plásmidos pGEX4T-3/tzcrk3 y pGEX4T-3/tzcrk1 se digirieron con la enzimas BamHI y NotI para liberar los fragmentos correspondientes a los genes completos tzcrk3 y tzcrk1, respectivamente. Ambos fragmentos se purificaron de gel utilizando el *kit Geneclean*. tzcrk3 BamHI/NotI se subclonó en el vector de expresión en levaduras YCpIF16 (trp+) en fusión con la proteína HA. El gen tzcrk1 BamHI/NotI se subclonó en los vectores YCpIF2 (leu+) y $pYes_2trp$ (trp+).

13.2- Transformación y selección.

Levaduras mutantes de la cepa *S. cereviseae*, termosensibles para el gen cdc28, se transformaron con 10 µl de minipreparaciones plasmídicas de las construcciones YCpIF16-tzcrk3, YCpIF2-tzcrk1 y pYes$_2$trp-tzcrk1. Levaduras mutantes también se transformaron con los vectores vacíos (sin insertos). Por otro lado, las construcciones YCpIF16-tzcrk3 e YCpIF2-tzcrk1 se co-transformaron en levaduras mutantes y los vectores vacíos, YCpIF16 e YCpIF2, se co-transformaron en levaduras mutantes y salvajes. Luego de las transformaciones las levaduras se sembraron en los correspondientes medios selectivos *drop out*, -leu, -trp o -leu/trp y se incubaron a 23°C durante aproximadamente 48 hrs. Levaduras transformadas se estriaron en las correspondientes placas de selección con galactosa como fuente de carbono y se incubaron a 37°C durante 48-72 hrs.

14 - SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO: PROCEDIMIENTO.

14.1- Levadura L40.

MATa his3D200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)$_4$-HIS3 URA ::(lexAop)$_8$-lacZ gal14?? gal80??.

Los genes para histidina y lacZ estan bajo el control del promotor mínimo de Gal1 y los dominios de unión del sistema LexA.

14.2- Vectores.

pBTM116: este vector permite la expresión de proteínas en fusión con el dominio completo de unión al ADN de LexA (BDLexA). La proteína BDLexA no tiene una secuencia de localización nuclear reduciendo el número de falsos positivos. Este vector lleva los genes para TRP1 y β-lactamasa.

pVP16: este vector permite la expresión de proteínas en fusión con el dominio de activación de la transcripción de VP16 (ADVP16). Lleva los genes para LEU y β-lactamasa.

14.3- Subclonado del gen tzcrk1 en el vector pBTM116.

El gen tzcrk1 se subclonó en el vector de expresión en levaduras pBTM116 (trp+) en fusión con el dominio de unión a ADN del sistema LexA. La estrategia de clonado se detalla a continuación: el vector YCpIF2/tzcrk1 se linealizó por digestión con la enzima de restricción NotI; luego, el total de la digestión se trató con la enzima ADN polimerasa del fago T4 para rellenar el ADN cortado y así formar un extremo romo; la reacción de rellenado estaba compuesta por: 1 mM DTT, 50 µg/ ml de BSA, 300 µM de dCTP, 300 µM de dGTP, buffer T4 y 15 U de la enzima. El total de la reacción se purificó y precipitó. El gen tzcrk1 se liberó por digestión de YCpIF2/tzcrk1 x NotI/T4 con la enzima EcoRI. El fragmento correspondiente a tzcrk1 se purificó del gel, cuantificó y ligó al vector pBTM116 digerido con la enzimas SmaI y

EcoRI y tratado con fosfatasa alcalina de ternero (CIAP).

14.4- Transformación y selección de clones positivos.

La construcción pBTM116-tzcrk1 se empleó para transformar levaduras de la cepa L40; las transformantes fueron seleccionadas a 30°C en placas Yc-TULys. La expresión de la proteína BDLexA-TzCRK1 se comprobó por Western blot utilizando el suero TzCRK1. La L40/pBTM116-tzcrk1 se retransformó con una biblioteca de ADNc construida en el vector pVP16 a partir de ARN total de epimastigotes de *T.cruzi*, gentilmente cedida por el Dr. Harvey Eisen. Los tranformantes fueron seleccionados a 30°C en placas Yc-THULL. Se repicaron, durante tres días, todas las colonias capaces de crecer en el medio de selección y se les determinó la actividad de β-galactosidasa. Los vectores pVP16 recombinantes de las levaduras his+, lacZ+ se pasaron a bacterias *E. coli*, cepa HB101, y se hicieron minipreparaciones para obtener cantidades suficientes de los mismos. Los vectores se analizaron por digestión con diferentes enzimas de restricción y se reagruparon.

14.5- Control de interacción específica.

Como último paso para descartar falsos positivos se hizo el control de interacción específica. Este ensayo consiste en determinar si las proteínas expresadas por estos clones son capaces de asociarse a cualquier proteína y activar el sistema. Un clon de cada grupo se usó para transformar levaduras de la cepa L40 portadoras del vector pBTM116 al que se le subclonó el gen para la lamina (gen inespecífico). La selección de las transformantes se hizo en placas Yc-TUL. Tres clones de cada transformación se estriaron por duplicado en placas Yc-THULL e Yc-TUL. Las colonias crecidas en esta última placa se ensayaron para actividad de β-galactosidasa.

14.6- Secuenciación y análisis.

Todos los clones his^-, $\beta\text{-}gal^-$ ensayados con lamina se secuenciaron utilizando el oligonucleótido 5'pVP16 SP. El análisis y comparación de las secuencias se realizó utilizando los programas ORF y BLAST (Altshchul, S. y col. 1997).

RESULTADOS

RESULTADOS

1 - CLONADO DE LOS GENES tzcrk1 y tzcrk3.

El clonado de los genes completos para TzCRK 1 y 3 se realizó en cuatro etapas:
Etapa 1: Clonado y secuenciación de la región media de los genes tzcrk1 y 3.
Etapa 2: Clonado y secuenciación de la región 5' de los genes tzcrk 1 y 3.
Etapa 3: Clonado y secuenciación de la región 3' de tzcrk 1 y 3.
Etapa 4: Clonado de los genes completos tzcrk1 y tzcrk3.

1.1- Etapa 1: Clonado y secuenciación de la región media de los genes tzcrk1 y tzcrk3.

A partir de secuencias ya conocidas de CDKs de otros organismos se diseñaron 4 oligonucleótidos degenerados que fueron empleados en PCRs. La tabla 3 indica las combinaciones utilizadas y los tamaños esperados. Sólo se obtuvo amplificación con la combinación EL-1/EL-3. La figura 10 muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR. Se pueden distinguir 6 bandas de distinto PM, correspondientes aproximadamente a 200, 300, 350, 1200, 1600 y 2000 pb. Para esta combinación de oligonucleótidos se esperaba un fragmento de 350 pb, por lo cual se decidió subclonar el fragmento de 350 pb en el vector pBS. Se realizó la extracción de ADN plasmídico de 20 colonias y se analizaron por digestión con la enzima de restricción Pvu II. De los 20 plásmidos solo 9 tenían el inserto esperado de 350 pb y se procedió a la secuenciación de los mismos. Cuatro de ellos tenían el mismo inserto cuya secuencia nucleotídica codificaba para un polipéptido que mostró 90% de identidad con la secuencia correspondiente a la proteína CRK3 de *Trypanosoma brucei* (TbCRK3) (datos no mostrados). A esta secuencia se la denominó tzcrk3. La secuencia del inserto de otro plásmido codificaba para un polipéptido que presentaba una identidad del 85.8 % con la CRK1 de *T. brucei*, 84% con la CRK1 de *T. congolense* y 78.3 % con la CRK1 de *L.mexicana mexicana* (datos no mostrados) y se la nombró tzcrk1.

COMBINACIÓN		TAMAÑO ESPERADO
iniciador 5'	**iniciador 3'**	
EL-1	EL-3	350 pb
EL-2	EL-3	260 pb
EL-1	EL-4	475 pb
EL-2	EL-4	375 pb

Tabla 3. Combinación de iniciadores empleados en la PCR de la etapa 1.
Tamaños esperados de fragmentos de PCR, al utilizar las combinaciones de iniciadores indicadas, de acuerdo a las distancias promedio, en pb, entre las secuencias codificadas por los oligonucleótidos en las CDKs de otros organismos.

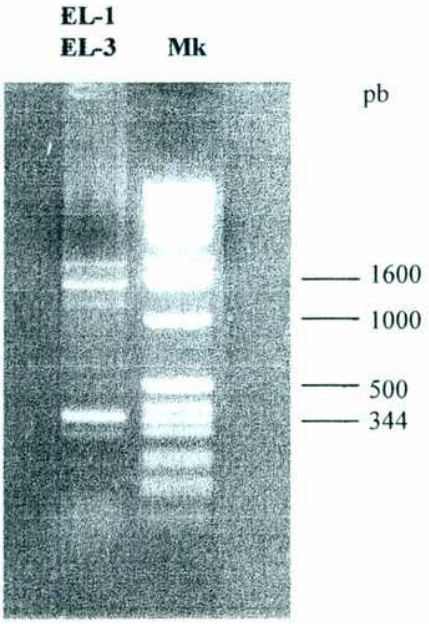


Figura 10. Productos de amplificación de la etapa 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos en la PCR realizada con los oligonucleótidos EL-1 y EL-3.

1.2- Etapa 2: Clonado y secuenciación de la región 5' de los genes tzcrk 1 y tzcrk3.

Para poder identificar la secuencia 5' de los genes que codifican para TzCRK1 y 3, se decidió realizar ensayos de RT/PCR utilizando como oligonucleótido sentido la secuencia del mini-exón. Todos los ARN mensajeros maduros de kinetoplástidos poseen en su extremo 5' una secuencia de aproximadamente 39 nucleótidos conocida como mini-exón (ME). Esta secuencia es adicionada postranscripcionalmente en un evento llamado trans-splicing (Ver Introducción, Trans-splicing). El agregado del ME le proporciona a los mensajeros la 7 metil guanosina (*cap*) en el extremo 5', necesario para la traducción de los mismos. El ME es adicionado siempre en el primer AG luego de una secuencia rica en pirimidinas y la distancia entre este AG y el ATG iniciador de la traducción es variable.

Por otro lado, para ambas CRKs, se diseñaron oligonucléotidos 100 % idénticos a las secuencias ya identificadas, para ser usados como iniciadores antisentidos.

1.2.1- Clonado, secuenciación y análisis de la región 5' de tzcrk 3.

Se realizó una RT/PCR como se indica en la sección Mat y Mét en la cual se amplificó un fragmento de 300 pb. El mismo se subclonó en el vector pBS y los insertos del tamaño esperado se secuenciaron. Por comparación se determinó que correspondían a la región 5' de tzcrk3. Por otro lado, al analizar la región 5' no codificante (5'NC) de los distintos clones, que comprende desde el ME hasta el ATG iniciador, se observó que existían dos tipos diferentes de secuencias, que se las denominó tzcrk3a y tzcrk3b. La figura 11 muesta la comparación entre ambas regiones 5'NC. Como se observa, la secuencia del clon tzcrk3a es 20 nucleótidos más corta. Estos

5'NC. Como se observa, la secuencia del clon tzcrk3a es 20 nucleótidos más corta. Estos resultados indican que existen al menos dos genes capaces de ser transcriptos, que codifican para la proteína TzCRK3.

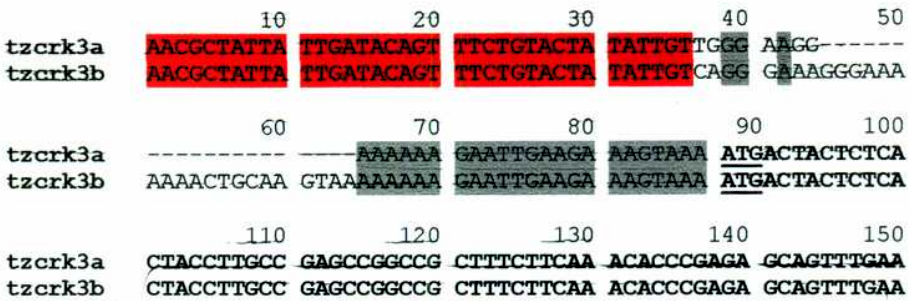


Figura 11. Comparación de la secuencia nucleotídica de los 2 tipos de regiones 5' determinadas para tzcrk 3.
Sombreado gris, representa identidad nucleotídica en la región no codificante; sombreado rojo, secuencia del ME; guiones, deleción de nucleótidos; negritas, secuencias codificantes; el ATG esta subrayado.

1.2.2- Clonado, secuenciación y análisis de la región 5' de tzcrk 1.

Se siguió el mismo procedimiento que para tzcrk 3 empleando los oligonucleótidos ME y TC1et2a. La RT/PCR mostró la amplificación de un fragmento del tamaño esperado, el cual se subclonó y secuenció. Al comparar con la secuencia ya conocida de tzcrk1 no presentaba identidad, por lo cual se decidió diseñar los oligonucleótidos TC1et2-I, II y III. La figura 12 muestra un esquema con la estrategia utilizada. Se realizó una RT/PCR con los iniciadores ME y TC1et2-I y una PCR semianidada utilizando los iniciadores ME y TC1et2-II. Los productos de cada una de éstas PCRs fueron sometidos a un ensayo de Southern blot utilizando como sonda el oligonucleótido TC1et2-III. Esta sonda hibridó, en ambas PCRs, con 2 fragmentos de aproximadamente 450 y 330 pb (datos no mostrados). Los productos obtenidos en la PCR semianidada sé subclonaron. Todos los plásmidos con insertos de aproximadamente 450 y 330 pb se secuenciaron y analizaron. Existían 4 tipos diferentes de insertos que se denominaron tzcrk1a (434 pb), tzcrk1b (333pb), tzcrk1c (477pb) y tzcrk1d (323pb). Todos tienen la misma región 5' codificante para el gen tzcrk1 pero diferentes regiones 5' no codificantes. Al analizar las regiones 5'NC se observó que las mismas se podían agrupar de a pares, tzcrk1a con tzcrk1b (Fig. 13A) y tzcrk1c con tzcrk1d (Fig. 13B); ambos grupos tenían una secuencia larga, tzcrk1a y c, y una secuencia corta, tzcrk1b y d. El sombreado de la figura 13 muestra que las regiones 5'NC largas y cortas tienen la misma secuencia desde el nucleótido -1 hasta el miniexón de la secuencia corta. Las variaciones en el tamaño podrían ser el resultado del uso de diferentes sitios

aceptores, dinucleótido AG, para la adición del miniexón. Estos resultados sugieren que los diferentes ADNc obtenidos podrían ser productos de eventos de trans-splicing alternativo, donde el sitio aceptor de la secuencia corta es el primer AG presente después de la secuencia rica en pirimidinas que se observa en la secuencia larga (Fig. 13C).

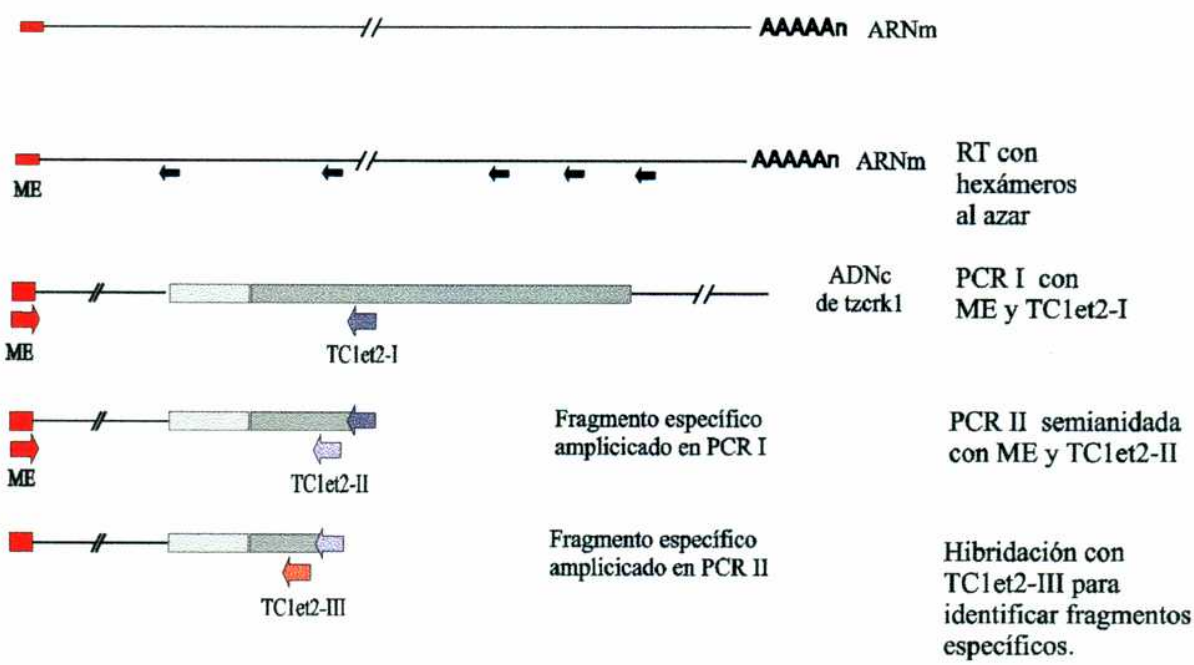
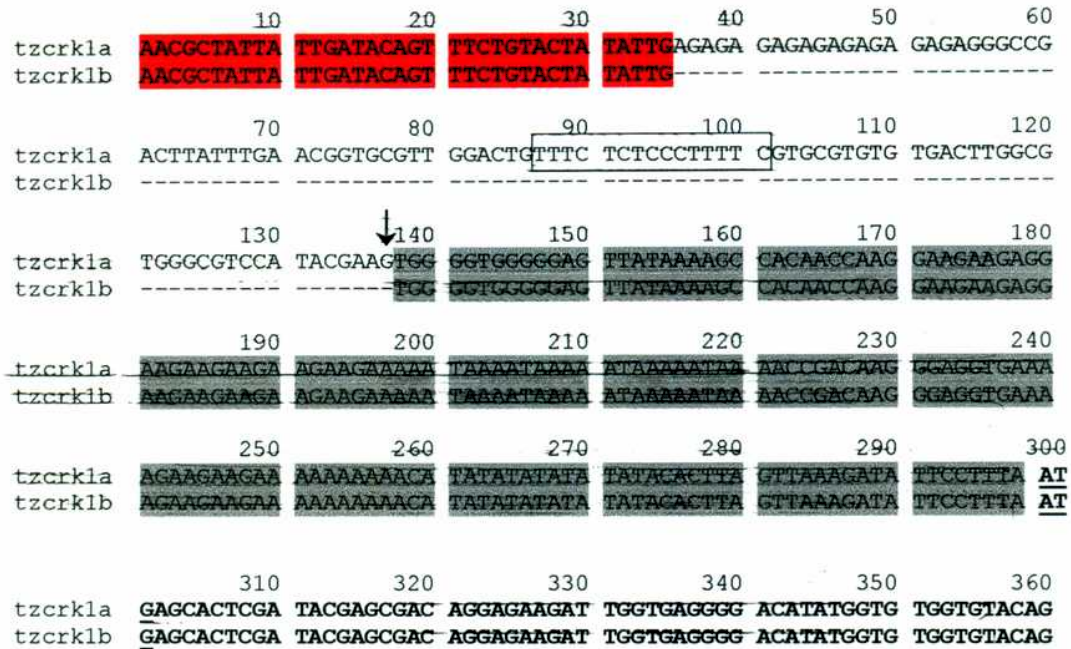
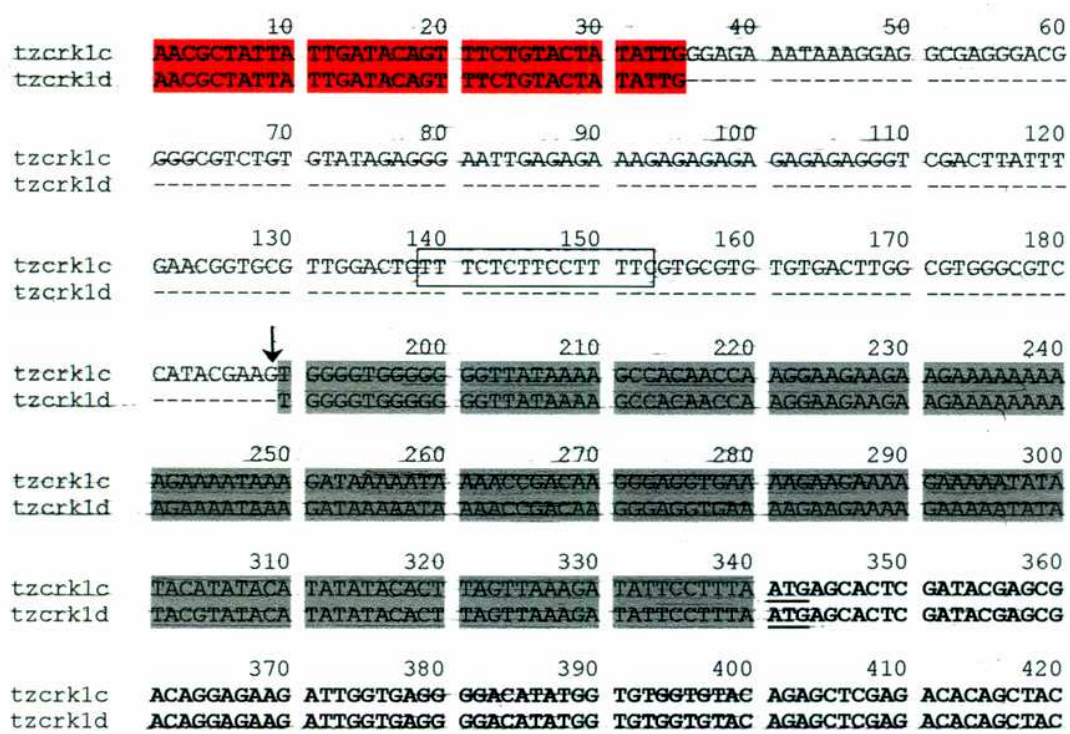


Figura 12. Esquema de la estrategia de clonado de la región 5'de tzcrk1.
ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* se empleó como templado en reacciones de RT realizadas con hexámeros de secuencia azarosa. Mitad de la RT se empleó en una PCR con los iniciadores ME y TC1et2-I. 1 µl de la misma se usó como templado en una PCR semianidada con los iniciadores ME y TC1et2-II. Los fragmentos específicos se reconocieron por hibridación con el oligonucleótido TC1et2-III.

A


10 20 30 40 50 60
tzcrk1a AACGCTATTA TTGATACAGT TTCTGTACTA TATTGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGGGCCG
tzcrk1b AACGCTATTA TTGATACAGT TTCTGTACTA TATTG----- ---------- ----------
70 80 90 100 110 120
tzcrk1a ACTTATTTGA ACGGTGCGTT GGACTGTTTC TCTCCCTTTT CGTGCGTGTG TGACTTGGCG
tzcrk1b ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
130 140 150 160 170 180
tzcrk1a TGGGCGTCCA TACGAAGTGG GGTGGGGGAG TTATAAAAGC CACAACCAAG GAAGAAGAGG
tzcrk1b ---------- -------TGG GGTGGGGGAG TTATAAAAGC CACAACCAAG GAAGAAGAGG
190 200 210 220 230 240
tzcrk1a AAGAAGAAGA AGAAGAAAAA TAAAATAAAA ATAATAATAA AACCGACAAG GGAGGTGAAA
tzcrk1b AAGAAGAAGA AGAAGAAAAA TAAAATAAAA ATAAAAATAA AACCGACAAG GGAGGTGAAA
250 260 270 280 290 300
tzcrk1a AGAAGAAGAA AAAAAAAACA TATATATATA TATACACTTA GTTAAAGATA TTCCTTTA AT
tzcrk1b AGAAGAAGAA AAAAAAAACA TATATATATA TATACACTTA GTTAAAGATA TTCCTTTA AT
310 320 330 340 350 360
tzcrk1a GAGCACTCGA TACGAGCGAC AGGAGAAGAT TGGTGAGGGG ACATATGGTG TGGTGTACAG
tzcrk1b GAGCACTCGA TACGAGCGAC AGGAGAAGAT TGGTGAGGGG ACATATGGTG TGGTGTACAG

B


10 20 30 40 50 60
tzcrk1c AACGCTATTA TTGATACAGT TTCTGTACTA TATTGGGAGA AATAAAGGAG GCGAGGGACG
tzcrk1d AACGCTATTA TTGATACAGT TTCTGTACTA TATTG----- ---------- ----------
70 80 90 100 110 120
tzcrk1c GGGCGTCTGT GTATAGAGGG AATTGAGAGA AAGAGAGAGA GAGAGAGGGT CGACTTATTT
tzcrk1d ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
130 140 150 160 170 180
tzcrk1c GAACGGTGCG TTGGACTGTT TCTCTTCCTT TTGGTGCGTG TGTGACTTGG CGTGGGCGTC
tzcrk1d ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
200 210 220 230 240
tzcrk1c CATACGAAGT GGGGTGGGGG GGTTATAAAA GCCACAACCA AGGAAGAAGA AGAAAAAAAA
tzcrk1d ---------T GGGGTGGGGG GGTTATAAAA GCCACAACCA AGGAAGAAGA AGAAAAAAAA
250 260 270 280 290 300
tzcrk1c AGAAAATAAA GATAAAAATA AAACCGACAA GGGAGGTGAA AAGAAGAAAA GAAAAATATA
tzcrk1d AGAAAATAAA GATAAAAATA AAACCGACAA GGGAGGTGAA AAGAAGAAAA GAAAAATATA
310 320 330 340 350 360
tzcrk1c TACATATACA TATATACACT TAGTTAAAGA TATTCCTTTA ATGAGCACTC GATACGAGCG
tzcrk1d TACGTATACA TATATACACT TAGTTAAAGA TATTCCTTTA ATGAGCACTC GATACGAGCG
370 380 390 400 410 420
tzcrk1c ACAGGAGAAG ATTGGTGAGG GGACATATGG TGTGGTGTAC AGAGCTCGAG ACACAGCTAC
tzcrk1d ACAGGAGAAG ATTGGTGAGG GGACATATGG TGTGGTGTAC AGAGCTCGAG ACACAGCTAC

C

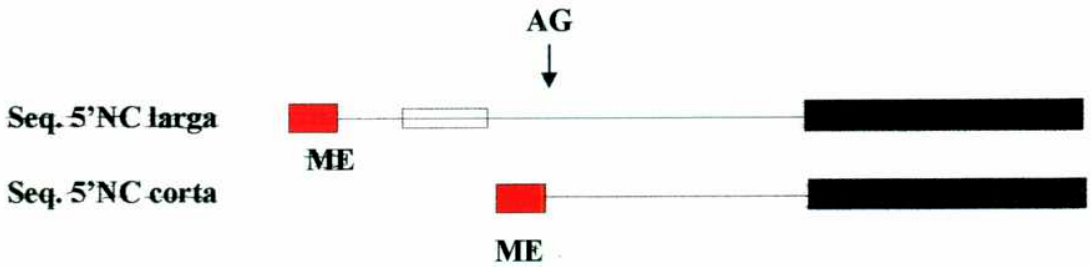


Figura 13. Comparación de secuencia de los 4 tipos de regiones 5'NC identificadas para tzcrk1. (**A**) Comparación nucleotídica de tzcrk1a y b. (**B**) Comparación nucleotídica de tzcrk1c y d. (**C**) Esquema de las secuencias comparadas en (A) y (B). Sombreado gris, indica identidad nucleotídica en la región no codificante; sombreado rojo, secuencia del ME; guiones, deleción de nucleótidos; negritas y cajas negras, representan secuencias codificantes; el ATG esta subrayado; cajas vacías representan el tracto de polipirimidinas; la flecha en la secuencia larga indica posible sitio de adición del miniexón en la secuencia corta.

1.3- Etapa 3: Clonado y secuenciación de la región 3' de tzcrk 1 y 3.

Para el clonado de la región 3' de ambos genes se aplicó la técnica *jumping PCR*. La técnica de *jumping PCR* sirve para amplificar regiones de ADN que estén bordeando alguna secuencia ya conocida.

***Jumping PCR*: concepto teórico.**

El *jumping* PCR consiste en amplificar regiones de ADN a partir de un oligonucleótido 100% idéntico a una secuencia conocida y un oligonucleótido con una secuencia totalmente inespecífica. El anidado de la PCR se realiza a baja temperatura para permitir el pegado del iniciador inespecífico. Luego se utiliza una alícuota de esta primer PCR como templado para una segunda PCR, cuyos oligonucleótidos serían el mismo iniciador inespecífico y uno 100 % idéntico, distinto al primero, que se encuentre río abajo de éste (PCR semianidada). Luego, alícuotas de cada una de las PCRs se resuelven en gel de agarosa y los fragmentos se transfieren e hibridan con un tercer oligonucleótido de secuencia 100 % idéntica, que esté dentro de la secuencia amplificada. Todas las PCRs que tengan bandas que hayan hibridado con la sonda se ligan a algún vector y con ellos se transforman bacterias. Luego, las colonias con insertos de interés se identifican por hibridación de colonias utilizando la misma sonda.

1.3.1- *Jumping PCR* para tzcrk 1 y tzcrk 3.

Para cada una de las quinasas se diseñaron 3 oligonucleótidos 100 % idénticos a partir de las secuencias ya identificadas en la etapa 1. La figura 14 muestra un esquema con la estrategia

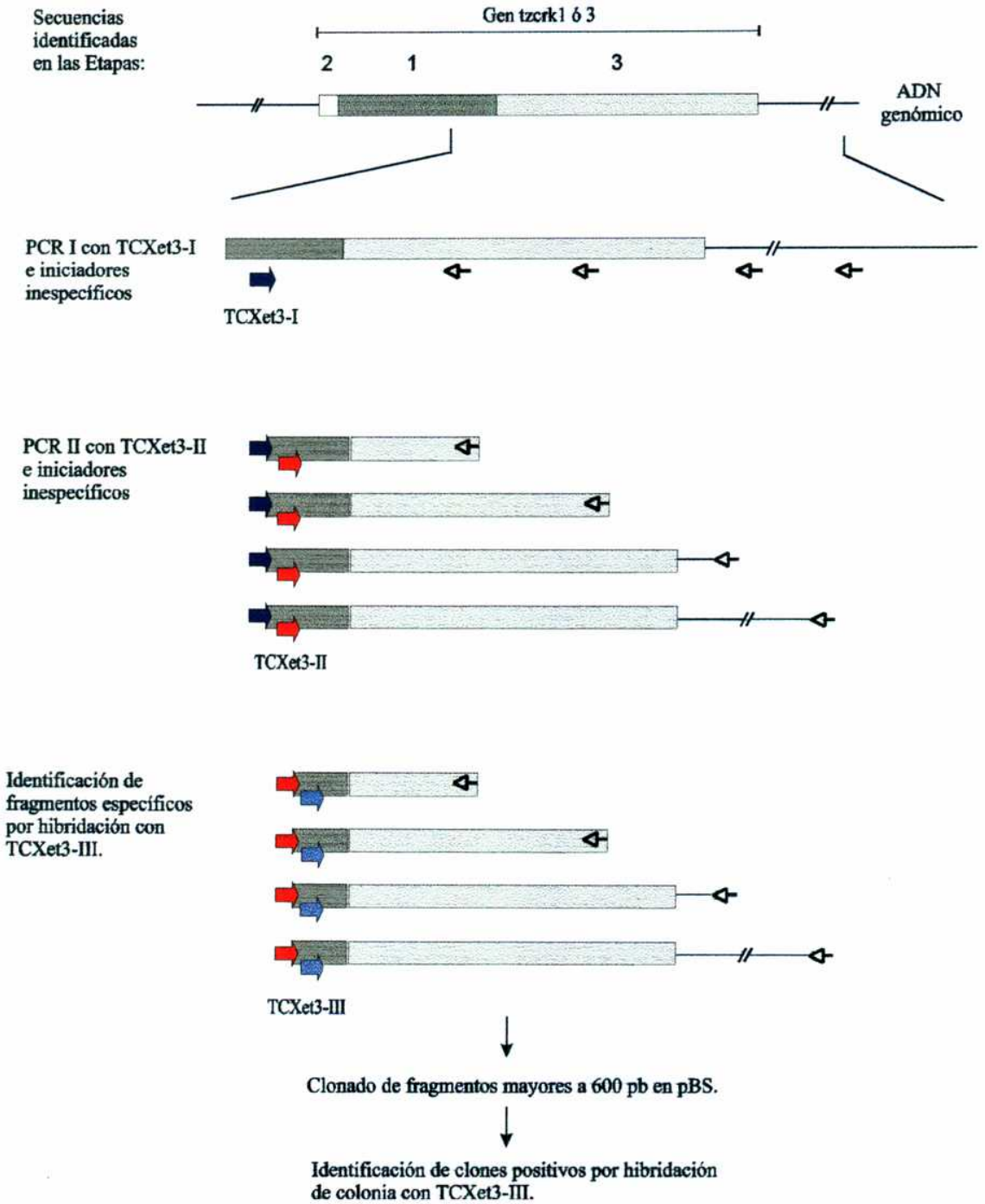


Figura 14. Esquema de la estrategia empleada para identificar las regiones 3' de los genes tzcrk1 y 3.

La caja blanca representa la región codificante identificada en la etapa 2; la caja gris oscura la identificada en la etapa 1 y la caja gris clara la identificada en la etapa 3. X: 1 o 3. ⇦ iniciadores inespecíficos.

utilizada. Las primeras PCRs (PCRs I) para tzcrk3 y 1 se realizaron con ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi* utilizando como iniciadores sentido TC3et3-I y TC1et3-I, respectivamente, y como antisentido 14 oligonucleótidos con secuencias totalmente inespecíficas. Cabe aclarar que se realizaron 14 PCRs independientes para cada quinasa, todas con el mismo iniciador sentido, TC3et3-I o TC1et3-I y los distintos iniciadores antisentido (inespecíficos). 1 µl de estas PCRs se usó como molde en segundas PCRs (PCRs II), las que se hicieron con los mismos oligonucleótidos inespecíficos y TC3et3-II o TC1et3-II, según la quinasa. Los oligos TC3et3-III y TC1et3-III se emplearon como sondas en ensayos de Southern blot para identificar fragmentos específicos en las PCRs I y II. Según los tamaños de CRKs de otros kinetoplástidos se esperaba que las regiones 3' faltantes de las CRKs de *T. cruzi* fueran mayores a 600 pb. Por lo tanto se decidió subclonar todos aquellos fragmentos mayores o iguales a 600 pb. Los clones positivos, identificados por hibridación de colonias utilizando como sondas los mismos oligonucleótidos del Southern blot (TC3et3-III o TC1et3-III), sé miniprepararon y analizaron por digestión. Aquellos clones cuyos insertos tenían los tamaños esperados se secuenciaron. Todos los insertos analizados correspondían a las regiones 3' de las quinasas.

1.4- Etapa 4: Clonado y análisis de los genes completos para TzCRK1 y TzCRK3.

Para el clonado de los genes completos de tzcrk3 y tzcrk1 se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido a partir de las secuencias 5' y 3' obtenidas en las etapas 2 y 3 respectivamente. Estos oligonucleótidos se emplearon en PCRs usando como templado ADN de epimastigotes de *T.cruzi*. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa y las bandas correspondientes a tzcrk3 (930 pb) y tzcrk1 (900 pb) se purificaron y subclonaron en el vector de expresión pGEX4T-3, en marco con la proteína glutatión S-transferasa (GST).

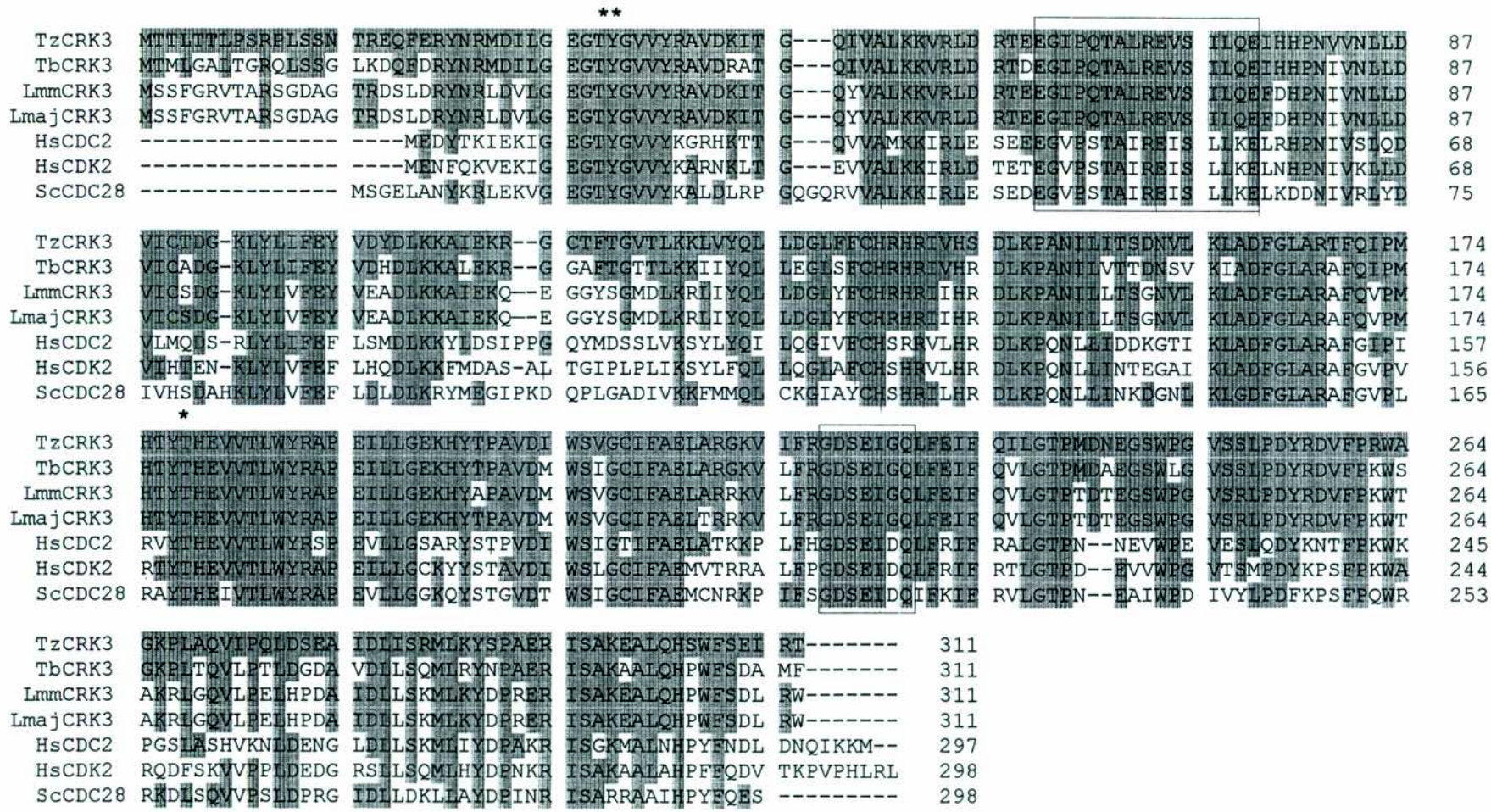
La secuencia aminoacídica completa codificada por los genes tzcrk1 y tzcrk3 fue analizada con el programa BLAST 2.0 (Altschul, F. y col. 1997) utilizando diversas bases de datos. Los resultados indican que TzCRK1 y 3 pertenecen a la familia de quinasas dependientes de ciclinas. La figura 15 muestra comparaciones aminoacídicas de TzCRK3 y TzCRK1 con diferentes CDKs. TzCRK3 presenta 82% de identidad con TbCRK3 y 87 % con LmajCRK3 y 89 % con LmmCRK3, 51.5%, 54.4% y 51% de identidad con la CDC2 humana, CDK2 humana y CDC28 de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. TzCRK1 tiene 78% de identidad con LmmCRK1, 83% con TbCRK1 y 84% con TcCRK1, mientras que con la CDC2 humana, CDK2 humana y CDC28 de *Saccharomyces cerevisiae*, posee una identidad de 52.7%, 52.7% y 51% respectivamente. Los miembros pertenecientes a la familia de las quinasas reguladas por ciclinas poseen dominios característicos que los diferencian de las demás quinasas de Ser/Tre. Existe una secuencia muy conservada de 16 aminoácidos conocida como la caja PSTAIRE (Fig. 15), que corresponde al sitio de unión de las CDKs con ciclinas. Esta secuencia es muy importante para identificar quinasas relacionadas a la CDC2 (Mottram, J.C. 1994). En la proteína TzCRK3 existen variaciones en 6 aminoácidos de dicha secuencia, mientras que en la TzCRK1 hay una sola sustitución en la que la Ser cambia por Cis (Fig. 15).

La actividad de la CDC2 humana está controlada por la fosforilación de 3 aminoácidos, la Tre 14 y la Tir 15 en el dominio de unión del ATP y la Tre161 (asteriscos en Fig. 15). Estos tres aminoácidos se encuentran presentes en la mayoría de las CDKs identificadas hasta el momento (Mottram, J.C. 1994). Ambas quinasas de *T. cruzi* poseen estos tres aminoácidos en posiciones equivalentes a la HsCDC2.

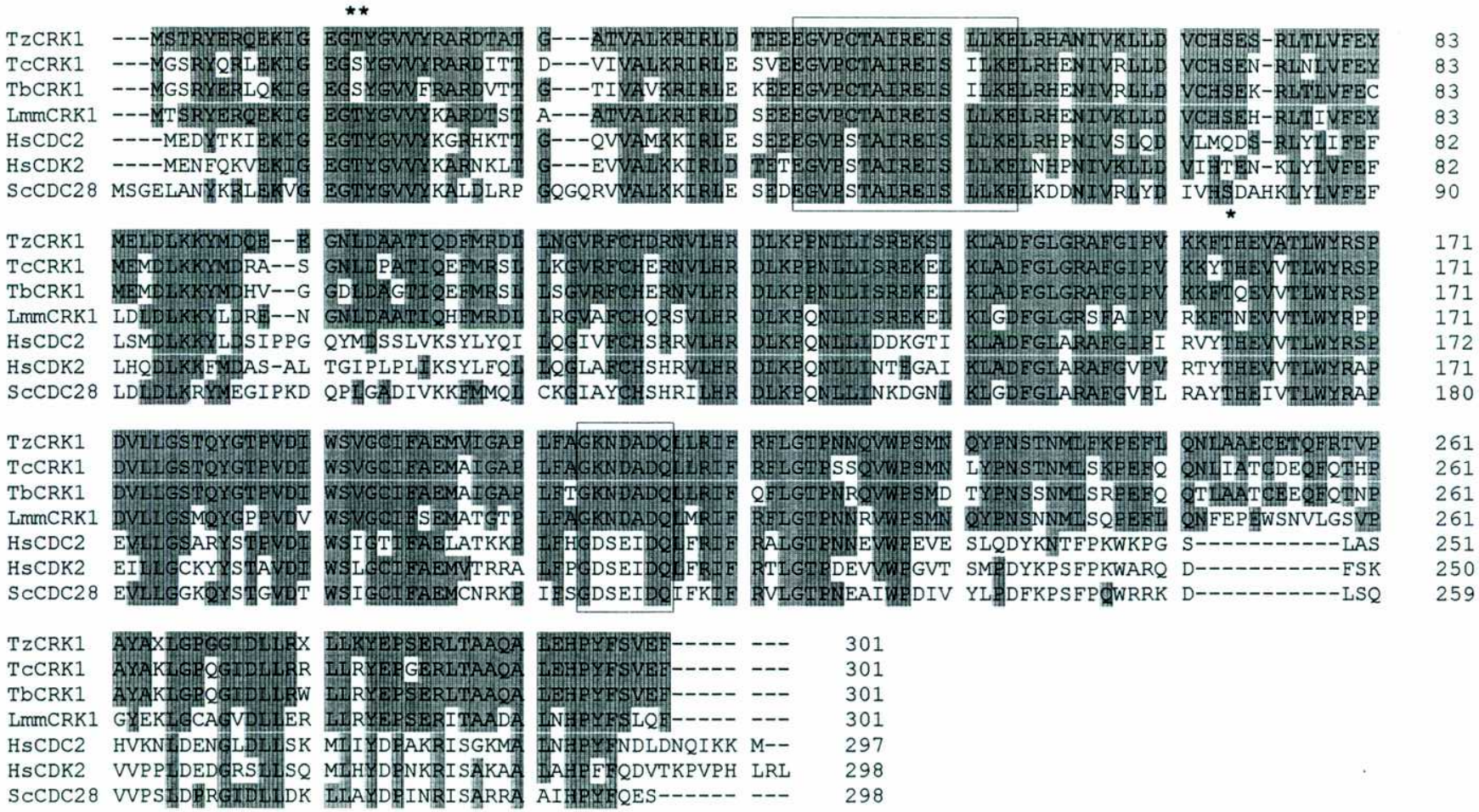
En las quinasas de la familia de la CDC2 existe otro dominio muy característico, la caja DSEI, compuesta por los aminoácidos GDSEIDQ (Fig. 15). Esta estaría involucrada en la regulación de la fosforilación del residuo Tre161 y en la unión con ciclinas. La proteína TzCRK3 tiene una sola sustitución en este dominio, donde el segundo ácido aspártico está cambiado por glicina, mientras que en la TzCRK1 en el lugar de los aminoácidos DSEI están presentes los aminoácidos KNDA.

Figura 15. Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de TzCRK3 y TzCRK1 con diferentes quinasas del ciclo celular.
Los aminoácidos con identidad a TzCRK3 o TzCRK1 estan sombreados. **(A)** Comparación de TzCRK3 con TbCRK3, LmmCRK3, LmajCRK3, HsCDC2, HsCDK2 y ScCDC28. **(B)** Comparación de TzCRK1 con TcCRK1, TbCRK1, LmmCRK1, HsCDC2, HsCDK2 y ScCDC28. En asteriscos se indican los aminoácidos equivalentes a Tre14, Tir15 y Tre161 de la CDC2 humana. Las cajas PSTAIRE y DSEI están recuadradas. Las secuencias aminoacídicas se alinearon usando el programa CLUSTAL W. Hs, human; Tb, *T. brucei*; Tc, *T. congolense*; Lmm, *L. mexicana mexicana*; Lmaj, *L. major*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae.*

A



B

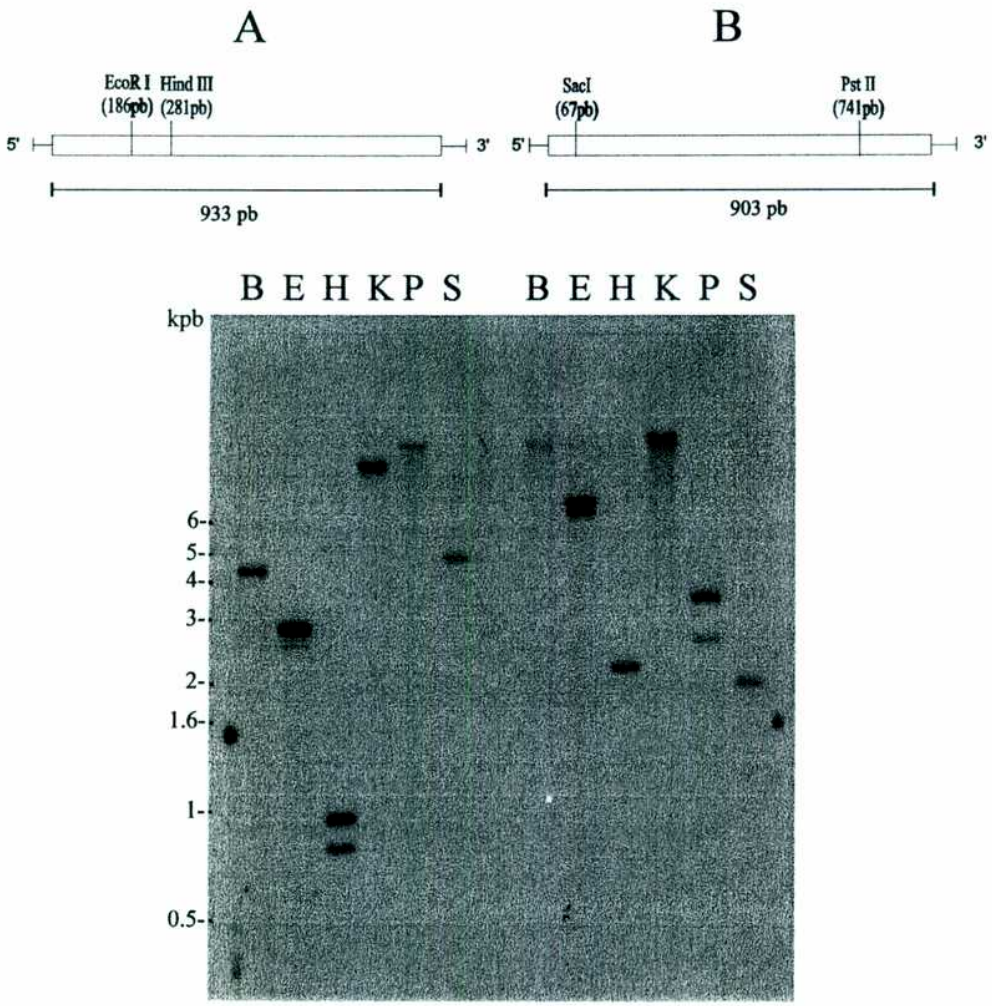

TzCRK1 ---MSTRYERQEKIG EGTYGVVYRARDTAT G---ATVALKRIRLD TEEEGVPCTAIREIS LLKELRHANIVKLLD VCHSES-RLTLVFEY 83
TcCRK1 ---MGSRYQRLEKIG EGSYGVVYRARDITT D---VIVALKRIRLE SVEEGVPCTAIREIS ILKELRHENIVRLLD VCHSEN-RLNLVFEY 83
TbCRK1 ---MGSRYERLQKIG EGSYGVVFRARDVTT G---TIVAVKRIRLE KEEEGVPCTAIREIS ILKELRHENIVRLLD VCHSEK-RLTLVFEC 83
LmmCRK1 ---MTSRYERQEKIG EGTYGVVYKARDTST A---ATVALKRIRLD SEEEGVPCTAIREIS LLKELRHENIVKLLD VCHSEH-RLTIVFEY 83
HsCDC2 ----MEDYTKIEKIG EGTYGVVYKGRHKTT G---QVVAMKKIRLE SEEEGVPSTAIREIS LLKELRHPNIVSLQD VLMQDS-RLYLIFEF 82
HsCDK2 ----MENFQKVEKIG EGTYGVVYKARNKLT G---EVVALKKIRLD TETEGVPSTAIREIS LLKELNHPNIVKLLD VIHTEN-KLYLVFEF 82
ScCDC28 MSGELANYKRLEKVG EGTYGVVYKALDLRP GQGQRVVALKKIRLE SEDEGVPSTAIREIS LLKELKDDNIVRLYD IVHSDAHKLYLVFEF 90
TzCRK1 MELDLKKYMDQE--E GNLDAATIQDFMRDL LNGVRFCHDRNVLHR DLKPPNLLISREKSI KLADFGLGRAFGIPV KKFTHEVATLWYRSP 171
TcCRK1 MEMDLKKYMDRA--S GNLDPATIQEFMRSL LKGVRFCHERNVLHR DLKPPNLLISREKEL KLADFGLGRAFGIPV KKYTHEVVTLWYRSP 171
TbCRK1 MEMDLKKYMDHV--G GDLDAGTIQEFMRSL LSGVRFCHERNVLHR DLKPPNLLISREKEL KLADFGLGRAFGIPV KKFTQEVVTLWYRSP 171
LmmCRK1 LDLDLKKYLDRE--N GNLDAATIQHFMRDL LRGVAFCHQRSVLHR DLKPQNLLISREKEI KLGDFGLGRSFAIPV RKFTNEVVTLWYRPP 171
HsCDC2 LSMDLKKYLDSIPPG QYMDSSLVKSYLYQI LQGIVFCHSRRVLHR DLKPQNLLIDDKGTI KLADFGLARAFGIPI RVYTHEVVTLWYRSP 172
HsCDK2 LHQDLKKFMDAS-AL TGIPLPLIKSYLFQL LQGLAFCHSHRVLHR DLKPQNLLINTEGAI KLADFGLARAFGVPV RTYTHEVVTLWYRAP 171
ScCDC28 LDLDLKRYMEGIPKD QPLGADIVKKFMMQL CKGIAYCHSHRILHR DLKPQNLLINKDGNL KLGDFGLARAFGVPL RAYTHEIVTLWYRAP 180
TzCRK1 DVLLGSTQYGTPVDI WSVGCIFAEMVIGAP LFAGKNDADQLLRIF RFLGTPNNQVWPSMN QYPNSTNMLFKPEFL QNLAAECETQFRTVP 261
TcCRK1 DVLLGSTQYGTPVDI WSVGCIFAEMAIGAP LFAGKNDADQLLRIF RFLGTPSSQVWPSMN LYPNSTNMLSKPEFQ QNLIATCDEQFQTHP 261
TbCRK1 DVLLGSTQYGTPVDI WSVGCIFAEMAIGAP LFTGKNDADQLLRIF QFLGTPNRQVWPSMD TYPNSSNMLSRPEFQ QTLAATCEEQFQTNP 261
LmmCRK1 DVLLGSMQYGPPVDV WSVGCIFSEMATGTP LFAGKNDADQLMRIF RFLGTPNNRVWPSMN QYPNSNNMLSQPEFL QNFEPEWSNVLGSVP 261
HsCDC2 EVLLGSARYSTPVDI WSIGTIFAELATKKP LFHGDSEIDQLFRIF RALGTPNNEVWPEVE SLQDYKNTFPKWKPG S-----------LAS 251
HsCDK2 EILLGCKYYSTAVDI WSLGCIFAEMVTRRA LFPGDSEIDQLFRIF RTLGTPDEVVWPGVT SMPDYKPSFPKWARQ D-----------FSK 250
ScCDC28 EVLLGGKQYSTGVDT WSIGCIFAEMCNRKP IFSGDSEIDQIFKIF RVLGTPNEAIWPDIV YLPDFKPSFPQWRRK D-----------LSQ 259
TzCRK1 AYAXLGPGGIDLLRX LLKYEPSERLTAAQA LEHPYFSVEE----- --- 301
TcCRK1 AYAKLGPQGIDLLRR LLRYEPGERLTAAQA LEHPYFSVEE----- --- 301
TbCRK1 AYAKLGPQGIDLLRW LLRYEPSERLTAAQA LEHPYFSVEE----- --- 301
LmmCRK1 GYEKLGCAGVDLLER LLRYEPSERITAADA LNHPYFSLQE----- --- 301
HsCDC2 HVKNLDENGLDLLSK MLIYDPAKRISGKMA LNHPYFNDLDNQIKK M-- 297
HsCDK2 VVPPLDEDGRSLLSQ MLHYDPNKRISAKAA LAHPFFQDVTKPVPH LRL 298
ScCDC28 VVPSLDPRGIDLLDK LLAYDPINRISARRA AIHPYFQES------ --- 298

2 - ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE tzcrk1 y tzcrk3 (SOUTHERN BLOTS).

Con el objetivo de determinar la presencia y estudiar la organización genómica de los genes tzcrk1 y 3 se realizaron ensayos de Southern blot. ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, se digirió por separado con diferentes enzimas de restricción (Fig. 16). Los genes completos tzcrk1 y tzcrk3 fueron utilizados como sondas. La figura 16 muestra los resultados obtenidos y esquemas de cada uno de los genes indicando los sitios de corte para las enzimas utilizadas. En la figura 16A se muestran los resultados para el gen tzcrk3. Esta sonda revela una sola banda en las calles correspondientes al ADN digerido con las enzimas BamHI (4 kpb), KpnI (~ 9 kpb), PstI (> 10 kpb) y SacI (4.9 kpb), dos bandas con una leve diferencia de intensidad para la digestión con HindIII (0.99 y 0.8 kpb) y dos bandas de diferente intensidad en la calle de EcoRI (2.9 y 2.5 kpb). En el esquema se muestra que el gen tzcrk3 no tiene sitios de corte para las enzimas BamHI, KpnI, PstI y SacI y tiene un sitio de corte en la posición 281 para HindIII y uno en la posición 186 para EcoRI. Estos resultados sugieren que este gen estaría presente en el genoma de *T. cruzi* como gen de copia única por genoma haploide.

La sonda tzcrk1 detectó una banda en las calles correspondientes al ADN digerido con las enzimas BamHI (> 10 kpb), HindIII (2.2 kpb), KpnI (> 10 kpb) y SacI (2.0 kpb), y dos bandas con intensidades levemente diferentes para las digestiones con EcoRI (7 y 6.5 kpb) y PstI (3.5 y 2.6 kpb) (Fig. 16B). Como se ve en el esquema, el gen tzcrk1 no tiene sitios de corte para las enzimas BamHI, HindIII, KpnI y EcoRI, y tiene un sitio para PstI (posición 741) y SacI (posición 67). La sonda tzcrk1 revela una sola banda en la digestión con SacI a pesar de tener un sitio de corte para esta enzima. Esto puede deberse a que la hibridación de la sonda sea poco eficiente ya que la porción a ser reconocida es muy pequeña (67 pb). Los resultados sugieren que éste es un gen de copia única. Por otro lado, se observa que esta sonda revela dos fragmentos en la digestión con EcoRI a pesar de no tener sitio de corte en el gen. El análisis de las regiones 5'NC del gen tzcrk1 (etapa 2) demuestra que existen, al menos, dos copias para este gen, cuyos transcriptos podrían ser productos de eventos de trans-splicing alternativo obteniéndose los 4 tipos de transcriptos que se muestran la figura 13. Conociendo que los kinetoplástidos presentan polimorfismo entre sus cromosomas homólogos, estos resultados sugieren que los loci para este gen serían polimórficos en sus regiones NC.

Figura 16. Ensayo de Southern blot.
El ADN de epimastigotes de *T. cruzi* fue digerido con distintas enzimas de restricción como se indica. Se muestra un esquema con los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas. **(A)** Membrana hibridada con la sonda tzcrk 3. **(B)** Membrana hibridada con la sonda tzcrk 1. B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; K, KpnI; P, PstI; S, SacI.



3 - ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT.

ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* se analizó por Northern blot utilizando como sondas los fragmentos clonados en la etapa 1 para tzcrk1 y 3. La sonda tzcrk3 hibrida con mensajeros cuyos PM varían entre 1.2 y 1.4 kb (Fig. 17). Por este método no se pudo obtener el número exacto de bandas, pero el análisis de las regiones 5'NC (Fig. 11) indica que este gen tiene al menos dos transcriptos con una diferencia de 21 nt en su región 5'NC. La región 3' no codificante no fue analizada, por lo cual, estos resultados sugieren que la diferencia entre los mensajeros revelados en el Northern blot estaría en la longitud de las regiones 3' no codificantes.

El Northern blot para tzcrk1 la sonda reveló una banda ancha entre 1.6 –1.7 kb (Fig. 17). Al igual que para tzcrk3 la región 3' no codificante no fue analizada y no se puede determinar el número exacto de bandas. Las comparaciones de las regiones 5'NC (Fig. 13) para este gen muestran que tzcrk1 tiene al menos cuatro transcriptos con diferencias de hasta 100 bases. Estos resultados indican que la banda observada en la figura 17 está formada por al menos cuatro mensajeros con diferencias de hasta 100 bases.

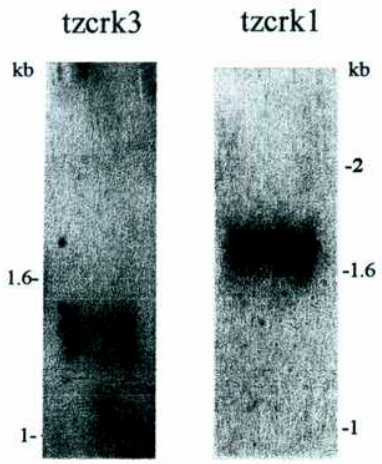


Figura 17. Ensayo de Northern blot. ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 2%, transferido a nylon e incubado con sondas para tzcrk3 y tzcrk1 como se indica.

4 - Estudio por RT/PCR de la Expresión de tzcrk 1 y tzcrk 3 en la Forma No Replicativa (Tripomastigote) de *T. cruzi*.

Las función más conocida, hasta el momento, de las proteínas pertenecientes a la familia de la CDC2 quinasa es la de regular el ciclo celular. En kinetoplástidos no se conocen aún sus funciones. Como estos organismos tienen un ciclo de vida en el cual existen formas replicativas y no replicativas, se decidió estudiar la presencia de ARNm para estas quinasas en la forma tripomastigote (no replicativa) del parásito.

Se extrajo ARN total de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL. Se realizaron reacciones de RT con distintas concentraciones de ARN total. Las PCRs se hicieron usando los oligonucleótidos ME y TC3et2 o ME y TC1et2-I para determinar la expresión de las regiones 5' de tzcrk 3 y tzcrk 1, respectivamente. La figura 18 muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las PCRs. Para ambos estadíos se observa la amplificación de fragmentos del mismo tamaño. Estos resultados indican que las dos quinasas son transcriptas también en el estadío tripomastigote. Por otro lado, al utilizar los iniciadores para tzcrk1, en las dos formas del parásito se amplifican los framentos de 450 y 330 pb, que corresponden a los transcriptos cortos

y largos referidos en la figura 13. Se descarta la posibilidad de contaminación de ARN de epimastigotes en las muestras de tripomastigotes ya que las intensidades de las bandas visualizadas al UV, las cuales corresponden a la cantidad de ADN amplificado, son similares cuando se usan las mismas concentraciones de ARN en las RT.

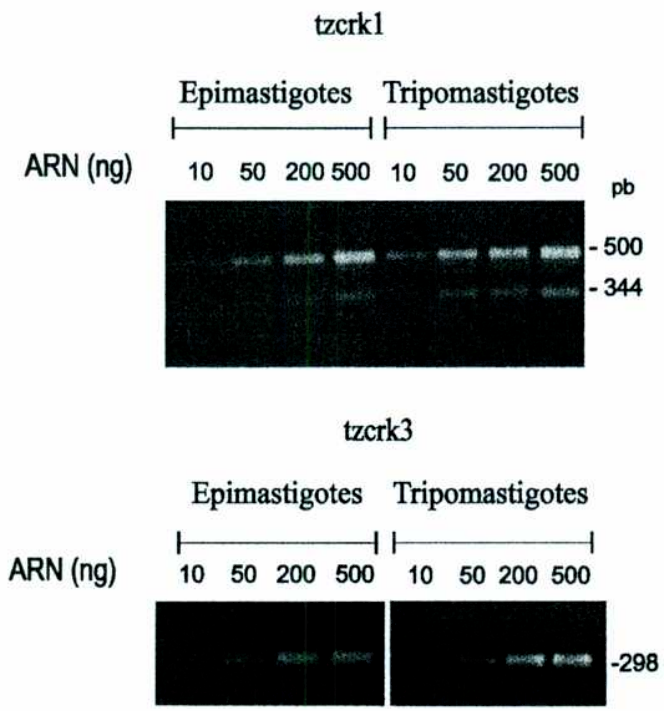


Figura 18. Estudio de la expresión de tzcrk1 y 3 en las formas epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*.
Electroforesis en gel de 1% agarosa de los productos de las RT/PCRs realizadas con distintas cantidades de ARN total de epimastigotes o tripomastigotes de *T. cruzi*, utilizando los iniciadores ME y TC3et2 (tzcrk3) o ME y TC1et2-I (tzcrk1).

5 - Expresión de las Proteínas TzCRK1 y TzCRK3 en Cultivos Bacterianos.

5.1- Expresión de GST-TzCRK1.

El gen completo tzcrk1 fue clonado en el vector de expresión pGEX4T-3 en fusión con la proteína glutatión S-transferasa (GST). Cultivos de *E. coli*, cepa DH5α, transformados con la construcción pGEX4T-3/tzcrk1 fueron tratados con IPTG para inducir la expresión de la proteína recombinante. Al analizar la localización de la misma (soluble/insoluble) se determinó que la proteína está presente en el citoplasma (fracción soluble) por lo cual se procedió a su purificación utilizando una matriz de glutatión-agarosa. La figura 19 muestra un SDS-PAGE

teñido con azul de Coomassie, donde se observa la proteína GST-TzCRK1 purificada y su expresión en cultivos de *E. coli*. La proteína recombinante tiene un PM de 60 kDa correspondiente a la suma de los PM de la GST (27 kDa) y TzCRK1 (33 kDa). La GST-TzCRK1 se cuantificó y utilizó en ensayos de fosforilación y como antígeno para la elaboración de un antisuero específico.

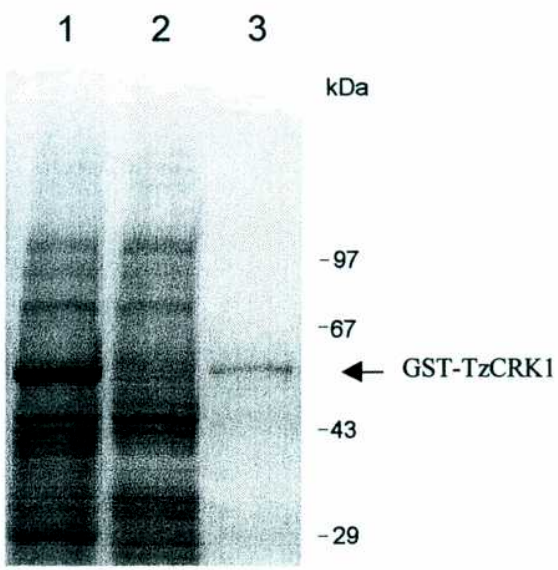


Figura 19. Purificación de GST-TzCRK1. SDS-PAGE 12% teñido con Azul de Coomassie. Calle 1, extracto de *E. coli* transformado con pGEX4T-3-tzcrk1 inducido con 0.2 mM de IPTG; calle 2, extracto de *E. coli* transformado con pGEX4T-3-tzcrk1 no inducido; calle 3, GST-TzCRK1 purificada.

5.2- Expresión de His-TzCRK3.

El gen entero para TzCRK3 también fue subclonado en el vector pGEX4T-3 en fusión con GST. Cultivos de *E. coli* transformados con esta construcción fueron inducidos con IPTG. A diferencia de GST-TzCRK1, GST-TzCRK3 indujo la formación de cuerpos de inclusión en las bacterias hospedadoras, y fue imposible su purificación con glutatión-agarosa. Los cuerpos de inclusión se purificaron y se utilizaron como antígenos para la elaboración de anticuerpos específicos contra TzCRK3. El antisuero obtenido reconoció muchas bandas sin especificidad en extractos de *T. cruzi*. Se decidió entonces intentar purificar la proteína de los cuerpos de inclusión para utilizarla como antígeno en la preparación de un nuevo anticuerpo. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con cloruro de guanidinio y luego se dializaron contra soluciones de concentraciones decrecientes del mismo, hasta remover todo el agente caotrópico del medio. Durante la diálisis se volvieron a formar los cuerpos de inclusión, observándose un precipitado en la bolsa de diálisis. Tanto la fracción soluble como el precipitado (cuerpos de inclusión), se resolvieron por SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie. La mayor parte de la proteína GST-TzCRK3 precipitó con los cuerpos de inclusión no permitiendo su purificación con la glutatión-agarosa. Como este abordaje no tuvo éxito, se decidió subclonar el

gen completo tzcrk3 en el vector pRSET-A en fusión con 6 histidinas. Como se explica en la sección Mat y Mét este vector permite la purificación de la proteína recombinante solubilizada en urea. La figura 20 muestra un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la proteína His-TzCRK3 purificada. La misma tiene un PM de 37 kDa. dado por la suma de TzCRK3 (35 kDa.), la cola de 6 histidinas y 28 aminoácidos traducidos de secuencias propias del vector que quedan fusionados con las histidinas y la proteína TzCRK3 (el número de aminoácidos puede variar según el sitio donde se clone el inserto). Esta proteína fue utilizada como antígeno para la elaboración de un antisuero específico y en ensayos de fosforilación.

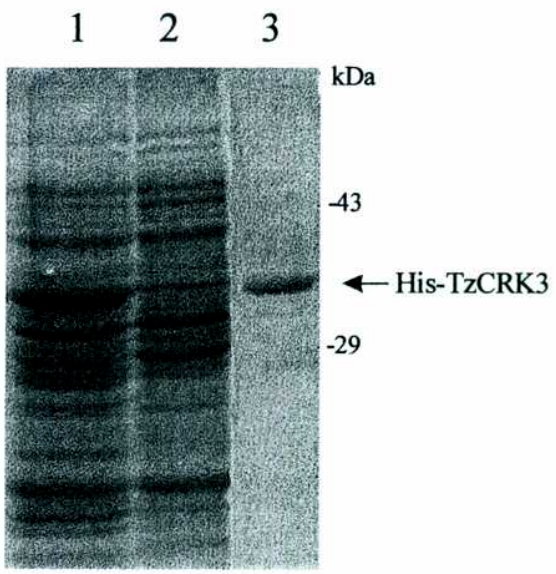


Figura 20. Purificación de His-TzCRK3.
SDS-PAGE 12% teñido con Azul de Coomassie. Calle 1, extracto de *E. coli* transformado con pRSET-tzcrk3 inducido con 0.2 mM de IPTG; calle 2, extracto de *E. coli* transformado con pRSET-tzcrk3 no inducido; calle 3, His-TzCRK3 purificada.

6 - WESTERN BLOT UTILIZANDO EL ANTISUERO ANTI-TZCRK1.

El antisuero TzCRK1 se obtuvo de conejos utilizando como antígeno la proteína recombinante GST-TzCRK1. En ensayos de Western blot se demostró que el antisuero es capaz de reconocer a GST y a la proteína recombinate GST-TzCRK1 (Fig. 21). Para descartar la posibilidad que el suero esté reconociendo solamente a la GST y que por eso revele la proteína recombinate, se hizo un WB contra una proteína, HA-TzCRK1, expresada en células COS-7, la cual no esta fusionada con GST. La HA-TzCRK1 es reconocida por el suero, indicando que existen anticuerpos específicos contra esta quinasa de *T. cruzi* (datos no mostrados). Este antisuero reconoce una proteína de 33 kDa en extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 21) siendo este es el tamaño esperado para la TzCRK1 según la longitud del gen que la codifica (906 pb).

Membranas de nitrocelulosa con extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* y la proteína recombinante GST-TzCRK1 también se incubaron con un anticuerpo anti el dominio PSTAIRE (Santa Cruz) (Fig. 21). Este antisuero policlonal fue obtenido usando como antígeno el péptido de 16 aminoácidos conocido como dominio PSTAIRE, el cual esta involucrado en la unión de las CDKs con ciclinas (Ver Introducción, Relación Estructura-Función). El anti-PSTAIRE es utilizado en muchos sistemas para reconocer proteínas que esten relacionadas con la familia de la CDC2 quinasa. Este anticuerpo reconoce 3 proteínas, de 32, 33 y 35 kDa, en extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi*. La proteína de 33 kDa podría ser la TzCRK1. El anticuerpo anti-PSTAIRE reconoce la proteína recombinante GST-TzCRK1 en la cual la Ser de la caja PSTAIRE esta reemplazada por una Cis.

Para estudiar la especificidad del antisuero TzCRK1 se usaron extractos proteicos de levaduras, utilizadas en los ensayos de complementación, transformadas con plásmidos que expresan los genes para las proteínas TzCRK1 y TzCRK3. La proteína TzCRK3 fue expresada como proteína recombinante con HA, migrando con un peso molecular de 37 kDa, y la TzCRK1 migra con un peso molecular de 33 kDa. La diferencia en el PM de estas proteínas permite una clara separación entre ambas al resolverlas en un SDS-PAGE 12%. Los ensayos de WB muestran que el suero TzCRK1 no reconoce a la proteína TzCRK3 ni a la CDC28 endógena, indicando que es específico (Fig. 30, ver Ensayos de complementación)

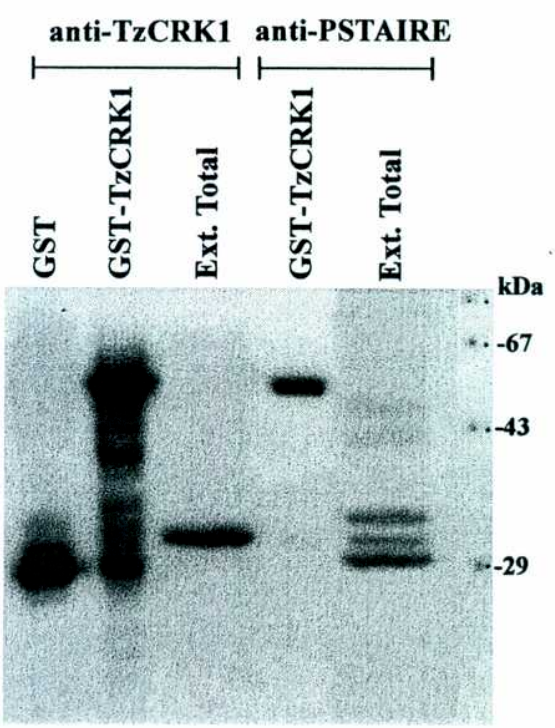


Figura 21. Western Blot utilizando el antisuero anti-TzCRK1.
Extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi*, la proteína recombinante GST- TzCRK1 y GST sola , fueron sometidos a SDS-PAGE y electrotransferidas a nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con los anticuerpos indicados.

7 - TzCRK1 esta Presente en los Tres Estadíos del Parásito.

Pellets celulares de distintos estadíos del parásito se lisaron para obtener las fracciones proteicas. Las mismas se cuantificaron y fueron sometidas a un SDS-PAGE con posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa. Estas se incubaron con el antisuero GST-TzCRK1 o con el anticuerpo anti-PSTAIRE (Santa Cruz). La figura 22 muestra los resultados de los Western blots. El antisuero anti GST-TzCRK1 revela una banda de la misma intensidad en los 3 estadíos del parásito, que corresponde a una proteína de 33 kDa (Fig. 22A). El anticuerpo anti-PSTAIRE reconoce en las 3 formas una misma banda de 33 kDa que, por su PM podría ser la TzCRK1. Este suero también detecta una proteína de 32 kDa y otra de 35 kDa, las cuales varían en concentración en las distintas formas (Fig. 22B). La proteína de 32 kDa esta altamente expresada en la forma epimastigote en comparación con la expresión en las otras dos formas y la proteína de 35 kDa se expresa más en epimastigotes que en tripomastigotes, no detectándose en la forma amastigote.

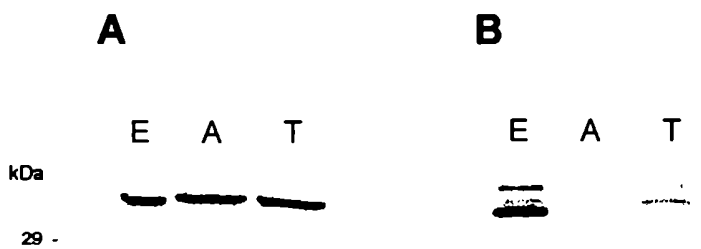
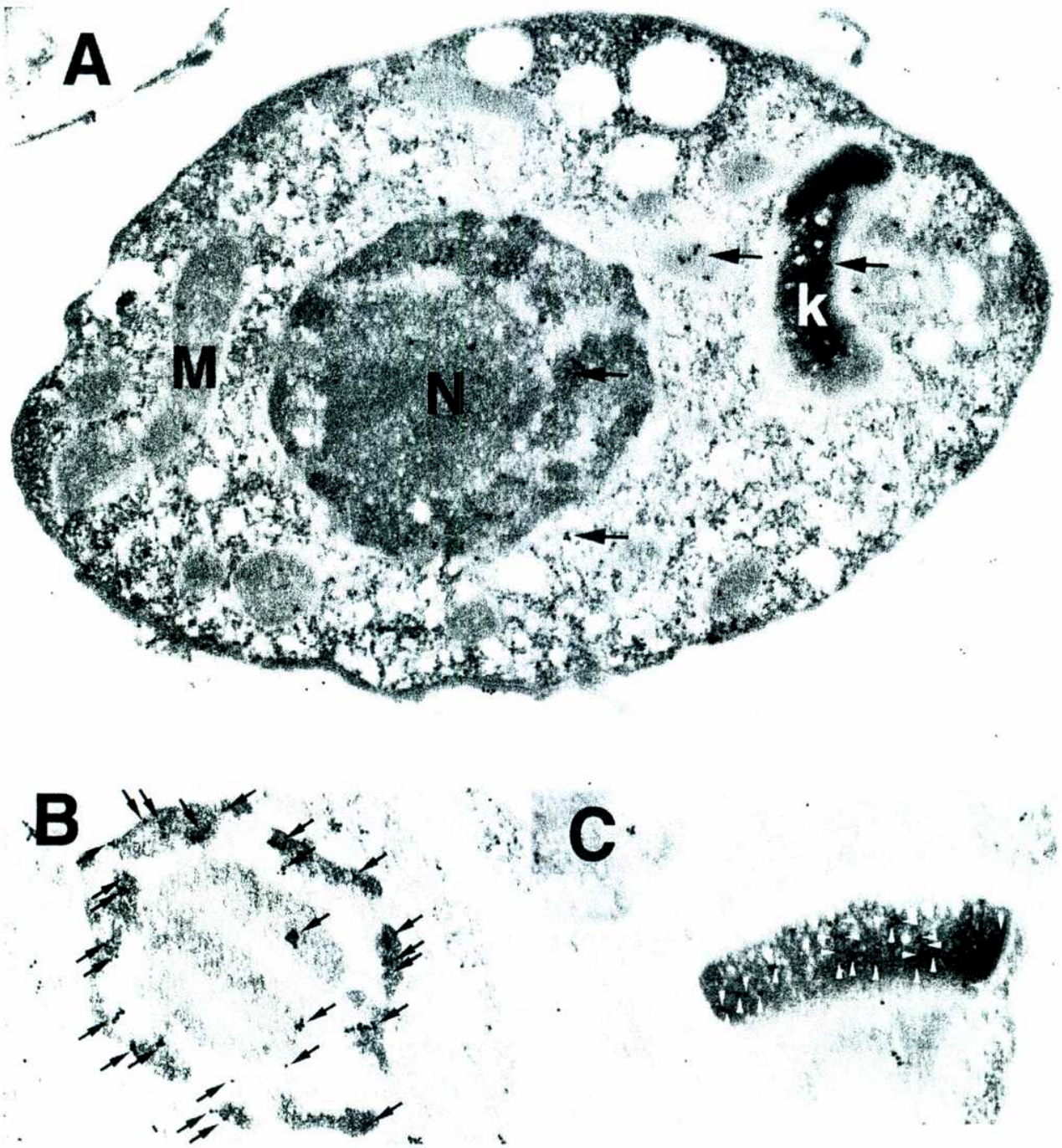


Figura 22. Ensayo de Western blot utilizando los anticuerpos anti-TZCRK1 y anti-PSTAIRE.
100 µg de extractos proteicos de epimastigotes (E), amastigotes (A) y tripomastigotes (T) fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE 12 % y transferidos a nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con antisuero GST-TzCRK1 (**A**) y anticuerpo anti-PSTAIRE (**B**).

8 - Localización Subcelular de la TzCRK1.

Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de la proteína TzCRK1, se utilizaron cultivos de amastigotes, los cuales se fijaron e incubaron con el anticuerpo anti-TzCRK1. Este se visualizó con un segundo anticuerpo acoplado a oro y posterior microscopía electrónica. Los resultados muestran que la proteína esta localizada en el citoplasma, regiones discretas del núcleo y en el kinetoplasto (Fig. 23).

Figura 23. Localización subcelular de TzCRK1.
Amastigotes de la cepa M/83 se fijaron e incubaron con IgGs purificadas del anticuerpo anti TzCRK1 y se reveló con un segundo anticuerpo acoplado a oro. (A) Célula de amastigote enterea (B) Núcleo, (C) Kinetoplasto. N, núcleo; K, kinetoplasto; M, mitocondria.



9 - Los Niveles de TzCRK1 No Varían a lo Largo del Ciclo Celular.

9.1- Estudio utilizando epimastigotes sincronizados.

Epimastigotes de *T. cruzi* se sincronizaron con hidroxiurea. La sincronización de los mismos se determinó por medición de la incorporación de timidina H^3 (figura 24). Se tomaron muestras a distintos tiempos luego de la remoción de la hidroxiurea. Los *pellets* de parásitos sé lisaron y fraccionaron. Los extractos proteicos de cada fracción se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con el antisuero TzCRK1. Los resultados indican que TzCRK1 se expresa en forma constitutiva y que sus niveles no varían a lo largo del ciclo celular (figura 25).

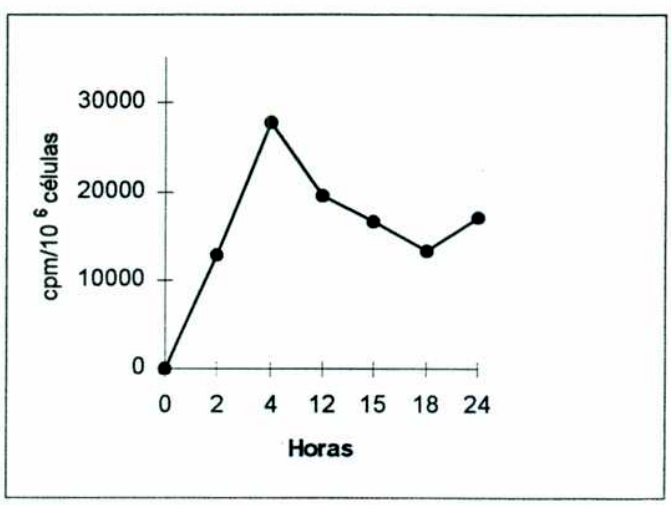


Figura 24. Sincronización de cultivos de epimastigotes.
La sincronización se determinó por medición de la incorporación de timidina H^3. Se tomaron muestras a los tiempos 0, 2, 4, 12, 15, 18 y 24 hs después de la remoción de la hidroxiurea, se contó el número de parásitos y se midió la incorporación de timidina H^3. Se grafican los cpm incorporados por millón de parásitos para cada hora en la cual se tomaron muestras.

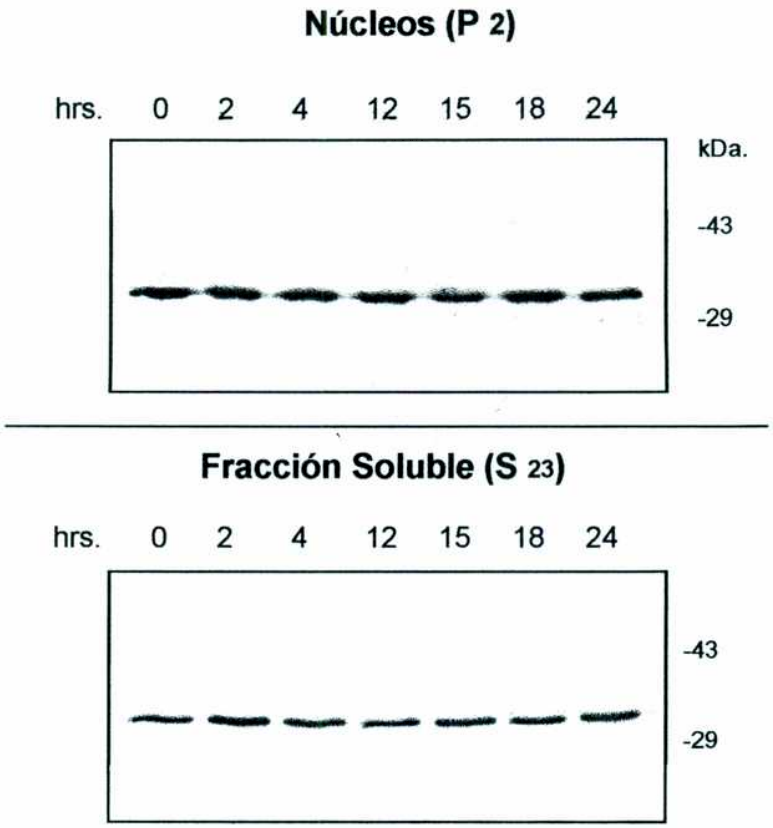


Figura 25. Western blot con anti TzCRK1 de muestras proteicas de los parásitos sincronizados por hidroxiurea.
Los epimastigotes sincronizados se lisaron y fraccionaron. 50 ug de la fracción soluble correspondiente al sobrenadante de una centrifucación a 23000 xg (S_{23}) y la nuclear, precipitado de una centrifugación a 2000 xg (P_2), se sembraron en un SDS-PAGE 12% y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con el suero anti-TzCRK1.

9.2- Estudio utilizando amastigotes sincronizados.

Con el objetivo de estudiar como varía la localización subcelular y los niveles de la proteína TzCRK1, se tomaron muestras a distintos tiempos de un cultivo sincronizado de amastigotes. Los mismos se fijaron, seccionaron e incubaron con el antisuero anti-TzCRK1. La proteína se visualizó con un segundo anticuerpo acoplado a oro y posterior microscopía electrónica. Los resultados indican que los niveles como la localización de la proteína no varían a lo largo del ciclo celular (datos no mostrados). Estos resultados se correlacionan con los observados en epimastigotes sincronizados con hidroxiurea. La figura 23 muestra una foto de la microscopía electrónica tomada de una de las muestras de amastigotes sincronizados.

10 - WESTERN BLOT CON EL ANTISUERO ANTI-TzCRK3: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.

El antisuero anti-TzCRK3 se obtuvo de conejos utilizando como antígeno la proteína recombinante His-TzCRK3. En ensayos de Western blot se demostró que el antisuero es capaz de reconocer a la proteína recombinate His-TzCRK1 (datos no mostrados). Este antisuero reconoce una proteína de 40 kDa en la fracción nuclear y en el *pellet* de una centrifugación a 100000 xg (P100) de epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 26). También reconoce una proteína de 54 kDa. en la fracción soluble. Por otro lado, la proteína recombinante His-TzCRK3 no es reconocida por el anticuerpo anti-PSTAIRE.

Por otro lado se ensayó la capacidad del suero anti-TzCRK3 de reconocer a la proteína HA-TzCRK3 expresada en levaduras (ver ensayos de complementación). Los resultados mostraron que este suero reconoce a dicha proteína y no reconoce a la TzCRK1 ni a la CDC28 endógena (Fig. 30, ver Ensayos de complementación).

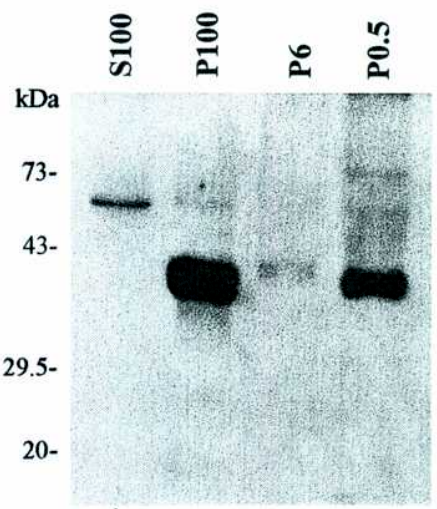


Figura 26. Localización subcelular de TzCRK3.
Distintas fracciones subcelulares de epimatigotes de *T. cruzi* fueron sometidas a SDS-PAGE y electrotransferidas a nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con el antisuero anti-TzCRK3. P100, precipitado de centrifugación a 100000 xg; S100, sobrenadante de centrifugación a 100000 xg, P6, precipitado de centrifugación a 6000 xg; P0.5, precipitado de centrifugación a 500 xg.

11 - ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST-TzCRK1 E HIS-TzCRK3 DE FOSFORILAR SUSTRATOS EXÓGENOS.

La actividad de quinasa se puede determinar *in vitro* por la capacidad de fosforilar un sustrato exógeno dado. El sustrato más utilizado para medir actividad en la familia de quinasas de la CDC2 es la histona H1. Otro sustrato muy usado es la proteína retinoblastoma (Rb), que es fosforilada *in vivo* por la CDK4/6, quinasa involucrada en la etapa G_1 del ciclo celular. La medición de la actividad de las proteínas recombinantes se realizó con distintas concentraciones de las mismas y empleando como sustratos exógenos histona H1 o la proteína Rb. GST-TzCRK1

fosforila histona H1 (Fig. 27C) y la proteína retinoblastoma (Fig. 27B). Bajo estas condiciones, también se autofosforila (Fig. 27A). Tanto la fosforilación de los sustratos exógenos como la autofosforilación son dependientes de la concentración de enzima. En ensayos de control de fosforilación se determinó que la proteína GST no es fosforilada por la quinasa y que GST-Rb no se fosforila en ausencia de enzima.

La proteína His-TzCRK3 no fosforilar la proteína Rb o la histona H1. La actividad de esta quinasa se ensayó utilizando varios sustratos (ver Mat y Mét) con resultados negativos.

La regulación de la actividad de las quinasas de la familia CDK es muy compleja (ver Introducción). Estas, para ser activas, necesitan asociarse con proteínas ciclinas y ser fosforiladas en residuos específicos. Existen muy pocas CRKs descriptas hasta el momento capaces de tener actividad *in vitro* sin el agregado de proteínas moduladoras. Estos resultados indican que la proteína recombinante GST-TzCRK1 tiene actividad quinasa sin la presencia de proteínas moduladora y que His-TzCRK3, bajo estas condiciones, no es capaz de fosforilar los sustratos ensayados.

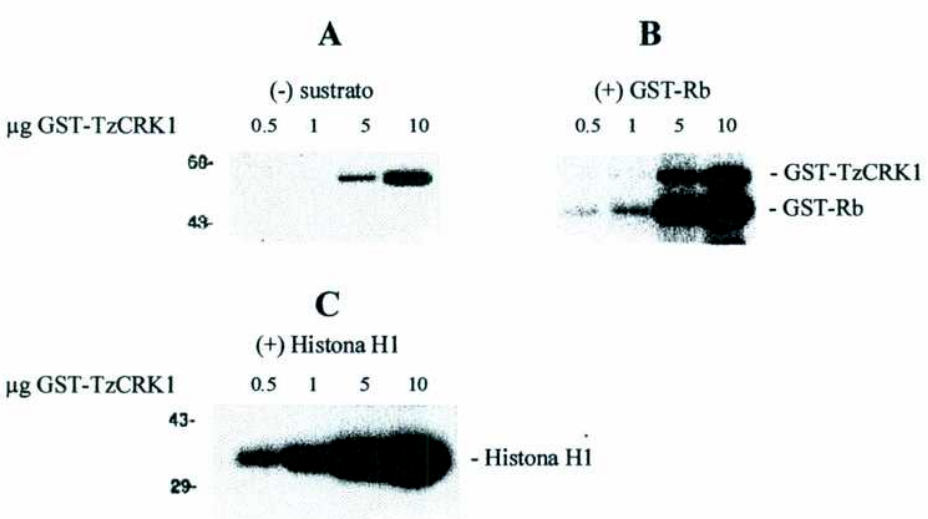


Figura 27. Actividad de GST-TzCRK1.
La proteína de fusión GST-TzCRK1 se purificó de lisados bacterianos. Diferentes concentraciones de la misma se emplearon en ensayos de quinasa. (A) sin sustrato, (B) con 0.025 mg/ml de GST-Rb y (C) con 0.2 mg/ml de histona H1.

12 - ACTIVIDAD QUINASA DE LA TzCRK1 ENDÓGENA.

Para poder determinar si la TzCRK1 endógena era capaz de fosforilar *in vitro* los sustratos histona H1 y la proteína Rb, extractos solubles (S100) se incubaron con IgGs purificadas del antisuero anti-TzCRK1 y de suero normal de conejo (SNC) y se precipitaron con proteína A-agarosa. Los *pellets* obtenidos se emplearon en ensayos de actividad quinasa utilizando histona H1 o Rb como sustratos exógenos. Las reacciones se resolvieron en SDS-PAGE, se tiñeron con Coomassie blue, y se expusieron a placas autoradiográficas. La figura 28 muestra que el anticuerpo anti TzCRK1 es capaz de precipitar una/s proteína/s quinasa/s que pueden fosforilar ambos tipos de sustratos.

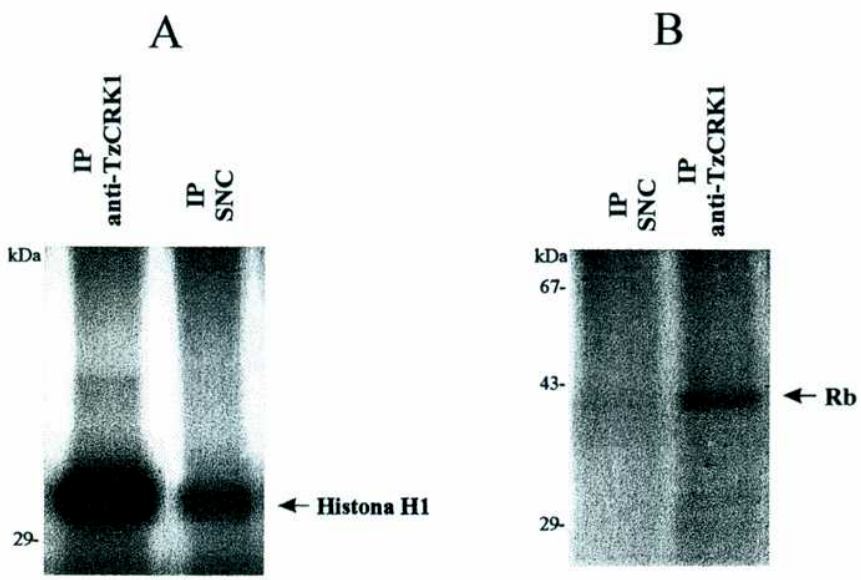


Figura 28. Actividad de la TzCRK1 endógena.
100 µg de la fracción soluble (S100) de epimastigotes de *T. cruzi* se incubaron con IgGs del suero TzCRK1 o SNC. Los inmunocomplejos se precipitaron con proteína A agarosa y se les determinó la capacidad de fosforilar histona H1 (A) o Rb (B). Las reacciones se resolvieron por SDS-PAGE 12% y los geles se expusieron a películas autoradiográficas.

13 - ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE P13SUC1 DE UNIR QUINASAS DE *T. cruzi*.

La quinasa CDC2 de *S. pombe* se une, durante ciertas etapas del ciclo celular con una proteína denominada p13SUC1, cuya función no está claramente determinada (ver Introducción). Tanto en células de mamíferos como en *S. cerevisiae* y Leishmania, entre otros, se han podido identificar proteínas homólogas. p13SUC1 se asocia *in vitro* muy fuertemente con la CDC2, por

lo cual se la ha empleado, unida a matrices de agarosa, para poder identificar en distintos organismos, proteínas del tipo CDC2. Para poder determinar si la proteína p13SUC1 era capaz de asociarse con alguna quinasa de *T. cruzi*, fracciones solubles (S100) de la forma epimastigote se incubaron con la proteína p13SUC1 unida a agarosa y se precipitaron por centrifugación. Los *pellets* obtenidos se emplearon en ensayos de quinasa utilizando histona H1 como sustrato exógeno. Las reacciones se resolvieron en SDS-PAGE, se tiñeron con Coomassie blue, y se expusieron a placas autoradiográficas. La figura 29 muestra que la proteína p13SUC1 es capaz de unirse a una/s quinasa/s que pueden fosforilar histona H1.

Para poder determinar si p13SUC1 puede asociarse y precipitar a TzCRK1, los precipitados con p13SUC1-agarosa se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y las membranas se incubaron con el anticuerpo anti TzCRK1. Este antisuero no reconoció ninguna proteína que co-precipite con p13SUC1 (datos no mostrados). Estos resultados indicarían que p13SUC1 no es capaz de unirse con TzCRK1, pero no se puede descartar la posibilidad que la cantidad de proteína TzCRK1 asociada con p13SUC1 sea muy baja y por ende, en estas condiciones, no sea detectada por el antisuero.

Figura. 29. Actividad quinasa que se asocia con la proteína p13SUC1 de *T.cruzi*.
100 µg de la fracción soluble (S100) de epimastigotes de *T. cruzi* se incubaron con la proteína p13SUC1-agarosa (p13-agarosa) o con protA-agarosa .Los complejos se precipitaron y se les determinó la capacidad de fosforilar histona H1. Las reacciones se resolvieron por SDS-PAGE 12% y los geles se expusieron a películas autoradiográficas.

14 - ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN.

La proteína CDC2 humana fue clonada por complementación en levaduras mutantes para el gen cdc2 de *S. pombe*. Estos resultados mostraron que en humanos existe un gen homólogo funcional al de levaduras y que es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución.

Se decidió estudiar si TzCRK1 y/o TzCRK3 son capaces de complementar la función de la proteína CDC28 de *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe recordar que el gen cdc2 de *Saccharomyces cerevisiae* se lo denomina cdc28 (ver Introducción) y que ambas cepas de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* como *Schisosaccharomyces pombe* son utilizadas para realizar estos ensayos.

El gen tzcrk3 se subclonó en el vector de expresión en levaduras YCpIF16 (trp+) en fusión con con 9 aminoácidos de la proteína hemaglutinina (HA) y el gen tzcrk1 se subclonó en el vector pYes2 (trp+). Estos vectores están diseñados de manera tal que la expresión de los genes clonados estan bajo el control del promotor GAL1, inducible por galactosa. Estas construcciones se emplearon para transformar, en eventos independientes, levaduras mutantes termosensibles para la proteína CDC28. La selección de las transformantes se hizo a 23°C en medios selectivos y luego se determinó la complementación de la mutación incubando las placas a 37°C. Ninguna levadura mutante creció a esta temperatura. La levadura salvaje transformada con ambos vectores vacíos se estrió en todas las placas como control positivo de crecimiento. Por ensayos de Western blot utilizando el antisuero TzCRK1 y el anti-HA, se determinó que ambas quinasas se expresan cuando son inducidas con galactosa (datos no mostrados). Los resultados de estos experimentos muestran que, bajo estas condiciones, ninguna de estas proteínas es capaz de complementar la mutación. Estos resultados no descartan la posibilidad de que alguna de estas quinasas sea la homóloga funcional de CDC2; podría ser que las TzCRKs no puedan fosforilar todos los sustratos de la CDC28 o que no puedan asociarse con las ciclinas de levaduras. Se decidió entonces co-transformar esta cepa con ambas CRKs a la vez y ver si juntas podrían revertir la mutación. El gen tzcrk1 se suclonó en el vector YCpIF2 (leu+) y se lo co-transformó con el vector YCpIF16-tzcrk3 (trp+) en la levadura mutante. La selección se hizo a 23°C en placas trp-/leu- y se determinó la complementación a 37°C. Al igual que en los experimentos anteriores, en todas las placas se estrió la cepa salvaje transformada con los vectores vacíos. La levadura mutante co-transformada con ambos genes no es capaz de crecer a la temperatura restrictiva. Por Western blot se determinó que ambas proteínas se expresan cuando son inducidas con galactosa (Fig. 30). Estos resultados indican que estas quinasas de *T. cruzi* no son capaces, en estas condiciones, de complementar la actividad de la quinasa CDC28.

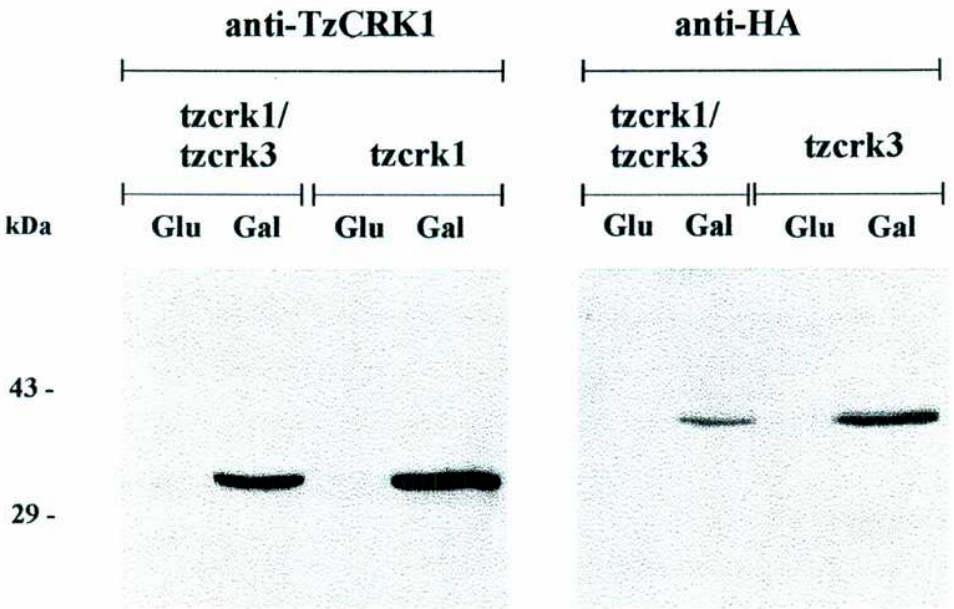


Figura 30. Verificación, por WB, de la expresión de los genes tzcrk1 y 3 en *S. cerevisiae* 28-4. Extractos proteicos de levaduras transformadas con los vectores YCpIF2-tzcrk1 + YCpIF16-tzcrk3 (calle tzcrk1/tzcrk3), YCpIF16-tzcrk1 (calle tzcrk1) o YCpIF2-tzcrk3 (calle tzcrk3) fueron resueltos por SDS-PAGE, electrotransferidos a nitrocelulosa y las membranas fueron incubados con los anticuerpos indicados.

15 - Ensayos De Inhibición De La Actividad De TzCRK1.

Durante los últimos años se han realizado experimentos buscando inhibidores específicos que actúen sobre la actividad de las CDKs. Principalmente se describieron compuestos que actúan a nivel de la unión del ATP en el dominio catalítico. La tabla 4 muestra algunos inhibidores y sus IC50 para distintas quinasas (Meijer, 1996). El inhibidor staurosporina es muy poco selectivo, en cambio los inhibidores flavopiridol, olomucina y roscovitina muestran especificidad por las quinasas del tipo CDK1 (CDC2) y CDK2.

Se decidió estudiar si los compuestos roscovitina, flavopiridol u olomucina eran capaces de inhibir la actividad de la proteína recombinante GST-TzCRK1 y/o la TzCRK1 endógena. Se realizaron ensayos de actividad quinasa en presencia de distintas concentraciones de los inhibidores. Para flavopiridol se utilizaron concentraciones hasta 500 µM, para olomucina, hasta 1 mM y para roscovitina hasta 100 µM. Bajo estas condiciones, ninguno de los compuestos ensayados inhibió la actividad de las quinasas (datos no mostrados) sugiriendo que la estructura terciaria de la TzCRK1 es diferente a la de las CDK1 y 2. Según los datos presentados en la tabla 4, la TzCRK1 tendría un comportamiento, ante los inhibidores ensayados, similar al de la proteína CDK4.

Quinasa	Staurosporina	flavopiridol	olomucina	roscovitina
CDK1	0.003-0.009	0.4	7	0.65
CDK2	0.007	0.4	7	0.7
CDK4	< 10000	sin efecto	>1000	>100
MAPK	0.02	ND	30	30
PKA	0.008	145	>2000	>1000
PKC	0.005	ND	>1000	>100

Tabla 4: Especificidad de distintos inhibidores químicos sobre diferentes quinasas.
Los valores indicados corresponden a los IC50 (μM) obtenidos midiendo la actividad de quinasas purificadas (Datos extraídos de Meijer, 1996).

16 - Estudio de TzCRK1 Expresada en Células de Mamíferos.

Los genes tzcrk1 y tzcrk3 se subclonaron en el plásmido pCEFL-HA que permite la expresión, en células eucariotas, de proteínas fusionadas en su extremo amino con HA. Células COS-7 subconfluentes se transfectaron independientemente con los plásmidos pCEFL-HA/tzcrk1, pCEFL-HA/tzcrk3 y pCEFL-HA.

16.1 - Verificación por Western blot de la expresión de las proteínas TzCRK1 y HA-TzCRK3.

Las células transfectadas se lisaron y su concentración proteica se cuantificó por la técnica de Bradford. La expresión de las proteínas recombinantes HA-TzCRK1 y HA-TzCRK3 se determinó por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA. Este reveló una banda del peso molecular esperado en los lisados correspondientes a la transfección con tzcrk1 (Fig. 31). La proteína HA-TzCRK3 no se expresó por lo cual se decidió usar estas transfecciones como controles negativos en los ensayos de quinasa.

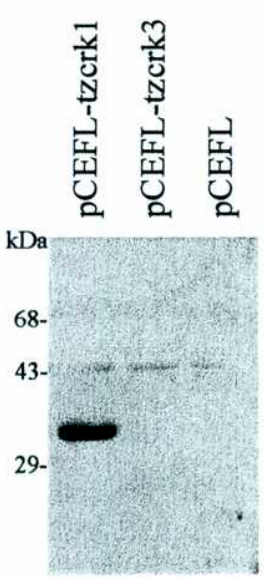


Figura 31. Expresión de TzCRK1 en células COS-7.
Extractos proteicos de células COS-7 transfectadas con pCEFL-tzcrk1 (calle 1), pCEFL-tzcrk3 (calle 2) y pCEFL (calle 3), se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se hibridaron con el anticuerpo anti-HA.

Sobrenadantes proteicos de las transfecciones con pCEFL-HA/tzcrk1 y pCEFL-HA/tzcrk3 (control negativo) se incubaron con el anticuerpo anti-HA con el fin de inmunoprecipitar la TzCRK1 y determinar su actividad de quinasa. Los complejos inmunes se precipitaron con proteína G-agarosa. Los *pellets* se incubaron con buffer de reacción conteniendo histona H1 y distintas concentraciones de ATP no radioactivo. La figura 32 revela que la TzCRK1 expresada en células COS-7 presenta actividad de quinasa que varía con la concentración de ATP utilizado. Los inmunoprecipitados correspondientes a la transfección con tzcrk3 (Control) no fueron capaces de fosforilar la histona H1 con ninguna de las concentraciones de ATP ensayados

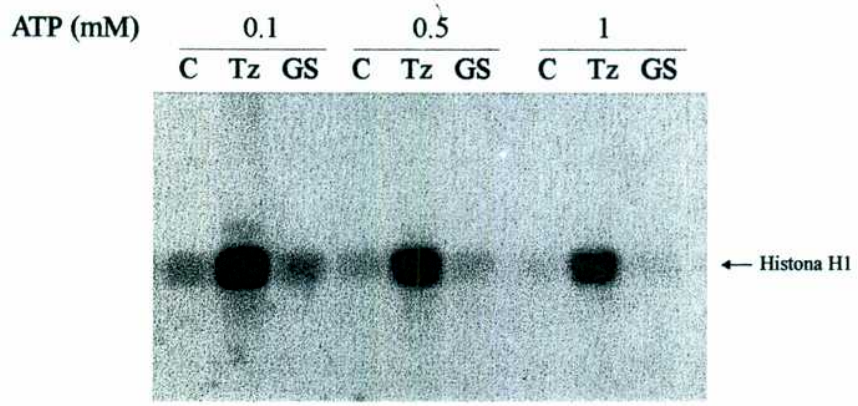


Figura 32. Actividad de TzCRK1 transfectada en células COS-7.
Los extractos proteicos de células COS-7 transfectadas con distintos plásmidos, se incubaron con anti-HA (C y Tz) o solamente con proteína G-agarosa (GS). Los inmunoprecipitados se ensayaron para determinar actividad de quinasa usando como sustrato histona H1 y distintas concentraciones de ATP. Las muestras se separaron por SDS-PAGE 12 % y el gel se expuso a placas autoradiográficas. C, control; Tz, transfecciones con pCEFL-tzcrk1.

16.3 - TzCRK1 es capaz de asociarse con las ciclinas E, D3 y A de células COS-7.

Para estudiar si TzCRK1 era capaz de interactuar con ciclinas de mamíferos, lisados de células COS-7 transfectadas con pCEFL-HA/tzcrk1 o pCEFL-HA/tzcrk3 (plásmido control) se incubaron con distintos anticuerpos anti-ciclinas (Fig. 33). Como controles negativos se usaron suero normal de conejo (SNC) o un anticuerpo monoclonal inespecífico. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE 12% y transfirieron a membranas de nitrocelulosa las cuales se incubaron con anticuerpos anti-HA. La figura 33 muestra que TzCRK1 es capaz de asociarse con las ciclinas E, A y D3. Estos resultados demuestran que TzCRK1 posee un dominio funcional capaz de interactuar con diferentes ciclinas de células de mamíferos.

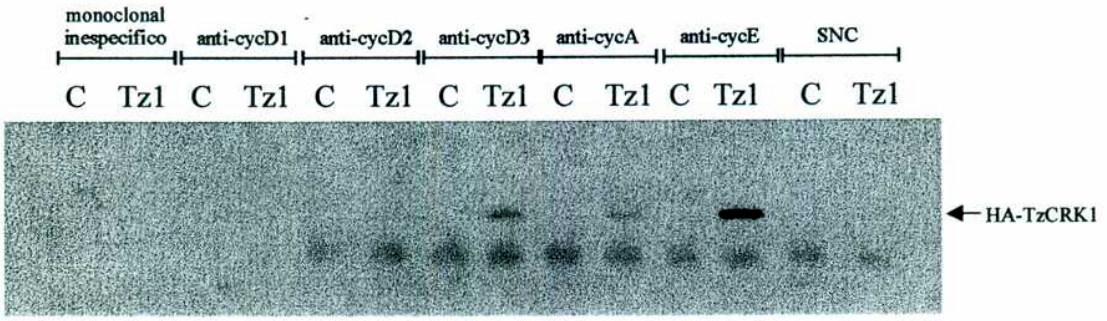


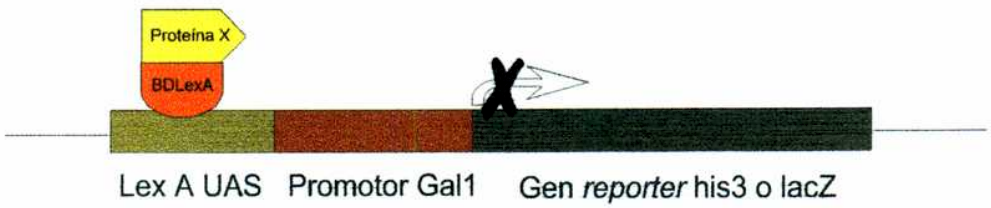
Figura 33. TzCRK1 se une a diferentes ciclinas de mamíferos.
Células COS-7 transfectadas con distintos plásmidos, se lisaron e incubaron con anticuerpos anti-ciclinas, un anticuerpo monoclonal inespecífico o suero normal de conejo (SNC). Los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE 12%, el cual se transfirió a nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anti-HA.

17 - Clonado De Tres Ciclinas, TcCYC2, TcCYC4 y TcCYC5, Capaces de Asociarse con TzCRK1.

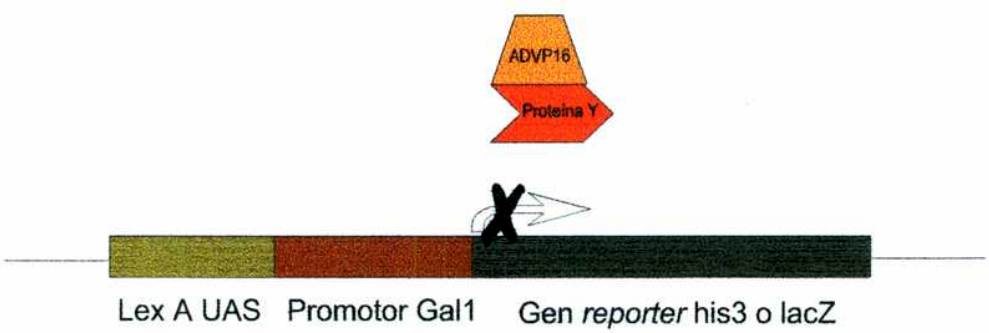
17.1- Sistema del Doble Híbrido - Concepto teórico.

Esta técnica, desarrollada por Stanley Fields y colaboradores (Fields, S. y Song, 1989), permite detectar *in vivo* interacciones entre proteínas. Este ensayo se basa en la existencia, en eucariotas, de factores de la transcripción formados por dos dominios, uno de unión a ADN y otro de activación de la transcripción. Se determinó que al separar estos dominios, los mismos son capaces de reasociarse recobrando su función. Teniendo en cuenta este hecho, se crearon sistemas en los cuales se clonaron los dos dominios, el de unión a ADN y el de activación, en vectores de expresión diferentes. A estos 2 vectores se les pueden subclonar, en fusión con los respectivos dominios, genes de interés para determinar si los mismos interaccionan. Estas construcciones se transforman en levaduras genéticamente modificadas para poder seleccionar aquellos genes cuyas proteínas son capaces de asociarse (Fig. 34)

A La proteína híbrida entre el dominio de unión a ADN de Lex A y TzCRK1, BDLexA-TzCRK1, es capaz de unirse a las UAS (*upstream activating sequences*) de Lex A, pero no puede activar la transcripción sin el dominio de activación.



B Las proteínas híbridas entre el dominio de activación y proteínas de *T. cruzi*, no pueden unirse a UAS no pudiendo activar la transcripción de los genes reporter.



C La interacción entre los polipéptidos X e Y de las proteínas híbridas reconstituye la función de LexA, activando la transcripción de los genes lacZ e his3.

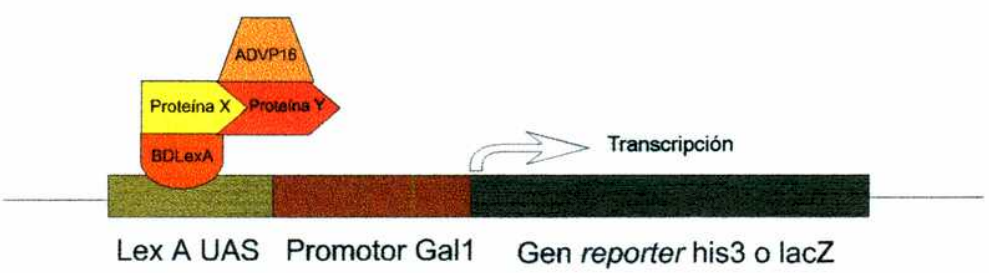


Figura 34. Esquema mostrando las bases del sistema de doble híbrido utilizado en este trabajo.

17.2- Sistema del Doble Híbrido para el gen tzcrk1.

El gen tzcrk1 se subclonó en el vector de expresión en levaduras pBTM116 (trp+) (Fig. 35A) en fusión con el dominio de unión a ADN de lexA. Esta construcción se empleó para transformar levaduras de la cepa L40, la cual fue modificada de manera tal que la expresión de los genes his3 y lacZ están bajo el control del promotor mínimo de Gal1 y secuencias de unión para LexA (UAS= *upstream activation sequences*). La expresión de la proteína BDLexA-TzCRK1 se comprobó por Western blot utilizando el suero TzCRK1. La figura 36 muestra que las L40 transformadas expresan una proteína del tamaño esperado. Las levaduras L40/pBTM116-tzcrk1 se retransformaron con una biblioteca de ADNc construida en el vector pVP16 a partir de ARN de epimastigotes de *T.cruzi* (Fig. 35B). Este vector permite la expresión de proteínas en fusión con el dominio de activación de la transcripción del factor VP16.

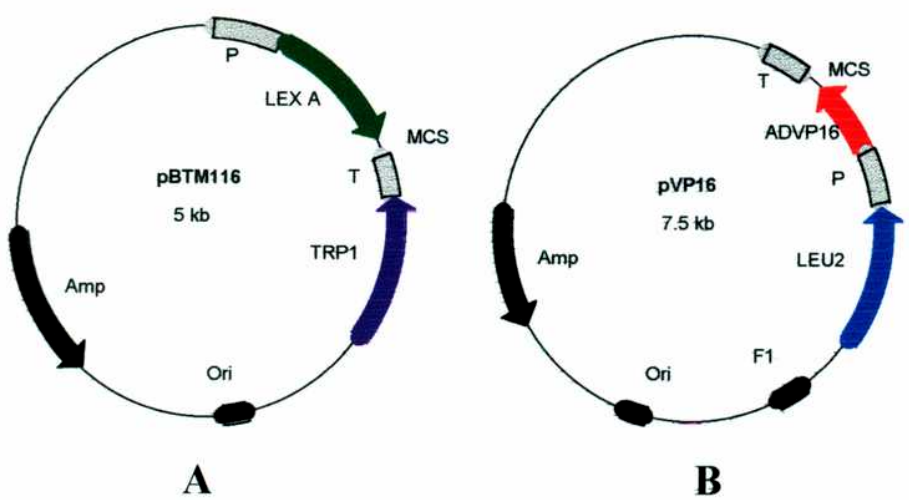


Figura 35. Esquemas de los vectores utilizados para los experimentos del doble híbrido.
(A) pBTM116. (B) pVP16. P, promotor, T, secuencias de terminación.

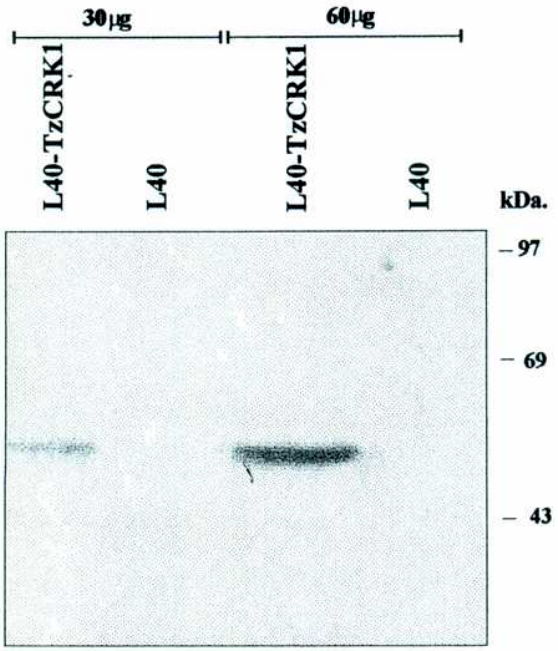


Figura 36. Determinación por Western blot de la expresión de TzCRK1 en levaduras L40 transformadas con pBTM116-tzcrk1.
Distintas concentraciones proteicas de lisados de levaduras de la cepa L40 transformada con el plásmido pBTM116-tzcrk1, se resolvieron por SDS-PAGE 12% y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con el suero anti-TzCRK1.

Los tranformantes fueron seleccionados en medios sin trp, his, ura, leu y lis. Luego de 48 hrs. se repicaron 95 colonias protrótrofas para histidina a lo largo de tres días: día 1, 35 colonias, día 2, 31 colonias y día 3, 29 colonias (tabla 5) y luego se les determinó la actividad de β-galactosidasa; de las 95 colonias histidina positivas, 74 fueron también β-gal positivas, 26 colonias del día 1, 28 del día 2 y 19 del día 3 (tabla 5). Todos los vectores pVP16-cDNA *T.cruzi* de levaduras his+ y β-gal + (74 clones) se pasaron a bacterias *E. coli*, cepa HB101, y se hicieron minipreparaciones para obtener cantidades suficientes de los mismos. Según sitios de corte para enzimas de restricción, se los re-agrupó en 22 grupos (tabla 6). Siete de los 74 clones no tenían inserto por lo cual se descartaron. Como último paso para descartar falsos positivos se hizo el control de interacción específica. Este ensayo consiste en determinar si las proteínas expresadas por estos clones son capaces de asociarse a cualquier proteína y activar el sistema. Un clon de cada grupo con inserto, se usó para transformar levaduras de la cepa L40 portadoras del vector pBTM116 al que se le subclonó el gen para la lamina. Este gen fue utilizado por muchos grupos para este tipo de ensayos (Vojtek, A. y col. 1993). De los 21 representantes, solo uno fue descartado ya que permitió el crecimiento en placas his$^-$ y fue β-gal positivo. Los otros 20 se secuenciaron y compararon con diversos bancos de datos utilizando el programa BLAST. Todos

estos resultados, llevaron a re-distribuir los grupos en 6 supergrupos, I – VI (tabla 6). El supergrupo I muestra aquellos grupos con clones cuyas secuencias codifican para polipéptidos lo suficientemente largos como para permitir asociación específica con TzCRK1, y cuyas secuencias nucleotídicas no presentan identidad con secuencias de ARN ribosomal. En este supergrupo, hay 49 clones, los cuales representan el 66 % de los clones provenientes de colonias his+/β-gal+ (tablas 5 y 6). De estos 49 clones, 24 (49%) provienen de las colonias levantadas el día 1, 15 clones (31%), de colonias levantadas el día 2 y 10 clones (20%) de colonias levantadas el día 3 (Fig. 37). Esto significa que de los 27 clones del día 1 cuyas colonias fueron his+/β-gal+, 24 (89%) pertenecen al supergrupo I y solo 15 de 28 (53.5%) del día 2 y 10 de 19 (53%) del día 3 (tabla 7).

	Histidina +	*B-gal* +
Día 1	35	27
Día 2	31	28
Día 3	29	19
Total	95	**74**

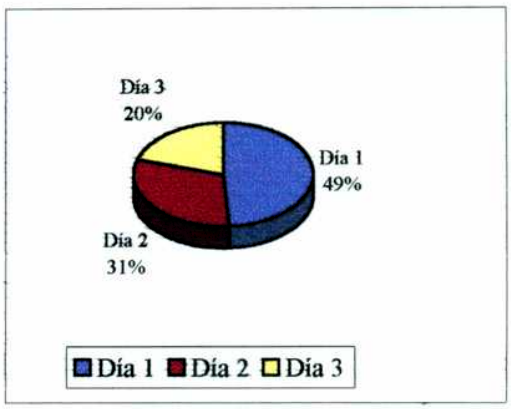
Tabla 5. Número de colonias de levaduras histidina y β-gal positivas.
Los números indican la cantidad de colonias de levaduras levantadas, en los días indicados, capaces de crecer en medios sin histidina y β-gal positivas. El número total de levaduras his+/β-gal + se muestra en negritas.

Los clones de los supergrupos II a VI son falsos positivos obtenidos en este experimento. El total de clones, 25, representa el 34% de los clones provenientes de colonias his+/βgal+. El supergrupo II está formado por aquellos grupos con clones cuyas secuencias codifican para polipéptidos muy pequeños, menores a 5 aminoácidos. Estos clones se descartaron como posibles secuencias codificantes de proteínas que se asocien con TzCRK1, ya que codifican muy pocos aminoácidos (tabla 6-supergrupo II). El supergrupo III, está formado por clones cuyas secuencias corresponden a ARN ribosomal. En este supergrupo existen 13 clones que representan el 17.5% del total de clones provenientes de colonias his+/β-gal+ (tabla 6-supergrupo III). El supergrupo IV tiene 1 clon cuyo inserto esta ligado de manera tal que la proteína VP16 está fusionada a una cola de poliT (tabla 6-supergrupo IV). Los 7 clones sin inserto forman el grupo 20, que es el supergrupo V, y el clon que fue descartado en el ensayo de interacción específica forma el grupo 16, supergrupo VI (tabla 6).

Super grupo	grupo	# de clones	Tamaño aprox. del inserto.	pb hasta codón STOP.	Observaciones.
I	1	10	800 pb	246	
	2	15	667 pb	NT	Clon TcCYC5
	3	2	637 pb	NT	Clon TcCYC4
	4	10	1300 pb	NDA	Clon TcCYC4
	7	5	1100 pb	189	
	11	1	620 pb	459	Clon TcCYC2.
	13	4	700 pb	148	
	17	2	1600 pb	NDA	
	Total	**49**			
II	5	1		6	Traducción de un polipéptido muy pequeño.
	6	1		9	"
	10	1		12	"
	Total	**3**			
III	8	1		45	Gen ribosomal de *T. cruzi*.
	9	4		222	"
	12	1		18	"
	14	1		138	"
	15	1		54	"
	18	1		49	"
	21	1		141	"
	22	3		3	"
	Total	13			
IV	19	1			Fusión con cola de poliT.
	Total	**1**			
V	20	7			Sin inserto
	Total	**7**			
VI	16	1			His+, β-gal + con LexA-lamina.
	Total	**1**			
	Total	**74**			

Tabla 6. Resultados obtenidos con el sistema de doble híbrido para la proteína TzCRK1.
NDA, no determinado aún; NT, no tiene.

Figura 37. Esquema mostrando resultados del supergrupo I.
Se muestra, en %, la composición del supergrupo I de acuerdo a los días en que se levantron las colonias que resultaron his+/βgal+.



	His+/βgal	Supgrupo I	%
Día 1	27	24	89
Día 2	28	15	53.5
Día 3	19	10	53

Tabla 7. Composición del supergrupo I.
Colonias levantadas en los diferentes días que pertenecen al supergurpo I.

17.2.1- Análisis de clones del supergrupo I: identificación de los genes tccyc2, tccyc4 y tccyc5.

Al comparar las secuencias de los clones del supergrupo I con el programa BLAST (Altshchul, S. y col. 1997), se pudieron identificar 3 secuencias que presentaron identidad con una familia de proteínas denominada PREG, descriptas en *Neurospora crassa*, *Picea mariana* y *Arabidopsis thaliana*, la proteína PHO80 de *S. cerevisiae* y la ciclina CYC2 de *T. brucei*. Los valores esperados (valor E) fueron menores a $1e^{-4}$. El valor E es un parámetro que describe el número esperado de secuencias coincidentes que se obtendrían por azar al comparar la secuencia de interés con una base de datos de un tamaño determinado. Este valor es usado para determinar lo significativo de las regiones coincidentes. Cuanto menor el valor E, mayor sería la homología entre las secuencias coincidentes obtenidas. Este valor E depende de un puntaje que se obtiene para cada alineación realizada (Altshchul, S. y col. 1997). Por ejemplo si se obtuviese un valor E=1 para una secuencia con un puntaje X, significa que, para una base de datos de un tamaño

determinado, se espera obtener 1 secuencia con el mismo puntaje, simplemente por azar (Altshchul, S. y col. 1997).

La proteína PREG, en *N. crassa* participa en la inhibición de la transcripción de genes cuyas proteínas están involucradas en el metabolismo del fosfato. Esta proteína tiene identidad con PHO80, la cual, asociada con una quinasa tipo CDK, denominada PHO85, regula la transcripción de la fosfatasa ácida. A las proteínas de la familia PREG no se les ha encontrado aún quinasas a las que se asocien y regulen, pero sus secuencias tienen un dominio con homología a ciclinas. PHO80 ha sido muy bien caracterizada en *S. cerevisiae* y se han identificado varias ciclinas con homología a PHO80, capaces de regular la actividad de la quinasa PHO85, conformando así la subfamilia de ciclinas PHO80 (Ver Introducción, PHO85-Ciclinas). Por otro lado, el gen tbcyc2 fue clonado por la capacidad de la proteína que codifica de complementar la función de ciclinas de G1, de levaduras mutantes para las mismas.

Los clones que tienen similitud con alguna de estas proteínas pertenecen a los grupos 11, 2, 3 y 4.

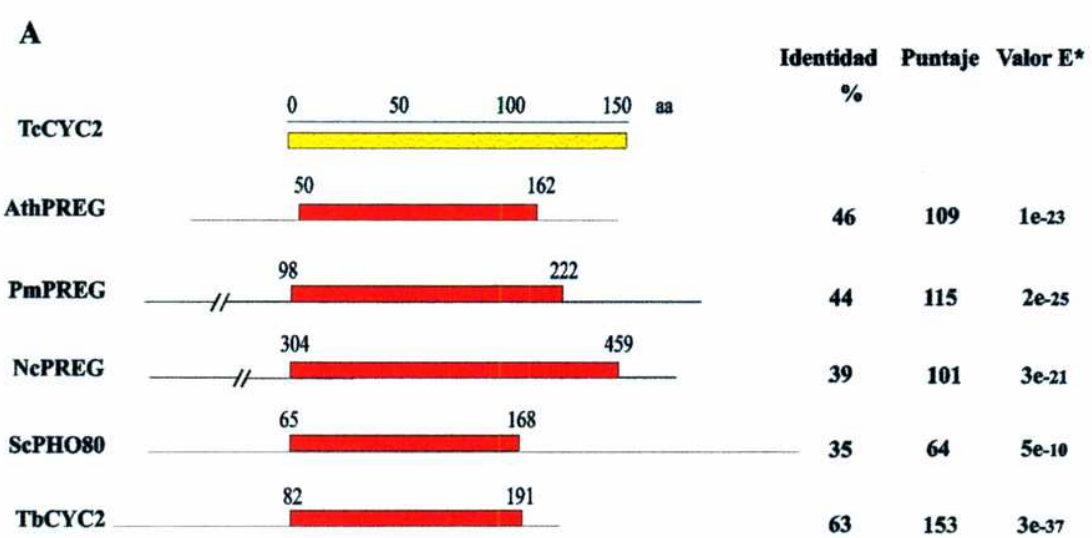
El inserto del clon del grupo 11 se secuenció en su totalidad; su tamaño es de 620 pb y presenta un codón de terminación en la posición 459 (tabla 6). La secuencia aminoacídica deducida tiene 63 % de identidad con TbCYC2 y un valor E de $3e^{-37}$, entre 39-46 % de identidad con proteínas de la familia PREG y valores de E entre $3e^{-10}$ y $1e^{-25}$ y 35% de identidad con PHO80 con un valor de $E=5e^{-10}$. Las comparaciones se restringen solo a una región de las proteínas que corresponde al dominio de homología con ciclinas (Fig. 38A). Por su alta identidad con TbCYC2 se decidió denominar a esta proteína TcCYC2. Como se observa en el esquema de la figura 38 A, la secuencia de este clon corresponde al extremo 3' del gen y comparando con TbCYC2, su extremo carboxi-terminal es 39 aminoácido más extensa.

Las secuencias nucleotídicas de los clones de los grupos 3 (2 clones) y 4 (10 clones) codifican para la misma proteína. Los clones del grupo 3 tienen un inserto, secuenciado en su totalidad, de 667 pb que no presenta codón de terminación. El inserto del grupo 4 tiene un tamaño aproximado de 1300 pb y aún no se ha terminado de secuenciar. Los primeros 350 nt (región secuenciada) son idénticos a la secuencia del grupo 3. La proteína que codifica la secuencia de los clones del grupo 3 tiene entre 25 y 35% de identidad con las proteínas PREG y PHO80, con valores de E entre $1e^{-4}$ y $4e^{-15}$, 35 % con TbCYC2 con $E=1e^{-18}$ y 38 % con TcCYC2 con $E=4e^{-21}$. Al igual que para TcCYC2, la similitud se restringe a una región de las proteínas (Fig. 38 B). Se decidió denominar a este gen tccyc4, ya que en *T. brucei* se ha identificado, también por complementación en levaduras mutantes para ciclinas de G1, otra proteína a la cual denominaron TbCYC3, la cual no tiene similitud con las proteínas identificadas en este trabajo. Como se ve en el esquema de la figura 38 B, a esta secuencia le faltan los extremos amino y carboxi terminal.

La secuencia aminoacídica deducida de los clones del grupo 2 (15 clones) tienen 30% identidad con proteínas las proteínas tipo PREG de *A. thaliana* y *P. mariana*, con un valor de E = $9e^{-7}$ y $4e^{-7}$, respectivamente. La secuencia comparada también se restringe a una región (Fig. 38 C). El inserto tiene un tamaño de 667 pb y no presenta codón de terminación (tabla 6). Esta secuencia se denominó TcCYC5.

En la figura 39 se muestra la comparación aminoacídica entre TcCYC2, TcCYC4 y TcCYC5 y distintas proteínas.

Figura 38. Esquema mostrando las regiones de similitud con los porcentajes de identidad, puntaje y valor E, obtenidos del programa Blast, entre las ciclinas de *T. cruzi* y distintas proteínas.
(A) Comparación entre TcCYC y AthPREG, PmPRREG, NcPREG, PHO80 y TbCYC2.
(B) Comparación entre TcCYC4 y AthPREG, PmPRREG, NcPREG, PHO80, TbCYC2 y TcCYC2
(C) Comparación entre TcCYC5 y AthPREG y PmPRREG.
Los números indican aminoácidos. PmPREG, proteína tipo PREG de *Picea mariana*; AthPREG, proteína tipo PREG de *Arabidopsis thaliana*; TbCYC2, ciclina 2 de *Trypanosoma brucei*; ScPHO80, proteína PHO80 de *S cerevisiae* y NcPREG, proteína PREG de *N crassa*.



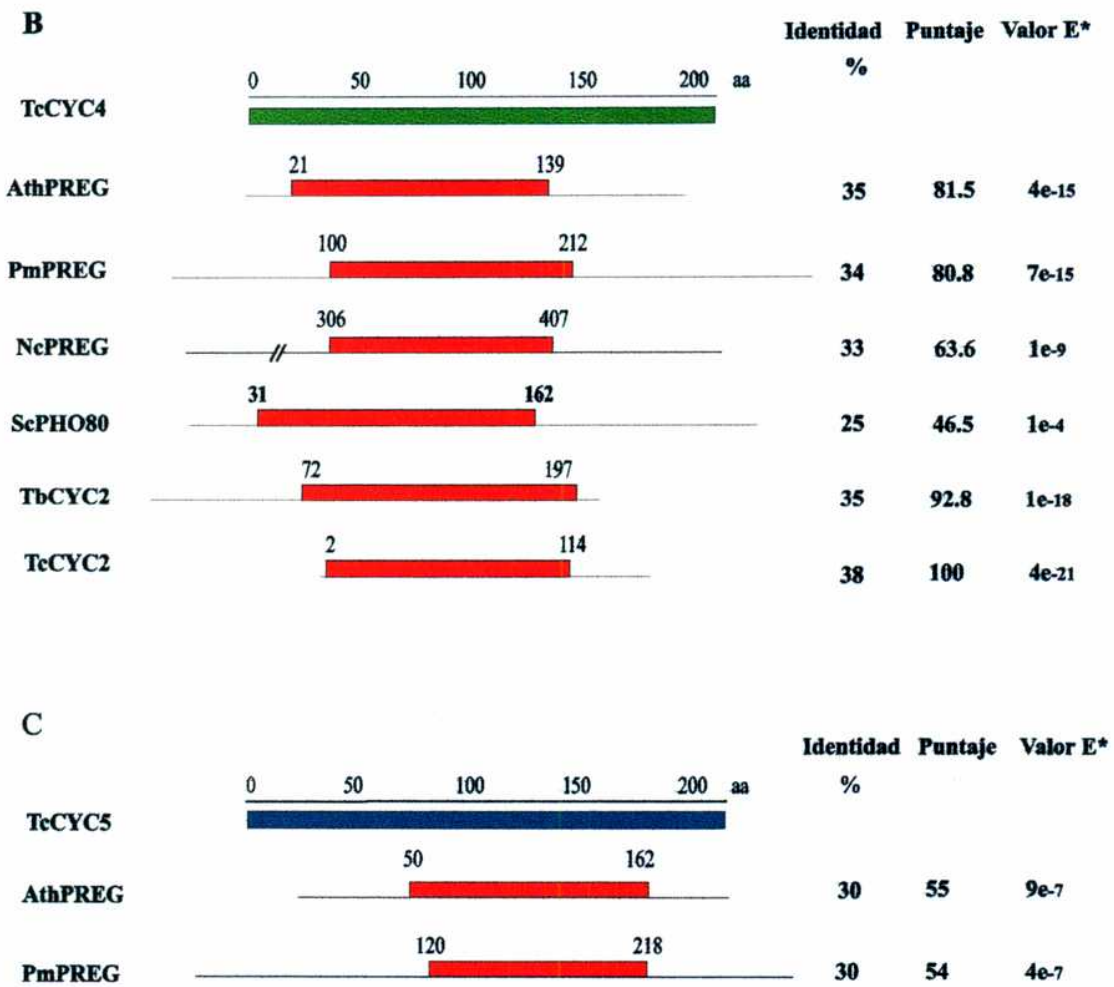
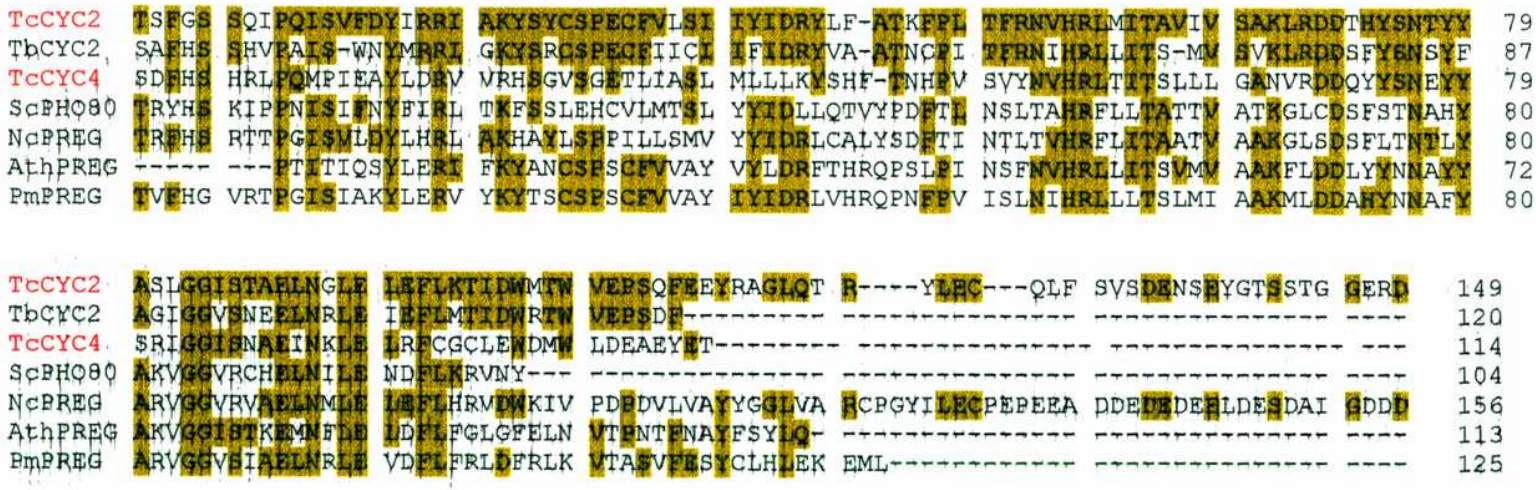


Figura 39. Alineación múltiple de la secuencia aminoacídica de TcCYC2 y TcCYC4 con las diferentes proteínas relacionadas.

(A) Comparación de TcCYC2 con TcCYC4, TbCYC2, PmPREG, AthPREG, ScPHO80 y NcPREG.
(B) Comparación de TcCYC4 con TbCYC2, PmPREG, AthPREG, ScPHO80 y NcPREG.
(C) Comparación de TcCYC5 con PmPREG y AthPREG,
Los residuos idénticos a la correspondientes ciclinas de *T. cruzi* están sombreados en verde. A la derecha de cada secuencia se indica el número de aminoácidos. PmPREG, proteína tipo PREG de *Picea mariana*; AthPREG, proteína tipo PREG de *Arabidopsis thaliana*; TbCYC2, ciclina 2 de *Trypanosoma brucei*; ScPHO80, proteína PHO80 de *S cerevisiae* y NcPREG, proteína PREG de *N crassa*.

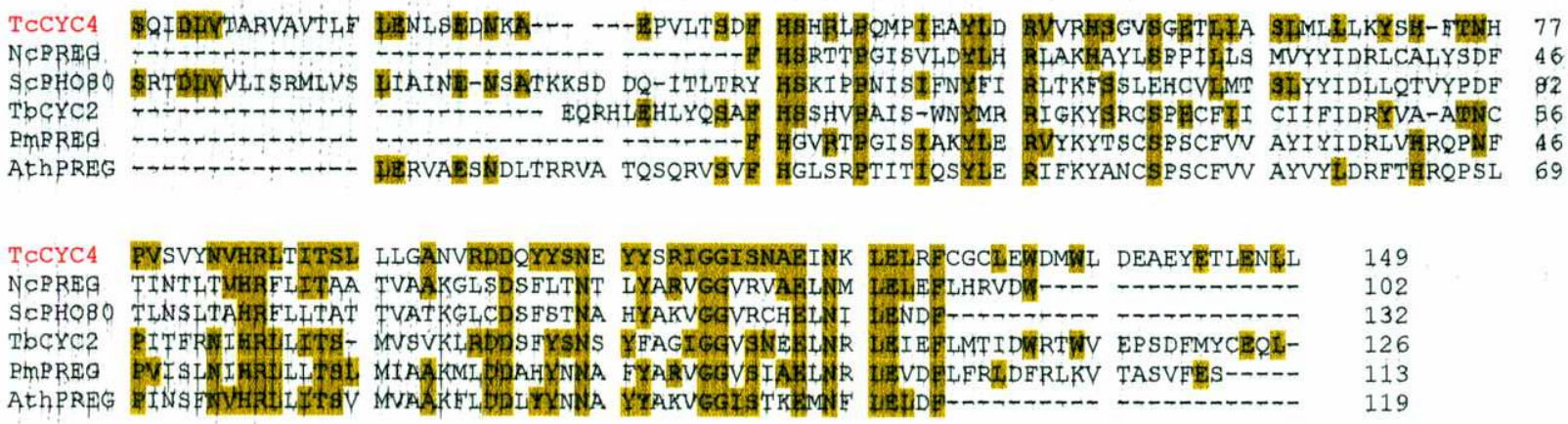
A

```
TcCYC2   TSFGS SQIPQISVFDYIRRI AKYSYCSPECFVLSI IYIDRYLF-ATKFPL TFRNVHRLMITAVIV SAKLRDDTHYSNTYY  79
TbCYC2   SAFHS SHVPAIS-WNYMRRI GKYSRCSPECFIICI IFIDRYVA-ATNCPI TFRNIHRLLITS-MV SVKLRDDSFYSNSYF  87
TcCYC4   SDFHS HRLPQMPIEAYLDRV VRHSGVSGETLIASL MLLLKYSHF-TNHPV SVYNVHRLTITSLLL GANVRDDQYYSNEYY  79
ScPHO80  TRYHS KIPPNISIFNYFIRL TKFSSLEHCVLMTSL YYIDLLQTVYPDFTL NSLTAHRFLLTATTV ATKGLCDSFSTNAHY  80
NcPREG   TRFHS RTTPGISVLDYLHRL AKHAYLSPPILLSMV YYIDRLCALYSDFTI NTLTVHRFLITAATV AAKGLSDSFLTNTLY  80
AthPREG  ----- ---PTITIQSYLERI FKYANCSPSCFVVAY VYLDRFTHRQPSLPI NSFNVHRLLITSVMV AAKFLDDLYYNNAYY  72
PmPREG   TVFHG VRTPGISIAKYLERV YKYTSCSPSCFVVAY IYIDRLVHRQPNFPV ISLNIHRLLLTSLMI AAKMLDDAHYNNAFY  80

TcCYC2   ASLGGISTAELNGLE LEFLKTIDWMTW VEPSQFEEYRAGLQT R----YLEC---QLF SVSDENSEYGTSSTG GERD   149
TbCYC2   AGIGGVSNEELNRLE IEFLMTIDWRTW VEPSDF--------- ---------------- ---------------- ----   120
TcCYC4   SRIGGISNAEINKLE LRFCGCLEWDMW LDEAEYET-------- ---------------- ---------------- ---   114
ScPHO80  AKVGGVRCHELNILE NDFLKRVNY--- ---------------- ---------------- ---------------- ----   104
NcPREG   ARVGGVRVAELNMLE LEFLHRVDWKIV PDPDVLVAYYGGLVA RCPGYILECPEPEEA DDEDEDEELDESDAI GDDD   156
AthPREG  AKVGGISTKEMNFLE LDFLFGLGFELN VTPNTFNAYFSYLQ- ---------------- ---------------- ----   113
PmPREG   ARVGGVSIAELNRLE VDFLFRLDFRLK VTASVFESYCLHLEK EML------------- ---------------- ----   125
```



B

```
TcCYC4   SQIDLVTARVAVTLF LENLSEDNKA--- ---EPVLTSDF HSHRLPQMPIEAYLD RVVRHSGVSGETLIA SLMLLLKYSH-FTNH  77
NcPREG   ---------------- ---------------- --------F HSRTTPGISVLDYLH RLAKHAYLSPPILLS MVYYIDRLCALYSDF  46
ScPHO80  SRTDLVVLISRMLVS LIAINE-NSATKKSD DQ-ITLTRY HSKIPPNISIFNYFI RLTKFSSLEHCVLMT SLYYIDLLQTVYPDF  82
TbCYC2   ---------------- ----------- EQRHLEHLYQSAF HSSHVPAIS-WNYMR RIGKYSRCSPECFII CIIFIDRYVA-ATNC  56
PmPREG   ---------------- ---------------- --------F HGVRTPGISIAKYLE RVYKYTSCSPSCFVV AYIYIDRLVHRQPNF  46
AthPREG  ---------------- LERVAESNDLTRRVA TQSQRVSVF HGLSRPTITIQSYLE RIFKYANCSPSCFVV AYVYLDRFTHRQPSL  69

TcCYC4   PVSVYNVHRLTITSL LLGANVRDDQYYSNE YYSRIGGISNAEINK LELRFCGCLEWDMWL DEAEYETLENLL   149
NcPREG   TINTLTVHRFLITAA TVAAKGLSDSFLTNT LYARVGGVRVAELNM LELEFLHRVDW---- ------------   102
ScPHO80  TLNSLTAHRFLLTAT TVATKGLCDSFSTNA HYAKVGGVRCHELNI LENDF---------- ------------   132
TbCYC2   PITFRNIHRLLITS- MVSVKLRDDSFYSNS YFAGIGGVSNEELNR LEIEFLMTIDWRTWV EPSDFMYCEQL-   126
PmPREG   PVISLNIHRLLLTSL MIAAKMLDDAHYNNA FYARVGGVSIAELNR LEVDFLFRLDFRLKV TASVFES-----   113
AthPREG  PINSFNVHRLLITSV MVAAKFLDDLYYNNA YYAKVGGISTKEMNF LELDF---------- ------------   119
```



C

```
TcCYC5   PTM-VQQLIESIGVH VAYGDAAPMVLIGAL VYISRITLQSPSEDV GVTNANWYRLVAIAI LIATKMYVDGSRKWN ERISKATGISLKEVQ     89
PmPREG   --------------- --YTSCSPSCFVVAY IYIDRLVHRQPN--F PVISLNIHRLLLTSL MIAAKM-LDDAHYNN AFYARVGGVSIAELN     70
AthPREG  PTITIQSYLERI--- FKYANCSPSCFVVAY VYLDRFLHRQPH--L PINSFNVHRLLITSV MVAAK-FLDDLYYNN AYYAKVGGISTKEMN     84

TcCYC5   KLELDFLFLIDFTLL IKEEEVETWAEWME    118
PmPREG   RLEVDFLFRLDFRLK VTASVFESYCLHLE     99
AthPREG  FLELDFLFGLGFELN VTPNTFNAYFSYLQ    113
```

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION

CLONADO Y ANÁLISIS DE LOS GENES tzcrk1 y tzcrk3.

Clonado.

El clonadode los genes tzcrk1 y tzcrk3 se realizó en 4 etapas. En el primer paso, se diseñaron iniciadores degenerados a partir de regiones conservadas presentes en proteínas de la familia CDK y se utilizaron en reacciones de PCR. Se identificaron 2 fragmentos cuyas secuencias aminoacídicas deducidas presentaban alta identidad con proteínas CRK de otros tripanosomátidos. Estos fragmentos se utilizaron como sondas para rastrear una biblioteca genómica de epimastigotes de *T. cruzi* sin éxito. Dados estos resultados, se decidió intentar clonar las regiones 5' y 3' por separado. Para ello se diseñaron iniciadores 100% idénticos a las secuencias ya identificadas en la etapa 1 y se utilizó el ME como oligonucleótido 5' para la región 5' del gen, y un oligo dT para la secuencia 3'. Las PCR realizadas con oligo dT no amplificaron fragmentos específicos por lo cual se decidió clonar el extermo 3' por *jumping PCR*. Esta técnica pudo ser empleada en estos casos ya que los genes de *T. cruzi* no tienen intrones, permitiendo utilizar ADN genómico como templado en las PCRs. Los resultados obtenidos demuestran que esta técnica es altamente efectiva para identificar regiones cuando solo se conoce una parte del gen a clonar. Es importante destacar que en ambos casos, solo se realizó el experimento una vez y todos los clones levantados luego de la hibridación de colonias correspondieron a los genes de interés.

Los genes completos para ambas quinasas se levantaron por PCR utilizando iniciadores específicos diseñados según las secuencias identificadas en los extermo 5' y 3' y se clonaron en vectores de expresión bacterianos.

Análisis de secuencia.

Las secuencias de tzcrk1 y 3 presentan alta identidad con genes ya identificados en otros tripanosomátidos. La secuencia aminoácidica deducida muestra que estas proteínas pertenecen a la familia de las CDKs. Ambas tienen dominios y aminoácidos conservados en posiciones equivalentes a proteínas tipo CDC2. El motivo PSTAIRE (EGV**PSTAIRE**ISLLKE), involucrado en la asociación con ciclinas, está presente, con algunas modificaciones, en ambas proteínas. En el caso de la TzCRK1 este motivo tiene solo un cambio, en el cual la Ser es sustituida por Cis (PCTAIRE). Existen quinasas denominadas PCTAIRE, 1, 2 y 3, identificadas en células de mamíferos, que pertenecen a la familia de la CDC2 (Okuda, T. y col. 1992). Estas se expresan predominantemente en células post-mitóticas, pero su función no ha sido determinada aún. Utilizando la técnica del doble híbrido se identificaron proteínas capaces de asociarse con PCTAIRE-1, que incluyen distintas isoformas de la proteína 14-3-3, la proteína

p11, también conocida como la cadena liviana de calpactina I, sugiriendo su participación en varias vías de transducción de señales (Sladeczek, F. y col. 1997). La identidad de TzCRK1 comparada con las proteínas PCTAIRE, no es mayor a la observada con las CDC28, CDC2 y CDK2 humanas, indicando que no necesariamente tendrían funciones similares. Por otro lado, se comprobó que este dominio es funcional ya que es capaz de asociarse con ciclinas de mamíferos y al utilizar, en este trabajo, la técnica del doble híbrido, se pudieron clonar proteínas tipo ciclinas. Los resultados del doble híbrido solo indican que TzCRK1 es capaz de asociarse con ciclinas pero no prueban que lo hace a través del dominio PCTAIRE, aunque por estudios realizados en CDKs, éste sería el dominio involucrado en la unión con ciclinas.

En la proteína TzCRK3 el dominio correspondiente a PSTAIRE (EGVPSTAIREISLLKE) tiene 6 modificaciones, EGIPQTALREVSILQE. Estas sustituciones están conservadas en las quinasas TbCRK3, LmmCRK3 y LmajCRK3. En este momento se está utilizando la técnica del doble híbrido con la TzCRK3 para estudiar que tipos de proteínas son capaces de asociarse con la misma. Se estudiará si las ciclinas identificadas para TzCRK1 pueden unirse con TzCRK3 analizando de esta manera la importancia de éste y otros dominios en estas proteínas.

Por otro lado, estas quinasas también presentan, en regiones equivalentes, el dominio conservado GDSEIGQ que está involucrado en la regulación de la fosforilación del aminoácido activador Tre161 en la HsCDC2, Tre160 en la HsCDK2 y Tre169 en la CDC28 de *S. cerevisiae*.

En la TzCRK3 este dominio tiene una sola sustitución, un ácido aspártico (D) por una glicina (G), sugiriendo que mecanismos similares estarían controlando la fosforilación de su residuo equivalente Tre174. En cambio, en la TzCRK1, los aminoácidos D, S, E e I, están cambiados por K, N, D y A, respectivamente, siendo las sustituciones S por N y E por D conservativas. Esta región no está muy conservada en las distintas CDKs, como sucede con el dominio de TzCRK1, sugiriendo que existen otras quinasas CAK (*CDKs activating kinases*) que estarían activando a la correspondiente quinasa.

La actividad de las proteínas CDC2 de distintos organismos y varios miembros de la familia de las CDKs está regulada también por eventos de fosforilación y desfosforilación en aminoácidos específicos. En el caso de la CDC2 y CDK2 humanas, la fosforilación de los residuos Tre14 y Tir15 inhiben la actividad de las quinasas y la fosforilación de la Tre161 en la CDC2 y Tre160 en la CDK2, activa las mismas (ver Introducción). En levaduras, la Tre14 no es fosforilada. En ambas CRKs identificadas de *T. cruzi*, existen aminoácidos en posiciones equivalentes, Tre32, Tir33 y Tre174 para TzCRK3 y Tre15, Tir16, y Tre160 en TzCRK1. No se ha demostrado aún si los aminoácidos equivalentes de las proteínas homólogas de tripanosomátidos son importantes en la regulación de la actividad de estas quinasas. Experimentos realizados con la proteína relacionada con la CDC2 de *Plasmodium falciparum*, PfPK5, mostraron que el aminoácido Tre158, equivalente a la Tre161 de la CDC2, es importante para la actividad de la misma. Este aminoácido fue sustituido por un ácido glutámico, que por su carga negativa, simula un estado de

fosforilación en este residuo. Este cambio aumentó la actividad quinasa de la proteína indicando que la fosforilación de este residuo participaría en el control de la actividad (Graeser, R. y col 1996). Estas evidencias, sumadas a la similitud que presentan ambas TzCRKs en la secuencia primaria con proteínas CDC2, sugieren que al menos los residuos equivalentes a Tre161, son importantes para la actividad de las quinasas. Lo mismo se podría predecir para los aminoácidos Tre32 y Tir33 en TzCRK3 y Tre25 y Tir16 en TzCRK1.

Evidencias de Trans-splicing alternativo.

El trans-splicing, junto con la poliadenilación en 3´, es el mecanismo por el cual los transcriptos policistrónicos de tripanosomátidos son procesados para obtener mensajeros maduros. Durante el trans-splicing la secuencia líder o ME es ligada a la región 5´de pre-ARNs. Este mecanismo se detalla en la sección Introducción, Características de tripanosomáticos, Trans-splicing. Brevemente, el mecanismo de trans-splicing es muy similar al de cis-splicing, pero en lugar de ocurrir intramolecularmente, ocurre entre moléculas distintas de ARN. La unión entre el ME y el pre-ARN ocurre en el primer dinucleótido AG luego de una secuencia rica en pirimidinas. En la etapa 2, para el gen tzcrk1, se obtuvieron 4 clones distintos, que tienen la misma región codificante, que corresponde al extremo 5´ del gen tzcrk1, y distinta región 5´NC. Como fue explicado en la sección Resultados, estos clones se pueden ubicar en 2 grupos, cada uno con una secuencia 5´NC corta y otra larga. La secuencia corta de cada grupo es idéntica a la región de la secuencia larga del mismo grupo, que abarca desde el -1 hasta el sitio de inserción del ME en la secuencia corta. En este sitio se observa, en la secuencia larga, un dinucleótido AG, el cual es el primero luego de un tracto de polipirimidinas (ver fig.14). Estos resultados podrían explicarse postulando la existencia de mecanismos de trans-splicing alternativo sobre los transcriptos de tzcrk1. En este caso, el ME podría ser adicionado en dos sitios diferentes (alternativos) obteniendo así dos ARNm maduros de distinta longitud. Si así fuera, los dinucleótidos AG y los tractos de polipirimidinas utilizados para el trans-splicing de las secuencias cortas serían los observados en las secuencias largas correspondientes. Por otro lado, podría ser que exista más de una copia del gen por genoma haploide y que los ADNc obtenidos sean productos de la transcripción de distintas copias. Sería interesante estudiar si los putativos sitios de trans-splicing de las secuencias largas son funcionales; si no lo fueran, los 4 ADNc provendrían de copias independientes del gen, pudiendo asegurarse que al menos existen 2 copias del gen por genoma haploide.

Mecanismos de trans-splicing alternativo fueron descriptos para algunos genes de tripanosomátidos (Vassella, R. y col. 1994, Pays, E., 1989) y en algunos casos se lo ha implicado en la regulación de la expresión entre distintos estadios (Pays, E., 1989). En las RT/PCRs realizadas con ARN de tripomastigotes para el gen tzcrk1, se observan las mismas 2 bandas, de 330 y 450 pb, que en epimastigotes, las cuales corresponden a los ARNm con las regiones 5´NC

cortas y largas respectivamente. Esta observación indica que en la forma tripomastigote también ocurriría trans-splicing alternativo, sugiriendo que si realmente existe, no estaría regulando la expresión entre epimastigotes y tripomastigotes. Pero, podría existir un mecanismo por el cual en los dos estadíos del parásito se traduzcan diferencialmente, uno u otro transcripto, resultando en la expresión constante de la proteína en todas las formas. Existen muchos trabajos que muestran la importancia de las regiones 5´y 3´NC en expresión de genes en tripanosomátidos. Este podría ser un ejemplo de la importancia de la región 5´NC para la traducción de proteína. A pesar de que es una mera especulación, se podría pensar que la maquinaria de traducción de las distintas formas presenta diferencias, favoreciendo la traducción de cierto transcripto en función de su región 5´NC. Para llegar a alguna conclusión es necesario estudiar si alguno de estos transcriptos, cortos y largos, son diferencialmente traducidos entre distintas formas.

Organización Genómica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de Southern blot sugieren que, tanto tzcrk1 como tzcrk3, están presentes en el genoma de *T. cruzi* como genes de copia única por lote haploide. A pesar de no haber realizado experimentos de campo pulsado para determinar en qué cromosoma/s están presentes estos genes, consideramos que la organización no es de clase 1 (ver Introducción) en la cual se agrupan genes que pueden tener 1-3 copias en un solo locus (genes haploides), ya que en esta categoría están los genes que codifican para proteínas esenciales involucradas en el metabolismo básico. En los Southern blots, las diferentes intensidades observadas para alguna de las digestiones no descartan la posibilidad de que exista una organización genética de clase 2 (ver Introducción) con un polimorfismo tal que uno de los loci tenga 2 copias en lugar de una. Al realizar Southern blots utilizando ADN digerido parcialmente (datos no mostrados), se obtuvieron resultados que sugieren que ambas quinasas están codificadas por 1 solo gen. Se necesitaría realizar un estudio más profundo para poder interpretar la observación de bandas con distinta intensidad para alguna de las digestiones.

Por otro lado, los resultados observados al analizar las regiones 5´NC obtenidas para el gen tzcrk1 en la etapa 2, podrían ser explicados por la existencia de eventos de trans-splicing alternativo o por la existencia de 2 copias de este gen por genoma haploide (ver Discusión, Evidencias de Trans-splicing Alternativo). Si el caso fuera este último, los clones con secuencias 5´NC cortas se estarían generando de una copia del gen y los clones con secuencias largas de la otra copia.

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TZCRK1.

La proteína TzCRK1 se expresó como proteína recombinante en bacterias, se purificó y se utilizó como antígeno para elaborar un antisuero anti-TzCRK1. Este antisuero fue analizado en ensayos

de Western blot mostrando que es específico para TzCRK1. En los WBs realizados en los ensayos de complementación, donde las proteínas TzCRK1 y 3 fueron co-expresadas, este suero no reconoció a la TzCRK3 ni a la CDC28 endógena. Tampoco fue capaz de reconocer a la TzCRK3 expresada en bacterias como proteína de fusión con la cola de histidinas.

Este antisuero mostró, en ensayos de WB, que la TzCRK1 endógena presenta un PM de 33 kDa, que sus niveles no varían a lo largo del ciclo celular y que está presente en cantidades iguales en los tres estadíos del parásito. Estos resultados sugieren que, si esta proteína esta involucrada en la regulación del ciclo celular, su actividad debe estar regulada post-traduccionalmente. La actividad de las proteínas de la familia de la CDC2 esta controlada por eventos post-traduccionales de fosforilación y desfosforilación y asociación con ciclinas e inhibidores específicos. El análisis aminoacídico de esta proteína muestra que tiene los dominios conservados implicados en la regulación de la actividad de este tipo de quinasas, sugiriendo que mecanismos similares a los descriptos en otros organismos estarían controlando su actividad en las distintas fases del ciclo celular y en las distintas formas del parásito. Experimentos realizados en *Leishmania mexicana* mostraron que LmmCRK1 se expresa en los tres estadíos del parásito, pero existe actividad diferencial entre las distintas formas. En la forma replicativa promatigote es activa tanto en la fase logarítmica de crecimiento como en la estacionaria; en cambio no se detectó actividad en la forma replicativa amastigote y muy poca en la forma no replicativa metacíclica. Experimentos de inmunoprecipitación utilizando IgGs purificadas del antisuero anti-TzCRK1 mostraron que esta quinasa es activa en la forma epimastigote. Ensayos preliminares, no mostrados en esta tesis, indican que TzCRK1 es activa en los tres estadíos del parásito. Estos resultados no fueron incluidos ya que se realizaron con una forma de amastigote denominada amastigote *like* y la forma tripomastigote presentaba contaminaciones con más de 18 % de epimastigotes.

Los resultados de inmunoprecipitación indican que TzCRK1 es una quinasa funcional capaz de fosforilar histona H1 y la proteína retinoblastoma. La histona H1 es el sustrato exógeno utilizado para ensayar la actividad quinasa de proteínas tipo CDC2. La proteína Rb es fosforilada *in vivo* por complejos formados por la quinasa CDK4/CDK6 y ciclinas D. Estudios realizados con otras CRKs mostraron que, en ensayos de inmunoprecipitación son capaces de fosforilar histona H1. Esta es la primera vez que se muestra que una proteína tipo CRK puede utilizar como sustrato la proteína Rb, aportando evidencias sobre un posible rol en el ciclo celular.

El estudio realizado con amastigotes sincronizados donde se muestra que tanto los niveles como la localización de la TzCRK1 no varían a lo largo del ciclo celular, también muestran que la TzCRK1 esta localizada en el citoplasma, en regiones discretas del núcleo y en el kinetoplasto. A pesar de que no se conoce la función específica de esta proteína en ninguno de los tripanosomáticos en la cual fue descripta, estos resultados sugieren que podría estar regulando tanto la fase S del núcleo como la fase S del kinetoplato. Cabe recordar que en estos organismos,

la división del kinetoplasto presenta una fase S bien discreta en la cual se replica en ADNk. En la replicación del ADN están involucradas distintos tipos de proteínas las cuales controlan la iniciación, progresión, fidelidad y finalización de la replicación del ADN. Existen evidencias que indican que las CDKs están involucradas en la fosforilación de alguna de estas proteínas controlando así el inicio de la replicación. El control de la replicación del ADN mitocondrial es poco claro en tripanosomátidos

TzCRK1 como proteína recombinante.

Ensayos de quinasa utilizando la proteína recombinante GST-TzCRK1 mostraron que la misma es capaz de fosforilar histona H1 y la proteína Rb y puede autofosforilarse. Esto indica que *in vitro*, esta proteína es activa en la ausencia de ciclinas y otras proteínas regulatorias, necesarias para la actividad de este tipo de quinasas. La única CRK descripta con una leve actividad quinasa *in vitro* es la PfPK5 (Ross-MacDonald, R. y col. 1994). Con estos resultados no se puede concluir cómo es la regulación de esta proteína *in vivo* ya que no se puede descartar la posibilidad que el plegamiento adquirido por la fusión, en la región amino, con la GST modifique la conformación a una forma constitutivamente activa.

Al expresar la TzCRK1 como proteína de fusión con HA en el sistema heterólogo de células COS-7, la misma fue capaz de asociarse con distintas ciclinas de estas células de mamíferos. Estos resultados muestran que esta proteína tiene un dominio tipo PSTAIRE funcional (PCTAIRE), y que el mismo puede unir distintos tipos de ciclinas, característica que tienen las quinasas de la familia CDK. Esta propiedad sugiere que *in vivo* esta quinasa también tendría la capacidad de asociarse con distintas proteínas tipo ciclinas que estarían regulando su actividad. En experimentos donde se utilizó la técnica del doble híbrido se identificaron 3 tipos de genes que codifican para proteínas cuyas secuencias presentan similitud con ciclinas de la familia de PREG y PHO80 (ver Discusión, Identificación de ciclinas que se asocian con TzCRK1), sugiriendo que *in vivo* también se asociaría con distintas subunidades regulatorias.

El Sistema del Doble Híbrido.

Consideraciones generales.

La sistema del doble híbrido fue utilizado por muchos grupos para identificar y clonar genes cuyas proteínas puedan asociarse con alguna proteína conocida y para estudiar interacciones entre proteínas. Una falla importante de esta técnica, informada por muchos investigadores, es el gran número de falsos positivos que se obtienen.

En este trabajo, si consideramos como secuencias específicas a todos aquellos clones del supergrupo I, se obtuvo entonces un 44 % de falsos positivos. Si tomamos como positivos solamente aquellos clones cuyas secuencias corresponden a alguna de las tres ciclinas identificadas, entonces el porcentaje de falsos positivos asciende a 62%. Cuando se realizó este rastreo, se decidió levantar durante 3 días colonias de levaduras capaces de crecer en medios sin histidina. Se levantaron 95 colonias, de las cuales 74 fueron también β-gal positivas. Considerando positivos a los clones del supergurpo I, el 89% de los clones levantados el día 1 fueron positivos y solo el 53 % de los clones de los días 2 y 3 (tabla 7). Por otro lado, es muy importante aclarar para esta discusión que al menos el 50 % de las colonias levantadas los días 2 y 3, tuvieron actividades de β-galactosidasa relativamente débil, determinada por el color celeste oscuro obtenido en lugar de azul. En cambio, la mayoría de las colonias del día 1 revelaron color azul. También es importante destacar que todos los grupos del supergrupo I tienen miembros levantados el día 1, es decir, que al menos un representante de cada grupo fue levantado el día 1. Todos estos resultados llevan a concluir que en este rastreo hubiera sido suficiente haber levantado colonias solo el día 1 y quedarse con aquellas que tuvieron alta actividad β-galactosidasa (azules). Estas observaciones son importantes para tener en cuenta en futuros rastreos cuando se emplee el sistema usado en este trabajo.

Identificación de ciclinas que se asocian con TzCRK1.

Utilizando la técnica del doble híbrido para la proteína TzCRK1 se pudieron clonar tres genes cuyas secuencias aminoacídicas deducidas presentan cierta identidad con las proteínas tipo ciclinas, PHO80, TbCYC2 y proteínas de la familia PREG. La comparación se realizó utilizando el programa BLAST que proporciona un puntaje para cada comparación con un valor E, el cual sugiere posible homología entre dos secuencias. Cuanto menor es el valor de E, mayor la posibilidad de que dos secuencias sean homólogas. En este trabajo los valores E obtenidos para TcCYC2 varían desde $1e^{-10}$ contra ScPHO80 hasta $3e^{-37}$ contra TbCYC2, para TcCYC4, desde $1e^{-4}$ contra ScPHO80 hasta $4e^{-18}$ contra TbCYC2 y para TcCYC5, se obtienen valores E de $4\text{-}7e^{-7}$ contra AthPREG y PmPREG, respectivamente. Las regiones que presentaron puntajes con bajos valores de E se restringen al dominio de éstas proteínas con homología a ciclinas. Estos resultados sugieren que los genes identificados de *T. cruzi* codifican para putativas ciclinas capaces de asociarse y regular la actividad de TzCRK1. Por otro lado es importante destacar el número de clones obtenidos para cada ciclina. Para TcCYC2 solo se obtuvo 1 clon de 74 colonias his+/β-gal+, para TcCYC4 se obtuvieron en total 12 clones y para TcCYC5 15 clones. Estos resultados podrían estar revelando putativas afinidades de cada ciclina con la TzCRK1, pero no se puede concluir fehacientemente esto ya que es posible que las afinidades de asociación varíen debido a que faltan regiones de las proteínas. También es posible que cada uno de estos genes este diferencialemente representado en la biblioteca de ADNc obteniendo de esta

manera distinta cantidad de clones.

La técnica del doble híbrido permite identificar posibles proteínas que interactúen, es decir que la asociación obtenida en este sistema no necesariamente ocurre *in vivo*. Actualmente se están realizando experimentos para poder comprobar que estas asociaciones son reales y no son un artefacto de la técnica. Algo importante que destacar es también el hecho de haber obtenido 2 tipos diferentes de clones que codifican para la misma proteína en el caso del gen tccyc4. Estos resultados sugieren que la asociación observada, al menos para esta proteína, ocurre por la existencia real de dominios capaces de asociarse. Por otro lado, en el laboratorio se están terminando de secuenciar los clones de los grupos 4 y 17.

La función de las proteínas CRKs en tripanosomátidos no ha sido determinada aún. En *L. mexicana* se ha demostrado que LmmCRK1 tiene diferente actividad en los distintos estadíos del parásito y que es esencial para la viablidad de las células (ver Introducción). Por otro lado, los ensayos de complementación en levaduras con LmajCRK3 mostraron que esta proteína sería la CDC2 homóloga funcional y que altos niveles de la misma inhiben el crecimiento de levaduras (ver Introducción, CDKs-Ciclinas de Tripanosomátidos y Discusión, Ensayos de Complementación). En *L. mexicana* se ha clonado el gen p12cks, homólogo al gen p13suc1 de *S. pombe*, y se ha determinado que es capaz de asociarse con la LmmCRK3 sugiriendo un posible rol de estas proteínas en la regulación del ciclo celular. En experimentos no publicados (Mottram, J. y col. comunicación personal), se clonaron 2 genes cuyas proteínas fueron capaces de complementar la función de las ciclinas de G_1 de *S. cerevisiae*, los que fueron denominadas tbcyc2 y tbcyc3. En este trabajo, al utilizar la técnica del doble híbrido se han identificado genes cuyas secuencias aminoacídicas deducidas tienen identidad con TbCYC2, PHO80 y con proteínas tipo PREG (ver Introducción, Complejos PHO85-Ciclinas). La proteína PHO80 de *S. cerevisiae* regula la actividad de la quinasa denominada PHO85, perteneciente a la familia de las CDKs. Esta quinasa es capaz de asociarse con varios tipos de ciclinas. Los complejos formados por PHO85 con diferentes ciclinas participan en distintas fases del ciclo celular y en otros procesos biológicos que incluyen la regulación del metabolismo del fosfato y la síntesis del glucógeno. La identificación de putativas ciclinas con capacidad de asociarse a TzCRK1, clonadas en el ensayo del doble híbrido, indica que esta quinasa puede asociarse con distintas proteínas y sugiere que, al igual que PHO85, podría participar en varios procesos biológicos.

Es importante recordar que en este trabajo se han identificado otros ORF (clones del supergrupo I) los cuales podrían codificar para proteínas que esten regulando la actividad de TzCRK1 o podrían representar putativos sustratos de la quinasa.

Ensayos de complementación.

Al estudiar la capacidad de las proteínas TzCRK1 y/o TzCRK3 de complementar la función de la

CDC28 de *S. cerevisiae*, se obtuvieron resultados negativos, indicando que ninguna de estas dos proteínas sería la CDC2 homóloga funcional de *T. cruzi*. Ensayos realizados con las proteínas de *L. mexicana* y *T. brucei* indican que las mismas tampoco pueden complementar la función de la CDC2 en *S. pombe* o CDC28 en *S. cerevisiae*. En un trabajo publicado recientemente se muestra que la CRK3 de *L. major*, bajo ciertas condiciones, puede complementar la función de la CDC2 de *S. pombe*. Los autores observaron que altas cantidades de la proteína inhibía, a la temperatura permisiva, el crecimiento en las cepas mutantes termosensibles. Al integrar el gen al genoma lograron bajar los niveles de expresión y, bajo estas condiciones, LmajCRK3 pudo complementar la función de la CDC2 mutante. Los niveles de expresión no fueron controlados en los experimentos realizados con las CRKs de *T. cruzi*; este punto no se aclara en los trabajos de complementación realizados con las CRKs de los otros tripanosomátidos, por lo cual no se puede descartar que alguna de estas quinasas sea la homóloga funcional de la CDC2.

CONCLUSIONES

A través del presente trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones.

1. Se han clonado dos quinasas relacionadas con la CDC2, tzcrk1 y tzcrk3, del parásito *Trypanosoma cruzi*. La secuencia aminoacídica deducida muestra que estos genes codifican proteínas de 301 y 311 aminoácidos, respectivamente. Ambas CRKs tienen una identidad aminoacídica de entre 51-54% con las proteínas CDC2 humana, CDK2 humana y la CDC28 de *S. cerevisiae* y presentan los dominios característicos de proteínas pertenecientes a la familia de las CDKs.
2. El análisis de las regiones 5'NC de los ADNc para tzcrk1 sugiere la existencia de mecanismos de trans-splicing alternativo sobre los transcriptos de este gen y muestra que son transcriptas al menos 2 copias de tzcrk1. El ensayo de RT/PCR utilizando ARN de la forma tripomastigote indica que el gen tzcrk1 es transcripto en este estadío. También muestra la amplificación de las mismas bandas que en epimastigotes, sugieriendo que en tripomastigotes también estarían involucrados mecanismos de trans-splicing alternativo en el procesamiento de los ARNm de este gen.
3. El análisis de las regiones 5'NC de los ADNc clonados para tzcrk3 indica que al menos 2 copias de este gen son transcriptas.
4. Los experimentos de Southern blot y el análisis de las regiones 5'NC sugieren que, tanto tzcrk1 como tzcrk3, están presentes en el genoma de *T. cruzi* como genes de copia única por genoma haploide
5. Los experimentos de Northern blot muestran que el tamaño de los transcriptos para tzcrk1 varía entre 1.6 a 1.7 kb mientras que para tzcrk3 se observa una banda que comprende mensajeros de 1.2 a 1.4 kb.
6. El antisuero anti TzCRK1 muestra que esta proteína se expresa con un peso molecular de 33 kDa, en iguales cantidades, en los tres estadíos del parásito.
7. Experimentos utilizando cultivos de la forma epimastigote, sincronizados con hidroxiurea, muestran que los niveles proteicos de TzCRK1 no varían a lo largo del ciclo celular. Por otro lado, experimentos con amastigotes sincronizados muestran que en este estadío, los niveles tampoco varían a lo largo del ciclo celular.
8. Los experimentos utilizando amastigotes sincronizados también revelan que TzCRK1 se localiza en el citoplasma, regiones discretas del núcleo y kinetoplasto.
9. Utilizando IgGs purificadas del suero anti-TzCRK1 se logró inmunoprecipitar una/s quinasa/s capaces de fosforilar *in vitro* los sustratos histona H1 y la proteína Rb.

10. El antisuero anti-TzCRK3 reveló una proteína con un peso molecular de 40 kDa en las fracciones nuclear y en el precipitado de 100000 xg, y una proteína de 54 kDa en la fracción citoplasmática.
11. La proteína recombinante GST-TzCRK1 presentó actividad quinasa *in vitro* en ausencia de proteínas regulatorias. En cambio, la proteína His-TzCRK3 no fue capaz de fosforilar ninguno de los sustratos exógenos ensayados.
12. La proteína TzCRK1 se expresó como proteína de fusión con HA en células de mamíferos. Ensayos de IP con anti HA mostraron que esta proteína tiene actividad quinasa. Por otro lado se mostró que TzCRK1 es capaz de asociarse con las ciclinas E, D3 y A de mamíferos.
13. Ensayos de complementación utilizando levaduras mutantes, termosensibles para la proteína CDC28 mostraron que, bajo las condiciones experimentales empleadas, ninguna de las dos CRKs de *T. cruzi* puede complementar la función de la CDC28 de levaduras.
14. Utilizando la técnica del doble híbrido, con la proteína TzCRK1, se identificaron varios ORF que codifican para putativas proteínas capaces de asociarse con TzCRK1. Específicamente se identificaron 3 genes cuyas secuencias aminoacídicas deducidas codifican para proteínas que presentan identidad con proteínas pertenecientes a la familia de ciclinas, TcCYC2, TcCYC4 y TcCYC5.

Al comenzar hace cuatro años atrás los primeros experimentos relatados en esta tesis, ansiaba poder contestar unas pocas preguntas con el objetivo de conocer más acerca de cómo estos organismos regulan su división celular. Algunas de esas preguntas han sido resueltas y otras aún esperan una respuesta. Pero lo cierto es que hoy los interrogantes se han multiplicado exponencialmente con la aparición de cada nuevo resultado. Al terminar de escribir esta tesis, es mayor el sentimiento de que sabemos poco y nada, que el sentimiento de que hemos descubierto algo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA.

- Affranchino, J., González, S. y Pays, E. (1993) Isolation of a mitotic-like cyclin homologue from the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Gene*, **132**:75-82.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.(1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
- Amon, A., Irniger, S. y Nasmyth, K. (1994) Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell*, 77(7):1037-50.
- Amon, A., Tyers, M., Futcher, B. y Nasmyth K (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell*, **74**:993-1007
- Andrews, B. y Measday, V. (1998) The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.*, **14**: 66
- Andrews, N. y Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool.*, **29**:264-9.
- Bai, C., Richman, R. y Elledge, S.J. (1994) Human cyclin F. *EMBO J.*, **13**:6087-98.
- Bailly, E., Pines, J., Hunter, T. y Bornens, M. (1992) Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J. Cell Sci.*, **101**: 529.
- Basi, G. y Draetta, G. (1995) The cdc2 kinase: structure, activation, and its role at mitosis in vertebrate cells. En: editores Hutchinson C. y Glover, M. Cell Cycle Control. IRL Press, pag. 106-143.
- Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature*, **300**:706.
- Behnke, J. M. (1990) en "Parasites: Immunity and Pathology. The consequences of parasitic infection in mammals", Taylor y Fancis, pags. 16-62
- Bell, S.P. y Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, **357**:128-34.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H. y Tromp, M.C. (1986) Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell.* **46**:819-26.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7(6):1513-23.
- Booher, R. y Beach, D. (1987) Interaction between cdc13+ and cdc2+ in the control of mitosis in fission yeast; dissociation of the G1 and G2 roles of the cdc2+ protein kinase. *EMBO J.*, **6**:3441-7.
- Booher, R. y Beach, D. (1987) Interaction between *cdc13*$^{+}$ and *cdc2*$^{+}$ in the control of mitosis in fission yeast; dissociation of the G1 and G2 roles of the *cdc2*$^{+}$. *EMBO J.*, **6**:3441.
- Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S. y Beach, D.H. (1989) The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell*, **58**:485-97.

- Brown, L., Hines, J. C., y Ray, D. S. (1992) The *Crithidia fasciculata* CRK gene encodes a novel CDC2-related protein containing large inserts between highly conserved domains. *Nucleic Acids Res.*, **20**:5452-5456.
- Buck, V., Russell, P. y Millar, J.B. (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *EMBO J.*, **14**:6173-83.
- Chagas, C. (1909) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1:159.
- Cocker, J.H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. y Diffley JF. (1996) An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature*, **379**:180-2.
- CTD - WHO, Division of Control of Tropical Diseases –World Health Organization. (1997) Progress Report.
- Dahmann, C., Diffley, J.F. y Nasmyth, K.A. (1995) S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr Biol.*, 5:1257-69
- Damagnez, V., Makela, T.P. y Cottarel, G. (1995) Schizosaccharomyces pombe Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *EMBO J.*, **14**:6164-72.
- Dirick, L., Bohm, T. y Nasmyth, K. (1995) Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J.*, **14**(19):4803-13
- Dulic, V., Lees, E. y Reed, S.I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, **257**:1958-61.
- Dunphy, W. G., Brizuela, L. Beach, D., y Newport, J (1988). The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplamic regulator of mitosis. *Cell*, **54**:423.
- Elledge, S. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis (1996). *Science*, **274**: 1664-1672.
- Elsasser, S., Lou, F., Wang, B., Campbell, J.L. y Jong, A. (1996) Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases. *Mol Biol Cell.*, **7**:1723-35.
- Engel, J. C. y Dvorak, J. A. (1988) Trypanosoma cruzi: Cell Biological Behavior of Epimastigote and Amastigote Forms in Axenic Culture. *J. Protozool.*, **35**:513-518.

  Englund, P. T., Guilbride, L.D., Hwa, Kuo-Yuan, Johnson, C. E., Li, C., Rocco, L.J. y Torri, A. F. (1996) Trans-splicing in tripanosomatid protozoa. En: editores Smith, D. y Parsons, M. Molecular Biology of Parasitic Protozoa. IRL Press, pag. 75-87.
- Epstein, C.B. y Cross, F.R. (1992) CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.*, **6**:1695-706
- Evans, T., Hunter, T. y Youngblom, J. (1982) On the role of maternal mRNA in sea urchins: studies of a protein which appears to be destroyed at a particular point during each division cycle. *Biol. Bull.*, **163**:372.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J.. Distel, D., y Hunter, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, **33**:389.
- Feldman, R.M., Correl, C.C., Kaplan, K. B. y Deshaies, R.J. (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, **91**(2):221-30.
- Fields, S. y Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**:245-6.

- Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A., Nasmyth, K., Goetsch, L., Byers, B. y Futcher B. (1992) Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*, 3:805-18.
- Foreman, P. y Davis, W. (1994) Cloning vectors for the synthesis of epitope-tagged, truncated and fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **144**(1):63-8.
- Funabiki, h., Yamano, H., Kumada, K. Nagao, K., Hunter, T. y Yanagida, M. (1996) Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature*, **381**:438.
- Galanti, N., Dvorak, J.A., Grenet, J. and McDaniel, J.P. (1994) Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Exp. Cell Res.*, **214**:225-230.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., y Maller, J. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. *Cell*, 54:433.
- Gould, K.L. y Nurse, P. (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, **342**:39-45.
- Gould, K.L., Moreno, S., Owen, D.J., Sazer S. y Nurse P (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34cdc2 function. *EMBO J.*, **10**:3297-309.
- Graeser, R., Richard, M. F. y Kappes, B. (1996) Mechanisms of activation of the cdc2-related kinase PfPK5 from Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 79:125-127.
- Grant, K. M., Hassan, P., Anderson, J.S., y Mottram, J. (1998) The crk3 gene of Leishmania mexicana encodes a stage-regulated cdc2-related histone H1 kinase that associates with p12cks1. *J. Biol. Chem.*, **273**:10153-10159

  Hajduk, S. y Sabatini, R. (1996) RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. En: editores Smith, D. y Parsons, M. Molecular Biology of Parasitic Protozoa. IRL Press, pag. 75-87.
- Hannon, G.J. y Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371 257-61.
- Hartwell, L. (1995) Introduction to cell cycle controls. En: editores Hutchinson C. y Glover, M. Cell Cycle Control. IRL Press, pag. 1-13.
- Hayles, J Beach, D., Durkacz, B., y Nurse, P. (1986) The fission yeast cell cycle control gene cdc2: isolation of a sequence suc1 that suppresses cdc2 mutant function. *Mol. Gen. Genet.*, **202**:291.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A. y Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol.*, 15:2672-81.
- Hoare, C. A. (1972) Blackwell Scientific Publications. Oxford y Edinburgh, **88**:60-80.
- Hua S., Mutomba, M. y Wang, C. (1997) Regulated expression of cyclin-1 during differentiation of Trypanosoma brucei from bloostream form to procyclic form. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **84**:255-258.
- Huang, D., Moffat, J., Wilson, W.A., Moore, L., Cheng, C., Roach, P.J. y Andrews, B. (1998) Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity in vitro and in vivo: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. *Mol Cell Biol.*, **18**:3289-99.
- Izumi, T. y Maller, J.L. (1993) Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell.*, 4:1337-50.
- Johnson, R. T. y Rao, P. N. (1970) Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, **226**: 717.

- Keyomarsi, K. y Pardee, A.B. (1993) Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(3):1112-6.
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J-M. y Kirschner, M. W. (1996) How Proteolisis Drives the Cell Cycle. *Science*, **274**:1652.
- Kishimoto, T., Kuriyama, R., Kondo, H., y Kanatani, H. (1982) Generality of the action of various maturation-promoting factors. *Exp. Cell Res.*, **137**: 121.
- Knapp, D., Bhoite, L., Stillman, D.J. y Nasmyth, K. (1996) The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. *Mol Cell Biol.*, **16**:5701-7.
- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. y Nasmyth, K. (1993) A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science*, **261**:1551-7.
- Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G. y Jr, Livingston DM. (1994) Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*, **78**:161-72.
- Kuhne, C. y Linder, P. (1993) A new pair of B-type cyclins from Saccharomyces cerevisiae that function early in the cell cycle. *EMBO J.*, **12**:3437-47.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (259):680-5.
- Laird, P. W. (1989) Trans splicing in trypanosomes--archaism or adaptation? *Trends Genet.*, **5**:204-8. Review
- Lee, M. G. y Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, **327**: 31.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I. y Massague, J. (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.*, **9**:639-49.
- Lew, D.J y Reed, S. I. (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.*, **120**:1305-20.
- Lim, H.H., Loy, C.J., Zaman, S. y Surana, U. (1996) Dephosphorylation of threonine 169 of Cdc28 is not required for exit from mitosis but may be necessary for start in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.*, **16**:4573.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., y Maller, J. L. (1988) Purification od maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:3009.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. y Beach, D. (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, **64**:1111-22.
- Mäkelä, T.P. , Tassan, J.P. , Nigg, E.A. , Frutiger, S. , Hughes, G.J. and Weinberg, R.A. (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, **371**: 254-257.
- Marahrens, Y. y Stillman, B. (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, **255**(5046):817-23.
- Masui, Y. y Markert, C. L. (1971) Cytoplasmatic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool., **177**:129.
- Meijer, L. (1996) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Cell Biology*, 6:393-397.
- Mendenhall, M. D. (1993) An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **259**:216-219.

- Millar, J.B., Russell, P., Dixon, J.E. y Guan, K.L. (1992) Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast. *EMBO J.*, **11**:4943-52.
- Moreno, S., Nurse, P. y Russell, P. (1990) Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. Nature, **344**:549-52.

  Mottram, J. C. y Smith, G. (1995) A family of trypanosome cdc2-related protein kinases. *Gene*. **162**:147-152
- Mottram, J. C., Kinnaird, J. H., Shiels, B., Tait, A. y Barry, D. (1993) A novel CDC2-related protein kinase from Leishmania mexicana LmmCRL1, is post-translationally regulated during the life cycle. *J. Biol. Chem.*, **268**:21044-21052
- Mottram, J., McCready, Ph., Brown, K., y Grant, K. (1996) Gene disruption indicate an essential function for the LmmCRK1 cdc2-related kinase of Leishmania mexicana. *Mol. Microbiol.*, **22**:573-582
- Nasmyth, K. (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.*, **12**:405-12. Review.
- Nelkin, B., Nichols, C., y Vogelstein, B. (1980) Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBBS Lett.*, **109**:233.

  Nurse, P. y Bissett, Y. (1981) Genes required for G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, **292**:558.
- O Neill, E. M., Kaffman, A., Emmitt, R. J. y O'Shea, E. (1996) Regulation of PHO4 Nuclear Localization by the PHO80-PHO85 Cyclin-CDK Complex. *Science*, **271**:209-212.
- Oehlen, L.J. y Cross, F.R. (1994) G1 cyclins CLN1 and CLN2 repress the mating factor response pathway at Start in the yeast cell cycle. *Genes Dev.*, **8**(9):1058-70.

  Ogas, J., Andrews, B., y Herskowitz, I. (1991) Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell*, **66**:1015.
- Ohtsubo, M. y Roberts, J.M. (1993) Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*, **259**:1908-12.

  Okuda, T., Cleveland, J.L. y Downing, J.R. (1992) PCTAIRE-1 and PCTAIRE-3, two members of a novel cdc2/CDC28-related protein kinase gene family. *Oncogene*. **7**(11):2249-58.
- OMS, Organización Mundial de la Saluda. (1991) Control de la enfermedad de Chagas, Serie de informes técnicos, 811.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. y Draetta, G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.*, **11**:961-71.
- Pays, E., Coquelet, H., Pays, A., Tebabi, P. y Steinert, M. (1989) *Trypanosoma brucei*: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site. *Mol. Cell. Biol.*, 9:4018

  Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C. y Nigg, E.A. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, **61**:591-602.
- Piatti, S., Bohm, T., Cocker, J.H., Diffley, J.F. y Nasmyth, K. (1996) Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev.*, **10**:1516-31.
- Pines, J. y Hunter, T. (1995) Cyclin-dependent kinases: an embarrassment of riches? En: editores Hutchinson C. y Glover, M. Cell Cycle Control. IRL Press, pag. 144-176.

Poon R Y C Hunter, T. (1995) Innocent bystanders or chosen collaborators? *Curr. Biol.*, 5(11):1243.

- Rao, P. N. y Johnson, R. T. (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*, **225**: 159.
- Reynisdottir, I , Polyak, K., Iavarone, A. y Massague, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.*, 9:1831-45.
- Richardson, H. E., Wittenberg, C., Cross, F. y Reed, S. I. (1989) An essential G1 function for cuclin-like proteins in yeast. *Cell.* **59**:1127.
- Richardson, H., Stueland, C.S., Thomas, J., Russell, P. y Reed, S.I. (1990) Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.*, **4**:1332-44.
- Roskoski, R. Jr. (1983) Assays of protein kinase. *Meth. Enzymology*, 99:3-6.
- Ross-MacDonald, R., Graesser, R., Kappes, B., Franklin, R. y Williamson, D.H. (1994) Isolation and expression of a gene specifying a cdc2-like protein kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum. Eur. J. Biochem.*, 220:693-701.
- Rush, H. P, Sachsenmaier, W., Behrens, K., y Gruter, V. (1966) Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of Physarum polycephalum. *J. Cell Biol.*, **31**: 204.

Sanger, F and Coulson, A.R. (1975). A rapid methos for determining sequences in SNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **94:** 441-448.

- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M.D. y Nasmyth, K. (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae. Cell*,**79**(2):233-44.
- Schwob. E. y Nasmyth, K. (1993) CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev.*, 7:1160-75.
- Serrano, M., Hannon, G.J. y Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature*, **366**:704.
- Shimizu, A., Nishida, J., Ueoka, Y., Kato, K., Hachiya, T., Kuriaki, Y. y Wake, N. (1998) CyclinG contributes to G2/M arrest of cells in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.*, 242 529-33.
- Simanis, V. y Nurse, P. (1986) The cell cycle control gene cdc2+ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phospholylation. *Cell.* **45**:261.
- Sladeczek, F., Camonis, J.H., Burnol, A.F., y Le Bouffant, F. (1997) The Cdk-like protein PCTAIRE-1 from mouse brain associates with p11 and 14-3-3 proteins. *Mol Gen Genet.*, 254(5):571-7.
- Solomon, M.J., Harper, J.W. y Shuttleworth, J. (1993) CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO J.*, **12**:3133-42.
- Stillman, B. (1996) Cell Cycle Control of DNA Replication. *Science*, **274**:1659. Review.
- Sunkara, P. S., Wright, D. A., y Rao, P. N. (1979) Mitotic factors from mammakian cells induce germinal vesicle breakdoen and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **76**:2799.
- Sutton, A. y Freiman, R. (1997) The Cak1p protein kinase is required at G1/S and G2/M in the budding yeast cell cycle. *Genetics*, **147**:57-71.
- Sweder, K.S., Rhode, P.R., y Campbell, J.L. (1988) Purification and characterization of proteins that bind to yeast ARSs. *J Biol Chem.*, **263**:17270-7.

- Swindle, J. y Tait, A.(1996) Tripanosomatid genetics. En: editores Smith, D. y Parsons, M. Molecular Biology of Parasitic Protozoa. IRL Press, pag. 6-34.
- Tanaka, T., Knapp, D. y Nasmyth, K. (1997) Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell*, **90**:649-60.
- TDR, Tropical Disease Report, World Health Organization (1997).
- Toyn, J.H., Johnson, A.L., Donovan, J.D., Toone, W.M. y Johnston, L.H. (1997) The Swi5 transcription factor of Saccharomyces cerevisiae has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics*, **145**:85-96.
- Toyoshima, H. y Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**:67-74.
- Tsai, L.H., Harlow, E. y Meyerson, M. (1991) Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*, **353**:174-7.
- Tyers, M., Tokiwa, G. y Futcher, B. (1993) Comparison of the Saccharomyces cerevisiae G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.*, 5:1955-68
- Ullu, E., Tschudi, C. y Gunzl, A. (1996) Trans-splicing in tripanosomatid protozoa. En: editores Smith, D. y Parsons, M. Molecular Biology of Parasitic Protozoa. IRL Press, pag. 115-133.
- Vanhamme, L. y Pays, E. (1995) Control of Gene Expression in Trypanosomes. *Microbiological Reviews*, June, p.223-240.
- Vassella, E., Braun, R. y Roditi, I. (1994) Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nucleic Acids Res.*, 22:1358.
- Verde, F., Dogterom, M., Stelzer, E., Karsenti, E. y Leibler, S. (1992) Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in Xenopus egg extracts. *J Cell Biol.*, **118**:1097-108.
- Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G. y Deshaies, R.J. (1997) Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*, **278**(5337):455-60.
- Vojtek, A., Hollenberg, S.M., y Cooper, J. (1993) Mammalian Ras Interacts Directly with the Serine/Threonine Kinase Raf. *Cell*, **74**: 205-214.
- Wang, Y., Dimitrov, K., Garrity, L., Sazer, S. y Beverley, S. (1998) Stage-specific activity of the *Leishmania major* CRK3 kinase and functional rescue of a *Schizosaccharomyces pombe* cdc2 mutant. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **96**:139-150
- Wasserman, W. J. y Smith, L. D. (1978) The cyclic behaviour of a cytoplasmatic factol controlling nuclear membrane breakdown. *J. Cell. Biol.*, **78**: R15.
- Wittemberg, C., Sugimoto, K. y Reed, S. (1990) G1-specific cyclins of S. cerevisiae: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromones, and association with the $p34^{CDC28}$ protein kinase. *Cell*, **62**:225.
- Wu, L. y Russell, P. (1993) Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature*, **363**:738-41.
- Yankulov, K.Y. y Bentley, D.L. (1997) Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH. *EMBO J.*, **16**(7):1638-46
- Zachariae W, Shin TH, Galova M, Obermaier B, Nasmyth K (1996) Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of Saccharomyces cerevisiae. *Science*, **274**:1201-4.

- Zeng, Y., Forbes, K.C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnica-Worms, H. y Enoch, T. (1998) Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature*, **395**:507-10.

Lic. Eliana B. Gómez
Tesista.

Dra. María Teresa Téllez-Iñón.
Directora de Tesis.