

Tesis de Posgrado

Detección de actividad de telomerasa en distintos trypanosomátidos : Caracterización bioquímica y clonado de los genes (subunidad catalítica y ARN) de la telomerasa de *Trypanosoma cruzi*

Muñoz, Denise Paula

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Muñoz, Denise Paula. (2001). Detección de actividad de telomerasa en distintos trypanosomátidos : Caracterización bioquímica y clonado de los genes (subunidad catalítica y ARN) de la telomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3381_Munoz.pdf

Cita tipo Chicago:

Muñoz, Denise Paula. "Detección de actividad de telomerasa en distintos trypanosomátidos : Caracterización bioquímica y clonado de los genes (subunidad catalítica y ARN) de la telomerasa de *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3381_Munoz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



TESIS
CS.Biológicas
3381
MUNOZ
DENISE PAULA

DE BUENOS AIRES

Biblioteca FCEyN - UBA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES

Detección de actividad de telomerasa en distintos
trypanosomátidos. Caracterización bioquímica y clonado de
los genes (subunidad catalítica y ARN) de la telomerasa de
Trypanosoma cruzi

TESISTA: Lic. Denise Paula Muñoz

DIRECTOR: Dr. Alberto Baldi

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

Año 2001

3381

RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN.....	9
TELÓMEROS.....	9
<i>Definición</i>	<i>9</i>
<i>Función y arquitectura.....</i>	<i>10</i>
<i>Localización nuclear</i>	<i>12</i>
ADN TELOMÉRICO.....	14
<i>Secuencia telomérica.....</i>	<i>14</i>
<i>Longitud</i>	<i>16</i>
<i>Proteínas asociadas a los telómeros.....</i>	<i>18</i>
<i>Estructura: “t-loops” (Lazos t).....</i>	<i>20</i>
PROBLEMA ASOCIADO A LA REPLICACIÓN TELOMÉRICA.....	23
<i>Acortamiento telomérico</i>	<i>23</i>
<i>Hipótesis de reloj mitótico.....</i>	<i>25</i>
<i>Mecanismos de replicación teloméricos</i>	<i>28</i>
TELOMERASA.....	28
<i>Función</i>	<i>28</i>
<i>Subunidad catalítica o TERT (telomerase reverse transcriptase).....</i>	<i>30</i>
<i>ARN o TR (Telomerase RNA)</i>	<i>33</i>
<i>Peso molecular aparente de los complejos de la telomerasa</i>	<i>37</i>
<i>Proteínas asociadas a la telomerasa</i>	<i>37</i>
CARACTERÍSTICAS ENZIMÁTICAS DE LA TELOMERASA.....	41
<i>Sustratos de ADN y nucleótidos (in vivo e in vitro).....</i>	<i>41</i>
<i>Sitio de anclaje o “anchor site” y clivaje endonucleolítico</i>	<i>43</i>
<i>Procesividad.....</i>	<i>44</i>
CÉLULAS HUMANAS QUE POSEEN ACTIVIDAD DE TELOMERASA.....	45
<i>Tejidos con alta capacidad replicativa.....</i>	<i>45</i>
<i>Tumores y líneas celulares.....</i>	<i>46</i>
<i>Regulación de la actividad de telomerasa</i>	<i>48</i>
SENESCENCIA Y CRISIS (CÉLULAS TELOMERASA POSITIVAS Y CÉLULAS ALT).....	51
INHIBICIÓN DE LA TELOMERASA	53
ORGANISMOS “KNOCK-OUT” DE TELOMERASA.....	54
PAPEL DEL ACORTAMIENTO TELOMÉRICO COMO MECANISMO PROTECTOR DE FORMACIÓN DE TUMORES.....	56

CÓMO LOGRAR LA INMORTALIDAD CELULAR	57
LA INMORTALIDAD DE LOS ORGANISMOS UNICELULARES	58
KINETOPLASTIDOS	59
<i>Características</i>	59
<i>Familia Trypanosomatidae</i>	60
TRYPANOSOMA CRUZI	60
<i>Formas de desarrollo</i>	60
<i>Hospedadores</i>	62
<i>Ciclo de vida y vías de infección</i>	62
<i>Epidemiología</i>	64
<i>Características de la enfermedad de Chagas</i>	64
<i>Drogas utilizadas en la infección con T.cruzi</i>	66
CARACTERÍSTICAS GENÓMICAS DE LOS TRYPANOSOMAS	68
<i>Cromatina y cariotipo</i>	68
<i>Secuencia telomérica y telómeros</i>	69
OBJETIVOS	73
MATERIALES Y MÉTODOS	75
<i>Cepas de parásitos y condiciones de cultivo</i>	75
<i>Extractos celulares</i>	75
<i>Extracto nuclear</i>	76
<i>Determinación de actividad de la telomerasa por el ensayo de TRAP</i>	76
<i>Determinación de actividad de la telomerasa por el método de extensión de primer (PE)</i>	77
PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA TELOMERASA Y ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR APARENTE DEL COMPLEJO RIBONUCLEOPROTEICO	78
<i>Columnas de intercambio iónico</i>	78
<i>Columna de afinidad</i>	79
<i>Columna de afinidad (oligonucleótido biotinilado)</i>	79
<i>Columna de interacción hidrofóbica</i>	80
<i>Gradientes de Glicerol</i>	80
<i>Filtración en gel (Superosa 6)</i>	80
DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL TELÓMERO EN DISTINTOS TRYPANOSOMÁTIDOS	80
ENSAYOS DE RETARDO EN GELLES (EMSA)	81
CLONADO DEL GEN CODIFICANTE DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA TELOMERASA	81
PREPARACIONES DE ARN	81
<i>Síntesis de ADNc</i>	82

<i>Ensayos de PCR</i>	82
<i>Oligonucleótidos</i>	82
<i>Clonado de los productos de PCR</i>	83
IDENTIFICACIÓN Y CLONADO DEL ARN DE LA TELOMERASA.....	83
<i>Preparaciones de ARN</i>	83
<i>Northern-blots</i>	83
<i>Síntesis de la primera hebra del ADNc</i>	84
<i>Agregado de nucleótidos en el extremo 3' de los ARNs con las enzimas poli A polimerasa y nucleotidil terminal transferasa (TdT)</i>	84
<i>Eliminación del grupo fosfato del 5' de los ARNs</i>	85
<i>Fosforilación del extremo 5' de los ARNs</i>	85
<i>Tratamiento de los ARNs con ARNasa H</i>	85
<i>Ligación de un oligonucleótido al extremo 3' de ácidos nucleicos de simple cadena</i>	85
ENSAYOS DE CROSS-LINKING EN PRESENCIA DE PSORALENO.....	86
INMUNOPRECIPITACIÓN.....	86
RESULTADOS	88
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	88
<i>Detección de la actividad de telomerasa en kinetoplastidos relacionados</i>	88
<i>Detección de la actividad de telomerasa en el ciclo de vida de T. cruzi</i>	91
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA TELOMERASA DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	92
<i>Actividad nucleolítica de la telomerasa de T. cruzi</i>	99
SECUENCIA DEL TEMPLADO EN EL ARN DE LA TELOMERASA Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA POR COLUMNA DE AFINIDAD.....	101
PESO MOLECULAR APARENTE DEL COMPLEJO DE LA TELOMERASA DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	105
ENSAYOS DE RETARDO EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON OLIGONUCLEÓTIPO TELOMÉRICO.....	107
DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA TELOMÉRICA DE DISTINTOS KINETOPLÁSTIDOS.....	108
CLONADO DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA TELOMERASA DE TRYPANOSOMÁTIDOS.....	110
<i>Material y oligonucleótidos utilizados para la síntesis de ADNc</i>	112
<i>PCRs</i>	112
CLONADO DEL ARN DE LA TELOMERASA.....	114
CROSSLINKING DEL ARN A LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA TELOMERASA DE <i>T. CRUZI</i>	122
ASOCIACIÓN DE LA TELOMERASA DE <i>T. CRUZI</i> CON LA PROTEÍNA LA.....	124
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	126
REFERENCIAS	136

Resumen

Los trypanosomátidos son organismos que pueden causar serias enfermedades de gran impacto en la salud mundial. Desafortunadamente la terapéutica actual muestra relativa eficacia con significativos efectos colaterales. Es por esto que es necesario incrementar el conocimiento de la biología de estos parásitos con el propósito de desarrollar terapéuticas racionales más específicas tendientes a reducir o eliminar la proliferación de los mismos en el ser humano infectado. En organismos de reciente divergencia se ha demostrado que el mantenimiento de la longitud telomérica es un requisito esencial para la viabilidad celular a corto y largo plazo. El mecanismo más distribuido a lo largo de la evolución para tal fin es la telomerasa. En este trabajo demostramos que varios kinetoplástidos relacionados poseen actividad de telomerasa, lo cual sugiere que desde muy temprano en la evolución la telomerasa ha surgido como un mecanismo casi universal para el mantenimiento de los telómeros en organismos eucarióticos. Hemos caracterizado bioquímicamente a la enzima de *Trypanosoma cruzi*, demostrando que la actividad de la misma está presente en los cuatro estadios del ciclo de vida de este parásito, tanto en extractos citoplasmáticos como nucleares de la forma epimastigote y que la combinación de las características de esta enzima son únicas en comparación con las descritas para otras telomerasas. El peso molecular aparente de la telomerasa de *T. cruzi* es superior a 670 kDa. En contraste con lo que sucede con otras telomerasas, la enzima de este parásito interactúa principalmente con sus sustratos por hibridización con el templado en la molécula de ARN con un irrelevante papel desempeñado por el/los sitio/s de anclaje en esta función. Esta enzima posee también una

especificidad de sustratos y una permutación del templado que son únicas. A pesar de que las telomerasas de *T. cruzi* y la humana sintetizan la misma repetición telomérica, las mismas difieren en la procesividad, en la regulación por dGTP, en la especificidad de sustratos y en la permutación del templado presente en sus moléculas de ARN. El presente estudio es el primero en caracterizar bioquímicamente a la telomerasa de un organismo patógeno para el hombre en todo su ciclo de vida y el mismo extiende los conocimientos de la enzimología de las telomerasas a eucariotas de temprana divergencia. Estos resultados podrían contribuir en un futuro al diseño de nuevos agentes terapéuticos orientados a inhibir específicamente a la enzima del parásito con la consecuente reducción de los efectos colaterales.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
ADP/ATP: adenosina di/tri fosfato
ALT: mecanismo alternativo de mantenimiento de telómeros (alternative lengthening of telomeres)
AMT: 4-aminometiltioxaleno
ARN polII/III: ARN polimerasa II/III
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosomal
ARNt: ARN de transferencia
AU: unidades de absorbancia
b: bases
BSA: seroalbúmina bovina
CIP: fosfatasa alcalina
CHAPS: 3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propano-sulfonato
dATP: deoxiadenosina trifosfato
dGTP: deoxiguanosina trifosfato
dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato
DSB: ruptura de ADN doble cadena (double strand break)
DTT: ditioneitol
E-64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4 guanidino)-butano
EDTA: etiléndiaminotetra-acetato de sodio
EGTA: etilénglicol-bis(β -aminoetil éter) N, N, N', N' tetracetato de sodio.
EMSA: ensayos de retardo en geles (electrophoresis mobility shift assay)
FDA: Food and Drug Administration
K/pb: kilo/pares de bases
kDA: kilo Daltons
LPA: poliacrilamida lineal (linear polyacrylamide)
NHEJ: unión de extremos por recombinación no homóloga
NP-40: Nonidet P-40
nt/s: nucleótido/s
PBS: buffer fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PE: extensión de oligonucleótido (primer extension)
PGFE: electroforesis en geles de campo pulsado (pulse field gel electrophoresis)
PKC: proteína quinasa C
PMSF: fluoruro de p-fenilmetilsulfonilo
RNP: ribonucleoproteína o complejo ribonucleoproteico

SnARNs: pequeños ARNs nucleares
SnoARNs: pequeños ARNs nucleolares
SnoRNPs: pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares
SnRNPs: pequeñas ribonucleoproteínas nucleares
SPB: centrosoma en levaduras (spindle pole body)
SSB: proteína de unión a ADN de simple cadena (single strand DNA binding protein)
TdT: nucleotidil transferasa terminal
TERT: subunidad catalítica de la telomerasa (telomerase reverse transcriptase)
TPE: efecto de posición telomérica (telomeric position effect)
TR: ARN de la telomerasa (telomerase RNA)
TRAP: protocolo de medición de actividad de telomerasa (telomeric repeat amplification protocol)
TTP: timidina trifosfato
UV: luz ultravioleta
VSG: glicoproteínas de superficie de *T. brucei* (Variant Surface Glycoproteins)

Introducción

Telómeros

Definición

Todos los cromosomas lineales, tanto eucarióticos (nucleares y mitocondriales) como procarióticos, poseen en sus extremos una estructura característica llamada telómero (Figura 1) (Casjens et al., 1997; Tomaska et al., 1997). Los telómeros resultan esenciales para la estabilidad y la correcta segregación cromosómica en la división celular. La necesidad del mantenimiento de la integridad telomérica fue establecida hace ya más de 50 años en los trabajos de Hermann Muller y Bárbara McClintock, los cuales notaron que los cromosomas que habían perdido uno de sus extremos eran altamente inestables (McClintock, 1941; Muller, 1938).



Figura 1: Esquema de un cromosoma lineal.

Desde esa fecha en adelante, varios estudios establecieron que la pérdida de alguno de los telómeros lleva a la fusión cromosómica, ya sea entre dos cromosomas distintos o entre cromátidas hermanas. Esto da lugar a cromosomas dicéntricos, los cuales sufren sucesivos ciclos de ruptura y fusión y eventualmente se pierden en las posteriores divisiones celulares (Counter et al., 1992; Sandell and Zakian, 1993). De esto se desprende, que

los cromosomas que han perdido alguno de sus dos telómeros sólo serán mantenidos si son “reparados” con el agregado de un nuevo telómero, proceso conocido como “chromosome healing”. Un ejemplo de la importancia de los telómeros para el mantenimiento de ADN lineal proviene de experimentos realizados en distintos organismos, en los cuales se introdujeron fragmentos lineales de ADN con telómeros de la misma especie o de otra y sólo aquellos que poseían los telómeros de secuencia correcta fueron mantenidos con muy alta eficiencia dentro de la célula. Estos experimentos preliminares sentaron las bases para la creación de cromosomas artificiales (Javerzat et al., 1993).

Función y arquitectura

La función de cobertura o “capping” que poseen los telómeros es llevada a cabo mediante dos mecanismos. Por un lado el ADN telomérico está asociado a distintas proteínas que lo recubren y lo protegen de la degradación por exonucleasas, proveyéndoles una estructura particular que impide que los mecanismos celulares que sensan daño en el ADN no reconozcan a estos extremos como si fuesen los que se originan a partir de rupturas de ADN doble cadena (double strand breaks: DSBs). Por otro lado, es sabido que el mecanismo de replicación de moléculas lineales de ADN resulta en la pérdida de cierta cantidad de bases en el extremo de la hebra de síntesis discontinua. Como describiré mejor más adelante, el ADN telomérico está formado por varias kilobases de secuencias repetitivas cortas. Se ha propuesto que estas repeticiones están estratégicamente ubicadas en los extremos cromosómicos, de modo que la pérdida de parte de las mismas no sea problemático y sean preservadas de esta manera las secuencias que son esenciales para la célula.

Los telómeros también están involucrados en la correcta segregación de los cromosomas en mitosis, y en el apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos en meiosis (Dandjinou et al., 1999; de Lange, 1998). En un estudio realizado en el protozoo ciliado *Tetrahymena* se observó que si la secuencia telomérica es cambiada, las cromátidas hermanas no se separan a pesar de que el resto de la célula continúa con el ciclo celular. Observadas al microscopio estas células poseen un volumen mayor que las normales y este agrandamiento siempre es acompañado de una gran elongación del núcleo, lo cual sugiere que la división fue bloqueada en la anafase de la mitosis. Finalmente, transcurridos pocos ciclos adicionales, las células dejan de dividirse (Kirk et al., 1997).

En el año 1998 dos grupos trabajando con *Schizosaccharomyces pombe* establecieron que los telómeros de este organismo están involucrados en el apareamiento de los cromosomas homólogos. Durante la interfase los telómeros de estas células permanecen agrupados y con una posición perinuclear y los centrómeros están asociados a lo que en levaduras se llama el “spindle pole body” (SPB) que es el centro organizador de microtúbulos y se encuentra embebido en la envoltura nuclear (Gotta et al., 1996). En cambio, cuando estas células en estado haploide son estimuladas a aparearse (conjugación), los telómeros pasan a tener la localización previa de los centrómeros y por lo tanto se agrupan en el polo del núcleo donde se encuentra el SPB (Figura 2). Una vez producida la fusión nuclear (cariogamia), comienzan a sucederse una serie de movimientos nucleares liderados por el SPB, que duran exactamente lo que los cromosomas tardan en aparearse y recombinar. Los cromosomas son enganchados a esta estructura vía sus telómeros y el resto de los mismos está ubicado por detrás formando lo que se llama estructura de cola de caballo o “horsetail” (Figura 2). Parece ser que este movimiento es el

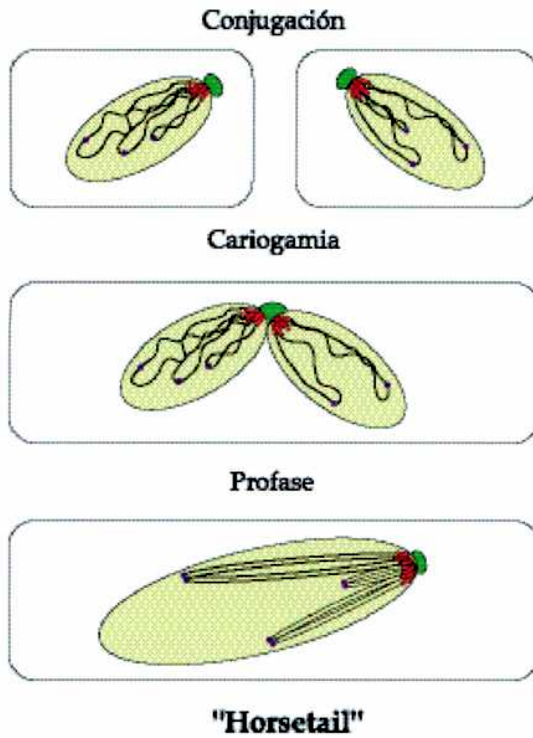
que permite que los cromosomas se orienten y que sus secuencias homólogas se posicionen lo suficientemente cerca como para que haya recombinación. Se observó que cepas mutantes, las cuales no pueden enganchar sus telómeros al SPB, tienen una alta producción (más del 90%) de esporas no viables, probablemente por una incorrecta segregación cromosómica durante la meiosis I, y tienen también una reducción considerable en la recombinación entre cromosomas homólogos (Cooper et al., 1998; Nimmo et al., 1998). El arreglo telomérico que presentan las células de mamíferos y de plantas en meiosis es similar al descrito en levaduras. Hace muchos años, los primeros citólogos observaron que en profase meiótica los telómeros se agrupaban en un polo del núcleo con los brazos cromosómicos plegados hacia atrás formando una estructura llamada “bouquet” (Figura 2). Posteriormente, se estableció que este arreglo aparece previo a la formación del complejo sinaptonémico y que temporalmente coincide con el momento en que los cromosomas homólogos se aparean y recombinan (Bass et al., 1997). Aunque faltan más estudios, estos datos sugieren que los arreglos teloméricos observados y el papel cumplido por los telómeros en la recombinación sería similar en células de mamíferos, de plantas o levaduras.

Localización nuclear

Durante muchos años se ha tratado de establecer si existe asociación de los telómeros a alguna subestructura nuclear. El grupo de Titia de Lange demostró que en células somáticas de mamíferos los telómeros están asociados a la matriz nuclear y distribuidos de manera dispersa por todo el núcleo. Esta interacción se establece en varios puntos a lo largo de los telómeros y es mediada por una proteína llamada TRF1 (de Lange, 1992;

Luderus et al., 1996). En cambio en células germinales, se estableció que durante la oogénesis o la espermatogénesis en distintas especies, los telómeros migran hacia la superficie nuclear donde no sólo se asocian entre sí sino que también se asocian con la envoltura nuclear y permanecen en esta conformación en las células haploides maduras (Gineitis et al., 2000; Podgornaya et al., 2000). No se conocen muy bien todavía, cuáles son los mecanismos y las proteínas involucradas en estos arreglos y por lo que se sabe hasta el momento, se desprende que los mismos varían entre distintos organismos y también entre diversos tipos celulares dentro de un mismo organismo.

Levaduras que se dividen por fisión binaria



Apareamiento de cromosomas homólogos

Meiosis I + II

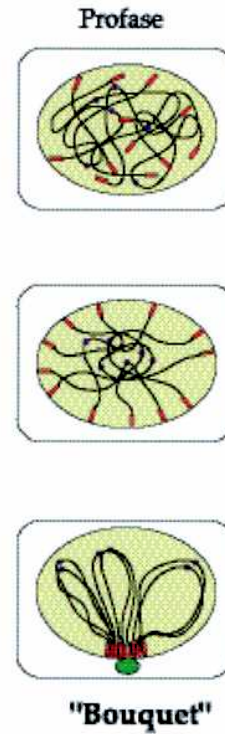
4 esporas haploides

 Spindle Pole Body/
Centrosoma

 Telómeros

 Centrómicos

Mamíferos y plantas



Apareamiento de cromosomas homólogos

Meiosis I + II

Gametas

Figura 2: Asociación de los telómeros y apareamiento de los cromosomas homólogos, en levaduras que se dividen por fisión binaria y en células de mamíferos y plantas.

ADN telomérico

Secuencia telomérica

Los telómeros están compuestos por ADN repetitivo y proteínas asociadas (Zakian, 1995). Normalmente las repeticiones teloméricas eucarióticas poseen entre 6 y 25 nucleótidos y se caracterizan por ser ricas

en guanina en la hebra orientada 5'-3'. Como se muestra en la Tabla 1, esta secuencia está bastante conservada a través de la evolución, dado que es la misma en organismos altamente divergentes como los vertebrados (Meyne et al., 1989; Moyzis et al., 1988) y los trypanosomátidos (Blackburn and Challoner, 1984)|la presente tesis| y es muy similar a lo largo de la escala evolutiva.

	Organismo	Secuencia telomérica 5' ---- 3'	Referencia
	Giardia	GGGTA	(Adam et al., 1991)
Trypanosomátidos	Trypanosoma brucei Trypanosoma cruzi	GGGTTA	(Blackburn and Challoner, 1984) y este trabajo
	Plasmodium	GGGT(C/T)A	(Bottius et al., 1998)
Ciliados	<i>Tetrahymena</i>	GGGGTT	(Sheng et al., 1995)
	<i>Oxytricha</i>	GGGGTTTT	(Gupta et al., 1993)
	<i>Paramecium</i>	GGG(G/T)TT	(McCormick-Graham et al., 1997)
Hongos	<i>Botrytis cinerea</i>	GGGTTA	(Levis et al., 1997)
Levaduras	<i>S. cerevisiae</i>	G _{1,3} T	(Cohn et al., 1998)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	TGATTAGGTATGTGG TGTACGGATT	"
	<i>S. pombe</i>	G _{2,5} TTAC	"
	<i>Candida albicans</i>	TCTAACTTCTTGGTG TACGGATG	"
Nematodos	<i>C. elegans</i>	GGCTTA	(Wicky et al., 1996)
Platelmintos	<i>Planaria</i>	GGGTTA	(Joffe et al., 1998)
Insectos		GGTTA	(Sasaki and Fujiwara, 2000)
Vertebrados		GGGTTA	(Meyne et al., 1989)

Plantas	<i>Arabidopsis</i>	GGGTTTA	(Richards and Ausubel, 1988)
---------	--------------------	---------	------------------------------

Tabla 1: Secuencia telomérica en distintos organismos a lo largo de la escala evolutiva.

Longitud

El ADN telomérico está compuesto por una región de doble cadena y un extremo 3' de ADN simple cadena (overhang), ambas formadas por las repeticiones teloméricas descritas más arriba (Figura 3). Tanto la región de doble cadena como la de simple cadena, varían en longitud en los distintos organismos. En la Tabla 2 se describe la longitud de los telómeros de algunos organismos típicos.

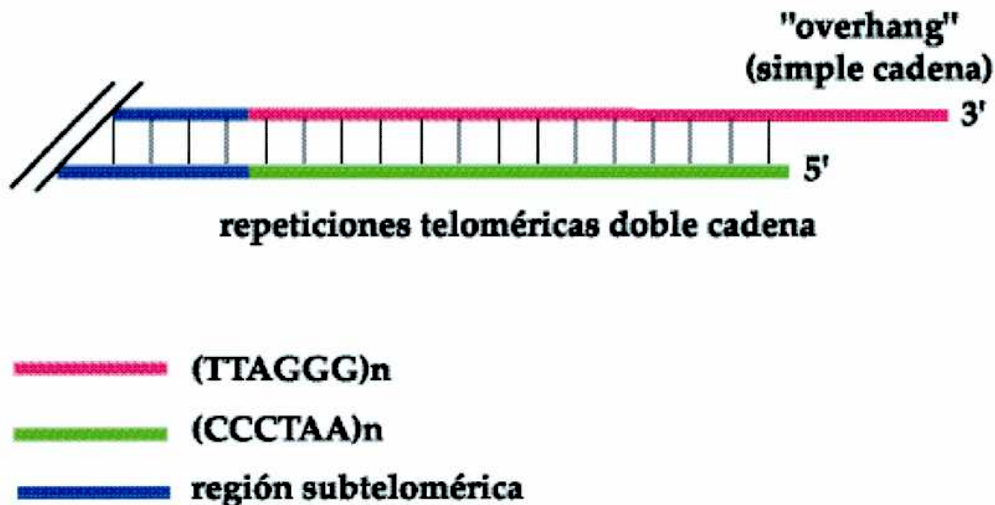


Figura 3: Esquema de la estructura de un telómero típico.

Organismo	Longitud del 3' overhang	Referencia	Longitud de la región doble cadena	Referencia
humanos	150-300 b	(Huffman et al., 2000; Makarov et al., 1997)	2-30 kb	(van Steensel et al., 1998)
Ratón salvaje (<i>Mus spretus</i>) Algunas cepas de ratones endocriados de laboratorio (<i>Mus musculus</i>)			8- < 20 kb 30-150 kb	(Hemann and Greider, 2000) (Hemann and Greider, 2000; Kipling and Cooke, 1990)
ciliados (macronúcleo)	12-16 b (en los dos extremos)	(Klobutcher et al., 1981)	28 pb	(Klobutcher et al., 1981)
levaduras	> 30 b (en los dos extremos, sólo en fase S tardía)	(Wellinger et al., 1993)	~ 1.3 kb	(Wellinger et al., 1996)
plantas	> 20-30 b (en un extremo)	(Riha et al., 2000)	~2.5 - 4.5 kb a 30-80 kb	(Riha et al., 1998)

Tabla 2: Longitudes de las regiones doble y simple cadena de los telómeros de organismos caraterísticos.

Todavía no se sabe cómo hacen los distintos organismos para regular la longitud telomérica que caracteriza a cada especie. El/los mecanismo/s que rige/n esta regulación parece/n ser muy complejo/s y muy variado/s. Por estudios realizados en organismos simples como las levaduras, se sabe que mutaciones que afectan a distintas proteínas involucradas en diversas funciones como unión a telómeros, replicación del ADN y “checkpoints” celulares, todas afectan la longitud telomérica (Adams and Holm, 1996; Cooper et al., 1997; Nugent et al., 1996).

Proteínas asociadas a los telómeros

El número de proteínas que se encuentran asociadas a los telómeros se incrementa diariamente. Varias son comunes a distintos organismos. Lo sorprendente fue encontrar que muchas de ellas ya se conocían y habían sido previamente descritas como proteínas involucradas en la reparación de rupturas cromosómicas por el mecanismo de unión de extremos (NHEJ: non homologous end-joining).

a) Proteínas de unión a ADN simple cadena. Dado que la región 3' de simple cadena del telómero es una región altamente susceptible de ser degradada por exonucleasas, normalmente se encuentra recubierta de proteínas que la protegen. La primera proteína descrita dentro de esta clase fue el heterodímero ($\alpha\beta$) de *Oxytricha nova* (Gottschling and Zakian, 1986). Hace muy poco se resolvió la estructura cristalográfica del complejo ternario en donde se ve claramente como el extremo 3' del ADN está embebido dentro de la estructura proteica (Horvath et al., 1998). En levaduras existe una proteína llamada Cdc13 que es la que interactúa con muy alta afinidad con el ADN telomérico de simple cadena, aunque para ello no requiere de un extremo 3' (Evans and Lundblad, 1999). Cdc13 y el heterodímero de *Oxytricha* no presentan ningún tipo de homología entre sí, y tampoco se han descrito en mamíferos proteínas homólogas a ninguna de las dos. Haciendo uso de búsqueda de homología de secuencias en bases de datos, el grupo de Cech encontró una proteína en *S. pombe* (Pot1) y otra en humanos (hPot1) con una región homóloga a la subunidad α del heterodímero de *Oxytricha*. Deleciones del gen de esta proteína en levaduras, lleva a una alta inestabilidad cromosómica, pérdida rápida de los telómeros y muerte celular. Las células que sobreviven poseen sus cromosomas circularizados, característica indistinguible que refleja la

pérdida de secuencias teloméricas de los extremos cromosómicos en estas levaduras (Baumann and Cech, 2001; Nakamura et al., 1998). Ambas proteínas expresadas en *Escherichia coli* y purificadas, se unen a ADN simple cadena con la secuencia telomérica respectiva y sólo si ésta se encuentra en la región 3' del ADN. Estas características sumadas a la homología que poseen con el heterodímero de *Oxytricha*, sugieren que estas proteínas estarían directamente involucradas en la protección de los telómeros en estos organismos y que este mecanismo de protección ha sido conservado a lo largo de la evolución.

b) Proteínas de unión a ADN de doble cadena. Las proteínas más importantes que se unen a ADN telomérico de doble cadena descritas hasta el momento (entre otras) son Rap1 (Berman et al., 1986) y Taz1 en levaduras (Cooper et al., 1997) y TRF1 y TRF2 en células de mamíferos (Broccoli et al., 1997). Mientras que Rap1 es la proteína encargada de “contar” las repeticiones teloméricas presentes en los extremos de los cromosomas en levaduras (Marcand et al., 1997), TRF1 y TRF2 están involucradas en la formación de los “t-loops” estructuras teloméricas que describiré más adelante. Taz1 es una proteína homóloga a TRF1/2 pero aún no se ha descrito la presencia de “t-loops” en células de levaduras, por lo tanto no se sabe aún cuál es su función. Todas estas proteínas se caracterizan por poseer uno o dos dominios Myb, los cuales son característicos de proteínas que se unen al ADN y que fueron originalmente descritos en factores de transcripción (Konig and Rhodes, 1997).

c) Otras proteínas asociadas a telómeros. Las proteínas que se encuentran en esta categoría son aquellas que no interactúan directamente con el ADN pero sí lo hacen con las proteínas descritas en las dos secciones anteriores. La mayoría de ellas fueron descubiertas utilizando el método del doble híbrido. Rap1 por ejemplo, interactúa con todo un

complejo de proteínas llamado Sir2/3/4 (Figura 4B) que es el involucrado en el silenciamiento de los genes localizados cerca de los telómeros en células de levaduras (Strahl-Bolsinger et al., 1997). En humanos, TRFI interactúa con Tin2 y con tankyrasa (Kim et al., 1999). Esta última posee un dominio de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP). *In vitro*, tankyrasa es capaz de ADP-ribosilar a TRFI impidiendo de esta manera que se una al ADN telomérico. En base a estos datos se ha postulado que la tankyrasa sería la proteína encargada de regular el acceso de TRFI al telómero mediante la ADP-ribosilación de la misma (Smith et al., 1998). El heterodímero Ku también se encuentra asociado a los telómeros tanto en mamíferos como en levaduras y se ha sugerido que cumple una función protectora, aunque esta no sería su única función (Gravel et al., 1998; Hsu et al., 1999; Polotnianska et al., 1998). Otro complejo proteico que interactúa con TRFI/2 en mamíferos y que está asociado a los telómeros en levaduras, es el compuesto por Rad50/Mre11/Nbs1/Xrs2, proteínas involucradas al igual que Sir2/3/4 y Ku en reparación de DSBs por el mecanismo de NHEJ (Boulton and Jackson, 1998; Mills et al., 1999; Ramsden and Gellert, 1998; Wu et al., 2000; Zhu et al., 2000). Se ha postulado que todos estos complejos a través de distintos mecanismos y por interacción a distintas proteínas y en distintas etapas del ciclo celular, protegen los extremos cromosómicos y regulan la longitud telomérica.

Estructura: “t-loops” (Lazos t)

Aunque eran muy pocas las proteínas descritas hasta el año 1999 que se unían a extremos 3' del ADN para protegerlos, se creía que este era el mecanismo básico por el cual estos extremos eran protegidos de la degradación y ocultados de los mecanismos celulares que sensan el daño al

ADN. En el año 1998, el grupo de Titia de Lange estudiando las proteínas TRF1 y TRF2 que se unen al ADN telomérico de doble cadena, encuentra que cuando expresa en células humanas una versión truncada de la proteína TRF2, que no es capaz de unirse al ADN pero si de dimerizarse con la proteína normal, los telómeros pierden la región telomérica 3' de ADN de simple cadena. Esta pérdida lleva a la fusión cromosómica y la consecuente inducción de apoptosis (van Steensel et al., 1998). Por ensayos de hibridización demuestran que estas fusiones aún poseen la región de ADN telomérico de doble cadena. Concluyen de esta manera, que la presencia de ADN telomérico *per se* no es suficiente para cumplir su función protectora y que TRF2 sería la proteína responsable de impedir que los cromosomas se fusionen *in vivo*. Estudios posteriores del mismo grupo, llevaron a concluir que la manera en la cual TRF2 protege el extremo de los cromosomas está dado por el secuestro de la región de ADN de simple cadena en una estructura particular. Ellos observaron por microscopía electrónica que existe un plegado del telómero de manera que el extremo de simple cadena invade, y de alguna manera desplaza la región telomérica de doble cadena a la cual se va a hibridizar, generándose un lazo llamado "t-loop" (Griffith et al., 1999) (Figura 4A). En este mismo trabajo demuestran que TRF2 purificada es capaz de formar estos "loops" *in vitro*, usando como sustrato ADN telomérico con ambas regiones de ADN de doble y simple cadena. TRF2 se encuentra asociada a esta estructura únicamente en la región de unión entre el ADN de simple cadena y el de doble cadena. Luego, aíslan estos "loops" a partir de cromosomas de ratón y humanos determinando que la longitud de los mismos se correlaciona de manera proporcional con la longitud telomérica característica de cada especie. Más tarde esta misma estructura fue descrita en los cromosomas

politénicos y del micronúcleo del protozoo ciliado *Oxytricha* (Murti and Prescott, 1999).

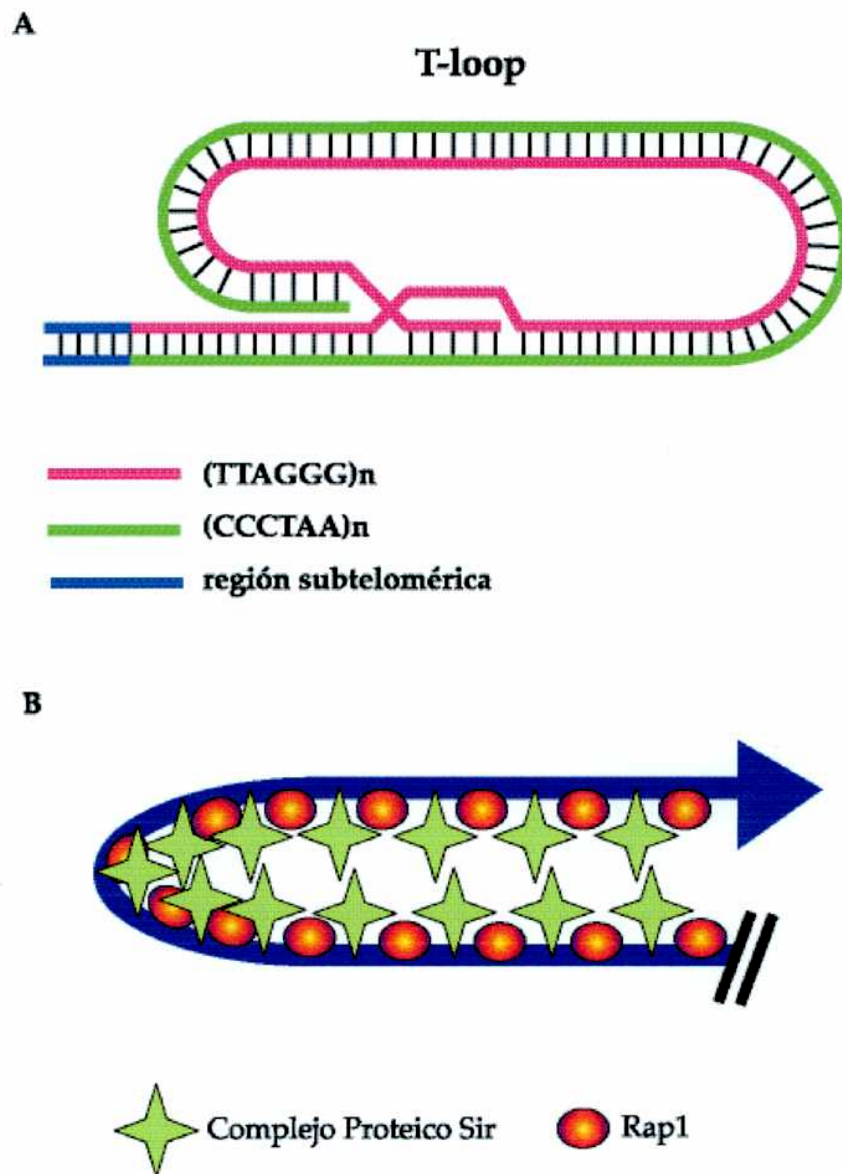


Figura 4: Plegamiento de los telómeros de distintos organismos. A: Esquema de la estructura de los "t-loops" presentes en los telómeros de los mamíferos. B: Esquema del plegamiento presente en los telómeros de levaduras.

Aunque en levaduras aún no se han descrito estos "t-loops", se sabe que los telómeros de estos organismos sufren una especie de plegado

similar, pero en los cuales la región de ADN de doble cadena no es invadida por la de simple cadena. En este caso, la región de repeticiones teloméricas de doble cadena, recubierta por Rap1, se pliega de manera que interactúa con la región subtelomérica (recubierta por el complejo proteico Sir) formando una región heterocromática (Figura 4B). Aunque se ha establecido que esta estructura es la responsable de la represión transcripcional telomérica (o TPE: telomeric position effect) (Strahl-Bolsinger et al., 1997), no se ha demostrado todavía que esté involucrada en la protección de los telómeros. De hecho, es posible revertir la represión de la transcripción en los mismos (la cual conlleva al despliegue de esta región) sin que la estabilidad cromosómica se vea comprometida (Sandell et al., 1994). Sin embargo en el caso de las levaduras donde la recombinación entre telómeros es un mecanismo frecuente (Teng and Zakian, 1999), el plegado y la formación de heterocromatina en esta zona puede de alguna manera impedir que estos eventos de recombinación perjudiciales ocurran.

Problema asociado a la replicación telomérica

Acortamiento telomérico

Es bien sabido que las ADN polimerasas no pueden comenzar la polimerización de una nueva cadena de ADN si carecen de un hidroxilo 3' libre. El mismo es aportado por un iniciador de ARN que posee entre 8 y 12 bases, que posteriormente es degradado. En cada ronda de replicación cuando este iniciador es degradado se pierde una cantidad de ADN telomérico correspondiente a su longitud (Figura 5). Se dedujo así que las

ADN polimerasas son incapaces de replicar completamente los extremos de los cromosomas lineales.

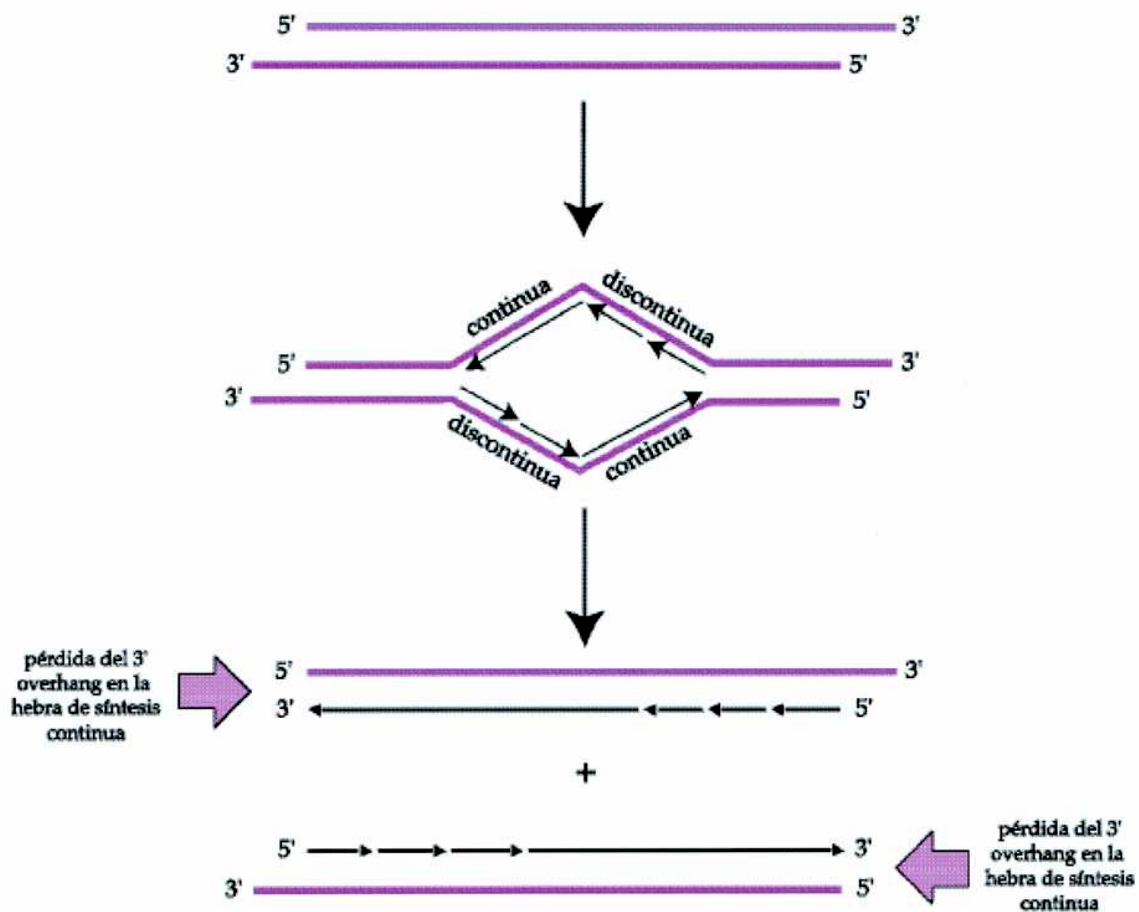


Figura 5: Esquema de la replicación de moléculas lineales de ADN.

El modelo presentado en la Figura 5 predice que los extremos de los cromosomas serían distintos. Un extremo sería romo, mientras que el extremo opuesto poseería la región 3' de simple cadena. Todavía existen discrepancias sobre si ambos extremos poseen esta característica. En el trabajo de Makarov *et al* (Makarov et al., 1997) detectan este "overhang" en el 80% de los extremos cromosómicos sugiriendo que ambos extremos terminarían en una región de simple cadena. El grupo de Wright (Wright

et al., 1997) estimó que este “overhang” está presente en sólo el 45% de los extremos.

Varios grupos trabajando con distintos tipos de células humanas *in vitro*, determinaron que en promedio los telómeros pierden por duplicación entre 50 y 100 bases, siendo este número generalmente un tercio de la longitud del “overhang” (Huffman et al., 2000). Esto significa que el extremo 3' de ADN de simple cadena en células humanas, es mucho más largo que la longitud de los iniciadores de ARN. Esto puede atribuirse a dos causas: 1) a que en la replicación del ADN el iniciador más distal no es ubicado en el extremo del cromosoma, o 2) que exista un mecanismo de degradación exonucleolítico en sentido 5'-3', que degrade la hebra rica en citosina y genere de esta manera los “overhangs” descritos. Como describí anteriormente, en levaduras existe una proteína llamada Cdc13 que se une a la región simple cadena del telómero. Cuando el gen codificante para esta proteína es deletado, se ve que la hebra rica en citosina es degradada de manera incontrolada en el telómero, sugiriendo que el mecanismo de degradación existe y que esta proteína de alguna manera, no muy clara aún, lo regularía. Esto sugeriría que la pérdida de ADN telomérico no estaría dado sólo por el mecanismo de replicación incompleta sino también por un mecanismo activo de degradación de la hebra de síntesis continua.

Hipótesis de reloj mitótico

Desde el surgimiento de las técnicas de cultivos primarios, los investigadores notaron que las células humanas normales cultivadas *in vitro* tenían una capacidad de replicación limitada. Se creía que las células eran inmortales pero el hecho de que no se replicaran indefinidamente era atribuido a que aún no se habían encontrado las condiciones de cultivo

adecuadas. En 1961 Hayflick quebró este dogma demostrando que las células *in vitro* son en realidad mortales, definiendo lo que hoy se conoce como el “límite de Hayflick” (Hayflick and Moorhead, 1961). En ese tiempo se hipotetizaba sobre la existencia de un mecanismo capaz de contar cuantas veces una célula puede dividirse, dado que todas las células no se duplicaban más allá de un rango estrecho de replicaciones, y si se las congelaba en cualquier pasaje y luego se las descongelaba y se las volvía a crecer, retenían en su “memoria” la cantidad de replicaciones que habían tenido previamente. Recién en el año 1975, Wright y Hayflick demuestran que el núcleo era el encargado de determinar cuantas veces una célula se va a dividir. Para ese entonces, se sabía que los telómeros eran estructuras importantes para la estabilidad cromosómica y que las ADN polimerasas no podían replicar completamente los extremos de las moléculas lineales de ADN. Olovnikov (Olovnikov, 1971; Olovnikov, 1973) propone en ese entonces, que el acortamiento telomérico en cada ronda de replicación celular, podría ser el tan buscado mecanismo que definía el número de veces que una célula se va a dividir. Más aún, sugiere que dado que es inconcebible que la célula pierda secuencias importantes de los cromosomas, los telómeros deberían estar compuestos por secuencias repetitivas que no contuvieran ninguna información genética relevante. Este modelo llamado “reloj mitótico” por el hecho de que el acortamiento telomérico cumpliría la función de “contar” cuantas veces una célula puede dividirse, predecía dos eventos: 1) que la longitud telomérica debería ir disminuyendo a medida que las células se divadiesen *in vitro* y 2) si lo mismo sucedía *in vivo*, la longitud telomérica de células de un organismo viejo debería ser más corta que aquella proveniente de un organismo joven. Los estudios que demostraron la veracidad de esta hipótesis, fueron realizados casi 20 años más tarde. En un primer trabajo, el grupo de

Greider demostró que la longitud de los telómeros de fibroblastos humanos mantenidos en cultivo hasta su fase final, se acortan con los sucesivos pasajes (Harley et al., 1990). En el segundo trabajo, dos años más tarde, el mismo grupo demostró que existe correlación entre la longitud de los telómeros y la edad de la persona de la cual se extrajo el ADN, que existe una fuerte correlación entre la longitud telomérica inicial y la capacidad de replicación remanente de las células *in vitro*. Además demostraron que los telómeros de espermatozoides humanos no se acortan con la edad del dador, sugiriendo que estas células poseen un mecanismo de mantenimiento de la longitud telomérica. Existe un último dato importante que llevó a concluir que el modelo propuesto se ajustaba muy bien a los datos. La longitud telomérica, así como la capacidad replicativa de células provenientes de pacientes con una enfermedad de envejecimiento prematuro llamada progeria o enfermedad de Hutchinson-Gilford, estaban ambas disminuídas en comparación con personas sanas de la misma edad (Allsopp et al., 1992).

Se sabía por estudios realizados en levaduras que genes situados cerca de los telómeros sufren de TPE, caracterizado por la represión de la transcripción debido a la estructura heterocromática que los mismos poseen. En base a esto, la explicación más aceptada que se daba en aquellos años era, que esta estructura heterocromática telomérica, a medida que los telómeros se iban acortando se relocalizaba hacia posiciones más internas del cromosoma llevando a la represión de la transcripción de genes más distales (Pommier et al., 1995). Actualmente se sabe que el TPE es un mecanismo que ha sido muy bien caracterizado en levaduras (Strahl-Bolsinger et al., 1997), pero aún no se ha probado experimentalmente su existencia en células de mamíferos. Lo que se postula hoy es que en células humanas con las sucesivas divisiones celulares los extremos cromosómicos

que han perdido parte crítica de sus telómeros pueden ya no ser reconocidos como “telómeros” y activarían de esta manera, los mecanismos que sensan el daño al ADN deteniendo la proliferación celular.

Mecanismos de replicación teloméricos

Los organismos han desarrollado a lo largo de la evolución distintos mecanismos para replicar sus cromosomas: 1) no teniendo extremos: dando lugar a cromosomas circulares muy comunes en bacterias, 2) comenzando la síntesis en los extremos a partir de una proteína que es la que proporciona el hidroxilo 3' necesario, mecanismo presente en algunos virus y bacterias, 3) cerrando el ADN covalentemente en un rulo, en algunas bacterias espiroquetas del género *Borrelia* y virus, y por último, 4) teniendo mecanismos especiales que replican las repeticiones teloméricas, una vez que las polimerasas convencionales han fallado en hacerlo. Dentro de esta última categoría se encuentran la telomerasa, los mecanismos alternativos de extensión telomérica (ALT) y los retrotransposones, presentes en eucariotas.

Telomerasa

Función

La pérdida de secuencias en los extremos de los cromosomas lineales en la mayoría de los organismos eucarióticos, es balanceada por la síntesis *de novo* de repeticiones teloméricas por la telomerasa.

Esta enzima utiliza como sustrato el extremo de ADN de simple cadena que sobresale de los extremos 3' de los cromosomas en el caso de que haya repeticiones teloméricas preexistentes, o de comenzar la síntesis

de novo de un nuevo telómero a partir de un extremo cromosómico como. Greider y Blackburn hace más de 15 años, decidieron buscar la actividad de esta enzima en *Tetrahymena*, donde la síntesis de telómeros es masiva. Este organismo unicelular posee dos núcleos: el micronúcleo transcripcionalmente inactivo, encargado de generar el macronúcleo y el macronúcleo encargado de la producción de todas las proteínas y ARNs necesarios para la célula. Este último se genera por replicación múltiple del primero y fragmentación posterior de los cromosomas dando lugar a alrededor de 40.000 minicromosomas (cada uno con un solo gen) a los cuales es necesario agregarles los telómeros. Así fue como en el año 1985 se detectó la primera actividad de telomerasa (Greider and Blackburn, 1985). Desde ese entonces esta enzima fue identificada y bioquímicamente caracterizada en otros organismos tales como dos protozoos ciliados relacionados, *Euplotes* (Shippen-Lentz and Blackburn, 1989) y *Oxytricha* (Zahler and Prescott, 1988), levaduras (Cohn and Blackburn, 1995), esponjas (Koziol et al., 1998), insectos (Sasaki and Fujiwara, 2000), *Xenopus* (Mantell and Greider, 1994), plantas (Heller et al., 1996), mamíferos (Morin, 1989; Nakayama et al., 1997), y en células inmortales y líneas celulares tumorales humanas (Kim et al., 1994). Recientemente, esta actividad ha sido detectada en sólo algunos estadios de organismos patógenos para el hombre, como *Plasmodium falciparum* (Bottius et al., 1998) y tres kinetoplástidos flagelados, *Leishmania major*, *Leishmania tarentolae* y *Trypanosoma brucei* (Cano et al., 1999).

La telomerasa es una ribonucleoproteína (RNP) dado que está formada básicamente por una subunidad catalítica proteica y una molécula de ARN y por definición es una transcriptasa reversa dado que sintetiza el ADN telomérico usando como templado una estrecha región del ARN que forma parte de su estructura (Greider and Blackburn, 1987).

Subunidad catalítica o TERT (telomerase reverse transcriptase)

Se han clonado hasta el día de la fecha trece genes codificantes de las subunidades catalíticas de la telomerasa, incluyendo la correspondiente al eucariota primitivo *Giardia lamblia* (Malik et al., 2000), aunque en este organismo, al igual que en *C. elegans*, aún no se ha detectado actividad. Las secuencias de estas proteínas revelaron la presencia de motivos o dominios conservados entre ellas y transcriptasas reversas, junto con un dominio llamado T, por telomerasa, que está presente únicamente en éstas proteínas (Bryan et al., 1998; Lingner et al., 1997b; Nakamura et al., 1997) (Figura 6A y Figuras 27 y 36). La presencia de estos motivos en el sitio activo de la enzima, y el hecho de que mutaciones en los tres residuos aspárticos, conservados en todas las polimerasas, destruyen totalmente la actividad de telomerasa *in vivo* e *in vitro* (Lingner et al., 1997b; Weinrich et al., 1997), indican que el sitio activo de esta enzima comparte similitudes estructurales y funcionales con otras transcriptasas reversas (Figura 6B).

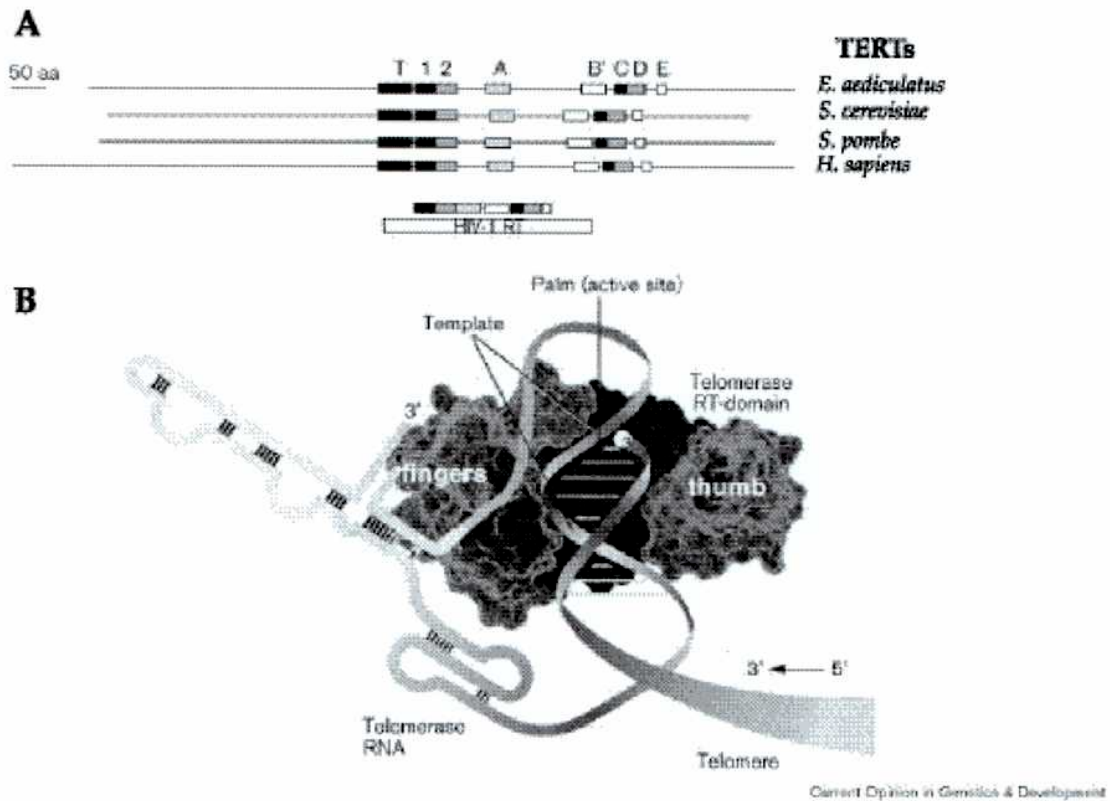


Figura 6: Motivos aminoacídicos conservados entre las telomerasas y las transcriptasas reversas. A: Alineamiento esquemático de secuencias de cuatro telomerasas comparado con la transcriptasa reversa del virus de HIV. B: Estructura del sitio activo de la transcriptasa reversa del virus de HIV superpuesta con el ARN de la telomerasa. (Figura reproducida a partir del artículo (Lingner and Cech, 1998)).

No existe más de un 20% de homología de secuencia entre las subunidades catalíticas descritas hasta el momento, aunque en tamaño son bastante homogéneas: 123-133 kDa ciliados (Bryan et al., 1998; Collins and Gandhi, 1998; Lingner et al., 1997b), 103-123 kDa levaduras (Lingner et al., 1997b; Nakamura et al., 1997), 131 kDa Arabidopsis (Oguchi et al., 1999), 127-125 kDa mamíferos (Martin-Rivera et al., 1998; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997).

El hecho de que la telomerasa esté presente en organismos altamente divergentes como los ciliados, las levaduras, los mamíferos, las plantas o

tan primitivos como los trypanosomas, sugiere que desde muy temprano en la evolución la telomerasa ha surgido como un mecanismo casi universal para el mantenimiento de los telómeros en organismos eucarióticos. Existen pocos ejemplos en la naturaleza donde los telómeros son mantenidos por mecanismos diferentes al de la telomerasa. Es el caso de *Drosófila*, donde la longitud telomérica es mantenida por un mecanismo de transposición (Biessmann et al., 1990; Biessmann and Mason, 1988), o el caso de algunas líneas celulares humanas donde los telómeros son mantenidos por un mecanismo de recombinación llamado ALT (alternative lengthening of telomeres) (Reddel et al., 2001).

En células humanas somáticas, la subunidad limitante para que exista actividad de telomerasa es la subunidad catalítica (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). El ARN es expresado constitutivamente en todas las células y se ha demostrado que es el ARN que posee la vida media más prolongada descrita hasta el momento: 4 semanas (Yi et al., 1999).

Trabajos recientes indican que la estructura mínima requerida para que haya actividad de telomerasa *in vitro*, es un complejo formado por el ARN (sintetizado *in vitro*) y la subunidad catalítica (sintetizada *in vitro* en lisado de reticulocitos de conejo) (Collins and Gandhi, 1998; Weinrich et al., 1997), aunque *in vivo* en muchos casos estos dos componentes están asociados a otras proteínas accesorias y/o regulatorias (Aigner et al., 2000; Collins et al., 1995; Liu et al., 2000). Este sistema de reconstitución *in vitro* de la actividad de telomerasa ha sido de mucha utilidad para conocer las funciones de distintas regiones de la subunidad catalítica como así también del ARN.

ARN o TR (Telomerase RNA)

Los genes codificantes de esta subunidad de la telomerasa fueron identificados, clonados y secuenciados en más de 50 organismos incluyendo distintos protozoos ciliados (Lingner et al., 1994), levaduras (Singer and Gottschling, 1994), y varios mamíferos (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995). La longitud de esta molécula varía ampliamente entre los diversos organismos. Los ARNs más pequeños son los correspondientes a los ciliados los cuales poseen entre ~140 y ~210 bases y son transcritos por la ARN pol III (Romero and Blackburn, 1991). Le siguen los ARNs de vertebrados que poseen promotores para ARN pol II y tienen entre ~380 y ~550 nucleótidos (Chen et al., 2000). Y por último los más largos son los pertenecientes a las levaduras, con una longitud de aproximadamente ~1300 bases (McEachern and Blackburn, 1995; Singer and Gottschling, 1994), son transcritos por la ARN pol II, poseen CAP en el extremo 5' y son procesados en sus extremos 3' a partir de precursores poliadenilados (Chapon et al., 1997). Aunque entre ellos no presentan homología de secuencia, existen varios rasgos en la estructura secundaria (al menos entre los ARNs de ciliados y mamíferos), que se mantienen a lo largo de la evolución (Figura 7).

Normalmente la región de la molécula de ARN que sirve como molde para la síntesis de los telómeros corresponde a una repetición telomérica y media. Por estudios de caracterización bioquímica *in vitro* se estableció que en aquellos templados compuestos por 9 nucleótidos, usualmente las tres bases del extremo 3' de esta región sirven para posicionar el sustrato por hibridización (ya sea el extremo telomérico 3' *in vivo* o el 3' de un oligonucleótido *in vitro*) mientras que las otras 6 bases sirven de templado para la síntesis de las repeticiones teloméricas, como se muestra en la Figura 18B.

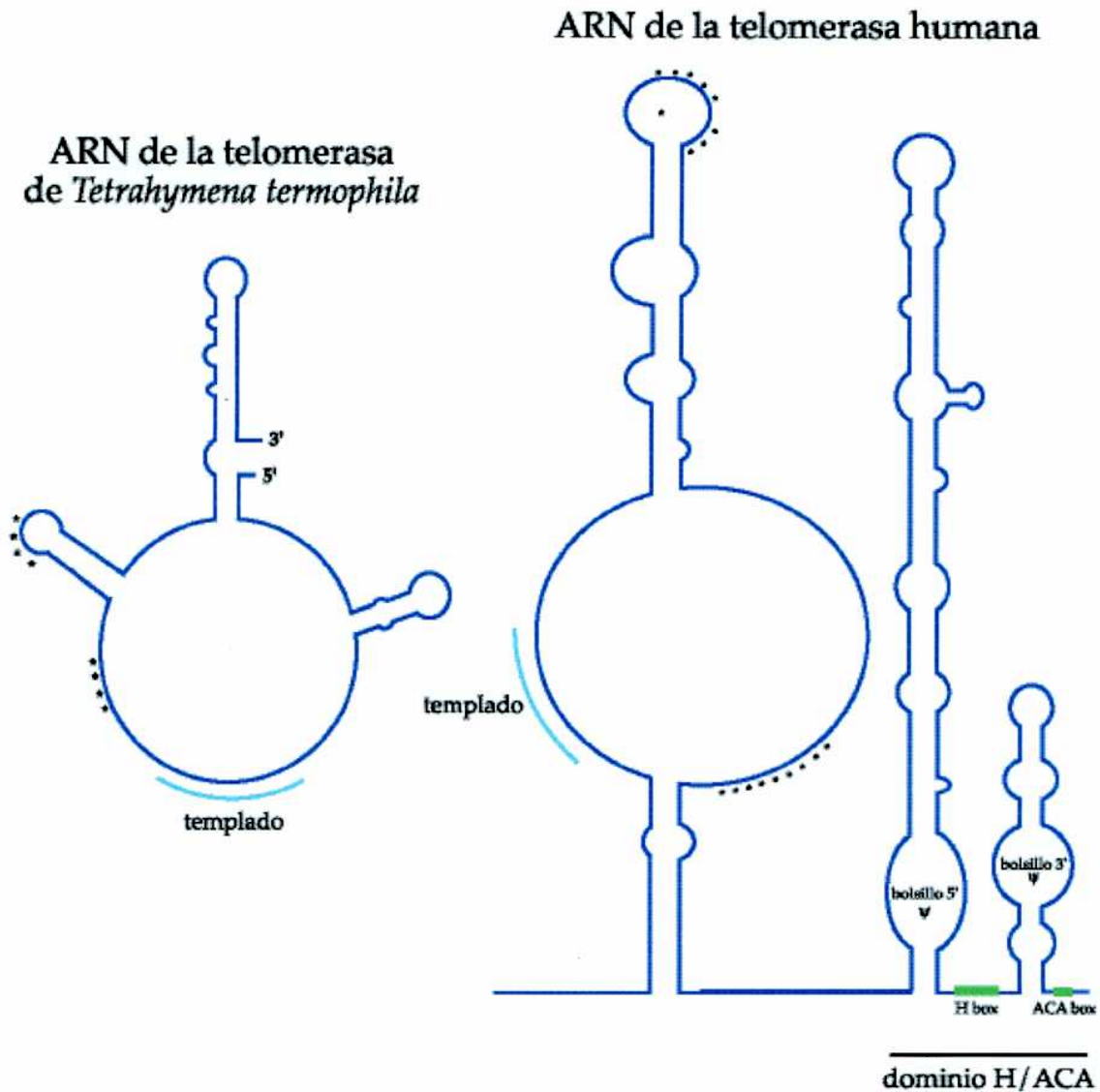


Figura 7: Estructuras de los ARNs de las telomerasas de *Tetrahymena termophila* y humana, a modo representativo de las estructuras de los ARNs de los ciliados y mamíferos. *** nucleótidos involucrados en la formación de un “pseudo-knot” presente en estos ARNs.

Pero más allá de proveer el templado para la síntesis de las repeticiones teloméricas, se sabe muy poco sobre la función que cumple el resto de la molécula. No existen hasta ahora hipótesis que especulen sobre por qué hay una gran divergencia evolutiva en tamaño y en secuencia entre

los ARNs de ciliados, vertebrados y levaduras. En el año 1999 el grupo de Kathy Collins descubrió que la diferencia de tamaño entre los ARNs de la telomerasa de ciliados y la humana, estaba dado porque este último parece haberse fusionado en su extremo 3' con un dominio extra llamado "box H/ACA". Este dominio presenta la estructura típica que tienen los "small nucleolar ARNs" (snoARNs) correspondientes a esa familia (Mitchell et al., 1999a) y que son en su mayoría los encargados de dirigir la pseudouridilación de los ARNr (Figura 7, dominio H/ACA). Este estudio llevó a distintos investigadores a buscar si el ARN de la telomerasa estaba asociado a proteínas que normalmente se encuentran asociadas a estos snoARNs. Así fue como el mismo grupo descubrió que la proteína diskerina, normalmente asociada a snoARNs y probable pseudouridina sintetasa, está también asociada al ARN de la telomerasa. Esta proteína se encuentra mutada en personas que padecen la enfermedad llamada diskeratosis congénita. Los pacientes que sufren de esta enfermedad muestran defectos en los tejidos que tienen una alta capacidad de regeneración como lo son la piel y la médula ósea, tienen una alta inestabilidad cromosómica y por esto son muy propensos a desarrollar ciertos tipos de tumores y generalmente fallecen de muy jóvenes por fallas en el sistema inmune. Este grupo observó que células provenientes de estos pacientes tienen menor cantidad del ARN de la telomerasa y consecuentemente tienen menos actividad de la enzima con respecto a células de personas heterocigotas para esta mutación o personas sanas (Mitchell et al., 1999b). A raíz de estos resultados postularon que en particular la diskerina podría estar cumpliendo un papel estructural o ser importante en el mantenimiento de la estabilidad de este ARN o de la RNP. Luego se describieron otras proteínas similares asociadas al ARN de la telomerasa pero no se sabe todavía con certeza cual es el papel de las

mismas (Pogacic et al., 2000). Algo similar sucede en las levaduras y en los ciliados. En el primer caso, se descubrió hace muy poco tiempo que el ARN de la telomerasa de estos organismos es una “small nuclear RNP” (snRNP). Este ARN presenta la secuencia consenso de unión a las proteínas Sm (proteínas comunes asociadas a todos los “snARNs” involucrados en “splicing”) y de hecho, se demostró por ensayos de inmunoprecipitación que estas proteínas están asociadas al mismo *in vivo* y que el complejo inmunoprecipitado tiene actividad de telomerasa *in vitro* (Seto et al., 1999). Este es el único ejemplo conocido hasta el momento de una snRNP que contiene las proteínas Sm, al cual no se le ha detectado aún una función en el procesamiento de ARNs. Se ha establecido que la presencia de estas proteínas Sm le confieren estabilidad a aquellos ARNs a los cuales normalmente se unen (U1, U2, etc) (Camasses et al., 1998), lo cual sugiere que podría estar cumpliendo el mismo papel en el complejo de la telomerasa. Lo mismo sucede con el ARN de la telomerasa humana. El dominio H/ACA descrito no se sabe aún si cumple la función de dirigir la pseudouridililación, como sucede con los snoARNs. En el segundo caso, el ARN de la telomerasa de *Euplotes aediculatus* está asociado a una proteína llamada La, la cual se une a la región de tres o cuatro Ues presentes en el extremo 3' de todos los transcritos sintetizados por la ARN polimerasa III. Esta proteína está involucrada en el ensamblado y maduración de distintas RNPs y en la retención nuclear de muchos ARNs (Aigner et al., 2000). Una especulación interesante es que a lo largo de la evolución estas tres RNPs (las telomerasas de humanos, ciliados y levaduras) han incorporado tres mecanismos similares, para proveerle estabilidad al ARN o a la RNP y probablemente los mismos estén también involucrados en la biogénesis, compartimentalización y ensamblado de estas partículas ribonucleoproteicas, sobre lo cual todavía poco se sabe.

Peso molecular aparente de los complejos de la telomerasa

En la Tabla 3 se muestran los pesos moleculares aparentes de los complejos de la telomerasa de distintos organismos y los métodos utilizados para la estimación de los mismos. Como se observa, el peso molecular de los complejos varía generalmente con el estado de purificación de la enzima y los métodos utilizados en ese procedimiento.

Proteínas asociadas a la telomerasa

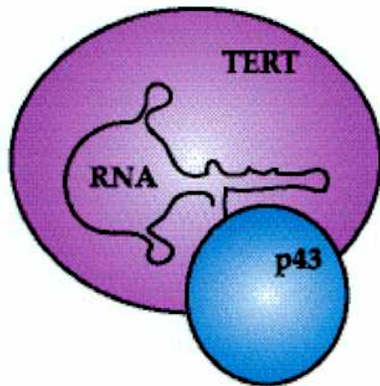
Como describí en la Tabla 3, los pesos moleculares aparentes de los complejos de la telomerasa son mucho más grandes de lo que uno esperaría si los mismos estuviesen sólo compuestos por la subunidad catalítica y la molécula de ARN. Mientras que todas las telomerasas comparten los dos componentes básicos, el resto de las proteínas que se han encontrado asociadas a las mismas, salvo algunos pocos ejemplos, generalmente no poseen su contraparte en los otros organismos. En la Tabla 4 se mencionan algunas de las proteínas que están asociadas a la telomerasa y se describen brevemente sus funciones conocidas (ver también Figura 8).

Organismos	Peso Molecular Aparente (kDa)	Métodos (a)	Referencia
<i>Tetrahymena</i>	~270 (vegetativo) (extracto S100) ~500 (vegetativo) (extracto S100)	Sedimentación en gradiente de glicerol Filtración molecular	(Collins, 1999)
	~400 (vegetativo y con micronúcleo en desarrollo) (extracto	Sedimentación en gradiente de glicerol	"

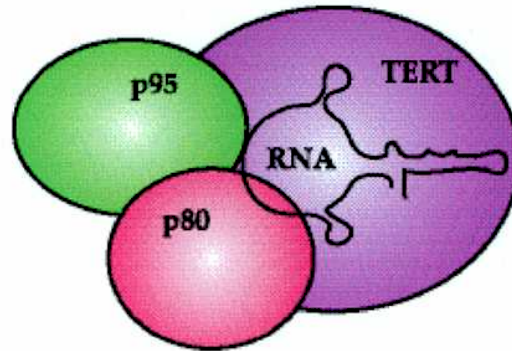
<i>Euplotes crassus</i>	S100) ~280 y >5000 (vegetativo) (extracto S100) ~550, ~1600 y >5000 (extracto S100)	Filtración molecular	
<i>Euplotes aediculatus</i>	~250 (vegetativo) (extracto nuclear) ~230 (vegetativo) (purificada con oligonucleótido biotinilado)	Sedimentación en gradiente de glicerol	"
Levaduras: <i>S. pombe</i>	~1500 (extracto S100 o purificada en columna de DEAE)	Sedimentación en gradiente de glicerol	(Luc and Peng, 1997)
<i>S. cerevisiae</i>	~1000 (extracto S100)		(Lingner et al., 1997b)
Ratón	>1000 (extracto citoplasmático)	Sedimentación en gradiente de glicerol	(Autexier et al., 1996)
Humanos	~550 (purificada con oligonucleótido biotinilado) ~ 750 (extracto citoplasmático) ~1000 (extracto nuclear)	Sedimentación en gradiente de glicerol	(Schnapp et al., 1998) (Autexier et al., 1996) (Schnapp et al., 1998)

Tabla 3: Pesos moleculares aparentes de los complejos de la telomerasa de distintos organismos. Entre paréntesis se menciona cuáles fueron los pasos obtención de la enzima. (a) métodos utilizados para la estimación del peso molecular de la telomerasa.

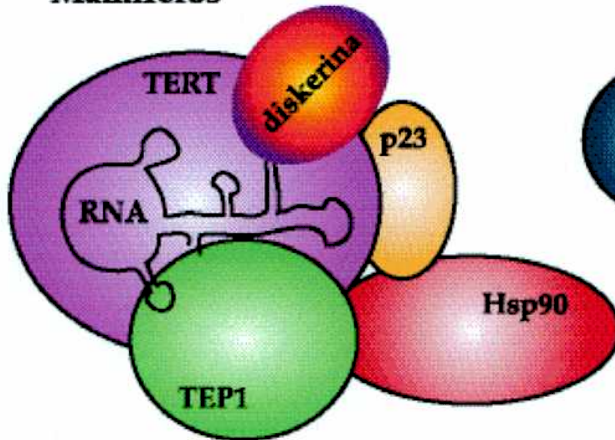
Euplotes aediculatus



Tetrahymena termophila



Mamíferos



Saccharomyces cerevisiae

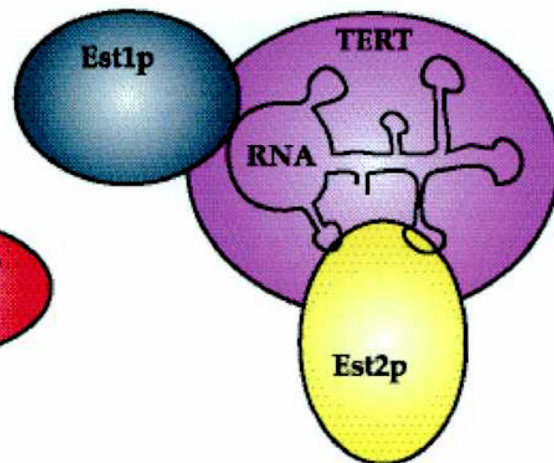


Figura 8: Esquemas de los complejos de las telomerasas de cuatro organismos típicos.

<i>Tetrahymena</i>	p80 p95	Ambas, cuando están juntas, se unen al ARN de la telomerasa con alta afinidad, p95 interactúa también con el sustrato de ADN, y son necesarias <i>in vivo</i> para el mantenimiento de la longitud telomérica y la estabilidad del micronúcleo. Su función exacta aún no se conoce.	(Collins et al., 1995; Miller and Collins, 2000)
<i>Euplotes aediculatus</i>	La o p43	Es una proteína que se une a ARN involucrada en la retención nuclear de los transcritos de la ARN polIII y en el ensamblado de RNPs.	(Aigner et al., 2000) y el review que tengo por ahí
Levaduras	Est1 Est3	Est1 interactúa con el ARN de la telomerasa independientemente de la presencia de las otras subunidades del complejo enzimático y junto con Est3, son las encargadas de interactuar con proteínas teloméricas para que la telomerasa tenga acceso a los telómeros y pueda elongarlos.	(Evans and Lundblad, 1999; Hughes et al., 2000; Zhou et al., 2000)
Rata	TLP1 (p230 y p240 precursor de p230)	No se sabe aún cuál es su función. Esta proteína posee 16 repeticiones llamadas WD-40 que tienen un papel en interacciones proteína- proteína. Se observó que en tejidos telomerasa negativos, la proteína predominante es p240 (precursor) mientras que en los tejidos telomerasa positivos, se encuentra mayoritariamente la p230. Pero aún no se ha demostrado si esta asociación diferencial juega algún papel en la regulación de la actividad de telomerasa.	(Nakayama et al., 1997).
Humanos / ratón	TEP1	Es una de las proteínas mayoritarias de la RNP Vault, para la cual no se conoce función y tampoco se sabe cuál es la relación entre la telomerasa y esa partícula. Se ha demostrado en el ratón “knock-out” para esta proteína, que la misma no es necesaria para la actividad de telomerasa ni para el mantenimiento telomérico <i>in vivo</i> .	(Kiekhoefer et al., 1999; Liu et al., 2000)

	Diskarina	Estabilización y/o biogénesis del ARN o de la RNP (?)	(Mitchell et al., 1999b)
	Hsp90 y p23	Chaperonas que se encuentran asociadas a la telomerasa <i>in vivo</i> y son necesarias en la reconstrucción de la actividad en un sistema <i>in vitro</i> de transcripción y traducción, para el ensamblado de una telomerasa activa.	(Holt et al., 1999)

Tabla 4: Proteínas asociadas a la telomerasa. Con signo de pregunta se detallan aquellas funciones que son especulativas y las cuales aún no han sido demostradas experimentalmente. Con el mismo color se destacan las proteínas que poseen cierta homología entre sí (aunque eso no significa que la función sea la misma).

Características enzimáticas de la telomerasa

Sustratos de ADN y nucleótidos (*in vivo* e *in vitro*)

In vivo los sustratos sobre los cuales la telomerasa puede actuar son: el 3' "overhang" compuesto por secuencias teloméricas, y extremos romos de ADN de doble cadena que no poseen secuencia telomérica. Cabe aclarar que en el último caso debe existir necesariamente algún mecanismo que genere una región de ADN simple cadena dado que los mismos no son sustrato para la telomerasa. Normalmente se requieren al menos 6 nts de simple cadena en el caso de *E. aediculatus* y 20 nts en el caso de *Tetrahymena* para que las enzimas puedan elongar (Lingner and Cech, 1996; Wang and Blackburn, 1997). Los extremos romos normalmente aparecen en dos ocasiones: 1) puede ser un evento programado de fragmentación cromosómica regulada, como sucede en el macronúcleo del protozoo ciliado *Tetrahymena* (Yu and Blackburn, 1991) o puede ocurrir accidentalmente cuando existe ruptura de un cromosoma (Wilkie et al., 1990). En base a estos datos, existen organismos cuyas telomerasas pueden

sintetizar telómeros *de novo* sobre secuencias no teloméricas, como en el caso de los ciliados, y otros organismos como los humanos en donde este mecanismo es un evento muy esporádico y obviamente no conveniente (Morin, 1991).

In vitro el panorama es muy distinto y en algunas ocasiones puede no reflejar lo que sucede *in vivo*. Hay telomerasas como las de *Tetrahymena* y *Euplotes* (cuando el macronúcleo está en desarrollo) que son capaces de elongar tanto oligonucleótidos que poseen secuencias teloméricas como no teloméricas (Wang and Blackburn, 1997). La telomerasa humana en cambio es algo más estricta en cuanto a sus requerimientos para usar un sustrato de ADN. Aunque puede elongar oligonucleótidos no teloméricos, requiere cierta cantidad de bases en el 3' que sean complementarias al templado del ARN para ser eficientemente usados como sustratos (Morin, 1991).

La longitud de los oligonucleótidos puede variar entre 6 y 30 nts. Para la mayoría de las telomerasas estudiadas, la longitud más apropiada es de aproximadamente 20 nts. La actividad mejora cuando se aumenta entre 6 y 20 nts pero cuando los oligonucleótidos son más largos se corre el riesgo de que comiencen a plegarse (Melek et al., 1996; Morin, 1991; Wang and Blackburn, 1997).

En cuanto a los nucleótidos, como es de esperar, *in vivo* todas las telomerasas usan los deoxinucleótidos comunes para la síntesis de los telómeros específicos de cada especie. Esto significa que *Tetrahymena* usa solo dGTP y TTP mientras que la telomerasa humana usa dGTP, TTP y dATP. Sin embargo ello no significa que las *kms* correspondientes a cada uno de ellos sean iguales. Usualmente la *km* para el dGTP es menor que para los otros nucleótidos. En el caso de la enzima de *Tetrahymena*, la *km* para la incorporación de dGTP es de $\sim 1 \mu\text{M}$, mientras que para TTP es de

~10 μ M (Collins, 1999). La alta concentración de un solo nucleótido, más allá de si es o no incorporado, generalmente es inhibitoria. En algunos casos se ha demostrado que *in vitro*, la telomerasa es capaz de incorporar una gran variedad de otros nucleótidos y análogos como dideoxinucleótidos, ribonucleótidos, dITP, Br-U, AZT-TP, arabinofuracil-guanosin TP (Ara-GTP), etc (Harrington et al., 1995; Strahl and Blackburn, 1994).

Sitio de anclaje o “anchor site” y clivaje endonucleolítico

En varias telomerasas se ha postulado, que existe un sitio de interacción entre la enzima y el sustrato de ADN que es independiente de la interacción mediada por hibridización que puede darse entre este y parte del templado en la molécula de ARN. Este sitio se llama sitio de anclaje o "anchor site". En el caso por ejemplo de la telomerasa de *Euplotes* para que un sustrato de ADN sea elongado por la enzima, sólo necesita tener secuencia telomérica en la región donde interactúa con este sitio y se postuló que esta interacción facilita que el 3' del oligonucleótido se posicione de manera correcta en el sitio activo de la enzima (Melek et al., 1996). Existen varios estudios que han caracterizado el sitio de anclaje a través de ensayos de cross-linking entre la enzima y sus sustratos de ADN y a través de mutaciones en estos últimos que modifican la interacción entre ambos componentes (Hammond et al., 1997; Lue and Peng, 1998; Wang and Blackburn, 1997).

Además de la actividad de polimerización, la telomerasa también es capaz de clivar los sustratos de ADN. Esto hace que generalmente se vean productos que son más cortos que el sustrato de ADN utilizado en el ensayo de la determinación de actividad *in vitro*. La reacción de clivaje requiere

que la secuencia del sustrato 5' más arriba del sitio de corte, sea complementaria al templado del ARN y se cree que es llevada a cabo en el mismo sitio activo que cumple la función de polimerasa. Se ha visto que condiciones de reacción que inhiben la elongación, recíprocamente estimulan el clivaje y éstas condiciones incluyen el copiado completo del templado, la liberación lenta del producto, la baja concentración del dNTP requerido para ser agregado en la próxima posición y el uso de sustratos de ADN que tienen en el 3' secuencias no teloméricas extra o alguna/s base/s desapareada/s (Cohn and Blackburn, 1995; Collins and Greider, 1993; Melek et al., 1996). Todavía no se conoce bien cuál es el papel *in vivo* de esta reacción. Se ha postulado que el clivaje ayudaría a procesar sustratos para mejorar su elongación, o como un mecanismo de "proof reading", o como paso para la liberación o el reposicionamiento de productos que están "estancados" hibridizados con el ARN y por último que puede ser una propiedad intrínseca del sitio activo de la enzima y que podría no tener función alguna.

Procesividad

Una vez que el sustrato fue elongado, el mismo puede seguir tres caminos: 1) permanecer unido a la telomerasa, 2) disociarse de la misma o 3) liberarse sin disociarse totalmente, y reposicionarse para volver a ser copiado, permitiendo de esta manera que se produzca otro ciclo de polimerización. Las interacciones entre el producto y el templado y el sitio de anclaje son los que determinan en última instancia estas tres posibilidades. Intuitivamente uno pensaría que una interacción fuerte con el sitio de anclaje ayudaría al producto a permanecer unido a la enzima cuando su extremo 3' es liberado para reposicionarse en el templado.

A raíz de esto se puede definir lo que se llama la procesividad para el agregado de repeticiones. Esta característica es propia de cada enzima y varía con el estado de purificación de la misma y con las condiciones de reacción y se evidencia principalmente en aquellas enzimas que establecen una interacción fuerte entre el sustrato y el sitio de anclaje.

Las telomerasas de cililados como así también las de mamíferos, son enzimas muy procesivas capaces de agregar más de 30 repeticiones a un mismo sustrato *in vitro* (Collins, 1999; Morin, 1989). En cambio en el caso de las levaduras, donde la repetición telomérica es variable en secuencia, usualmente la procesividad es muy baja hasta el punto de que en ciertas condiciones es difícil que la enzima llegue a copiar completamente la región del ARN que sirve de templado (Cohn and Blackburn, 1995).

Células humanas que poseen actividad de telomerasa

Tejidos con alta capacidad replicativa

Trabajos realizados en los años '90 describieron que los telómeros de los espermatozoides eran más largos que los de las células somáticas de una misma persona, que no se acortaban en función de la edad del dador y que la longitud telomérica se mantenía en las distintas generaciones (Allsopp et al., 1992). Hoy se sabe que todas las células germinales poseen actividad de telomerasa (Kim et al., 1994) y que esto es condición suficiente para el mantenimiento de la longitud telomérica. La telomerasa está presente también en tejidos fetales (a las 20 semanas de desarrollo) con excepción del cerebro, pero la expresión de la subunidad catalítica es reprimida a medida que los tejidos se van diferenciando a lo largo del desarrollo (la represión generalmente se correlaciona con el momento de la

diferenciación de los tejidos) y se vio que poco después del nacimiento no se detecta más en la mayoría de los tejidos somáticos y permanece en este estado en el organismo adulto (Wright et al., 1996). Como consecuencia los telómeros comienzan a acortarse desde muy temprano en la vida del ser humano. Las únicas excepciones a esta regla lo constituyen los tejidos que poseen una alta capacidad replicativa, en donde la continua división celular demanda un buen mantenimiento de la longitud telomérica. Entre ellos se encuentran: las células germinales que mencioné recién, la médula ósea y células en sangre periférica (Broccoli et al., 1995; Counter et al., 1995; Hiyama et al., 1995; Hohaus et al., 1997) donde se observó que la actividad de telomerasa aumenta en relación con la proliferación, cuando por ejemplo los linfocitos T son activados (Pan et al., 1997). También está presente en distintas células epiteliales que se encuentran en: la capa basal de la piel (Harle-Bachor and Boukamp, 1996), incluyendo los folículos pilosos (Ramirez et al., 1997); en las vellosidades del intestino (Shay et al., 1997); en el tejido endometrial (Kyo et al., 1997; Saito et al., 1997; Yokoyama et al., 1998) o en glándula mamaria (Tsao et al., 1997), etc. Todos estos tejidos están continuamente sujetos a renovación celular (Taylor et al., 1996). Aunque la telomerasa es detectada en estas células el nivel de actividad es mucho menor que la que se encuentra por ejemplo en células tumorales o líneas celulares humanas (Holt and Shay, 1999).

Tumores y líneas celulares

El otro grupo de células humanas que tiene actividad de telomerasa es el de las células tumorales o cancerígenas *in vivo* y las líneas celulares en cultivo. En el año 1994 se desarrolló una técnica muy sensible para la detección de actividad de telomerasa llamada TRAP (telomeric

repeat amplification protocol), la cual se basa en la extensión de un oligonucleótido no telomérico por la telomerasa (presente en extractos celulares) y luego estos productos son amplificados por PCR (ver esquema de la Figura 12), de manera que se puede detectar actividad de telomerasa proveniente de sólo 10 células o de extractos realizados a partir de una población con una relación de células telomerasa positivas:telomerasa negativas de 1:10⁴ respectivamente (Kim et al., 1994). Con este método los autores describieron que la telomerasa está presente en un 98% en líneas celulares inmortales y aproximadamente en un 90% en tumores primarios humanos. No detectaron actividad en 22 tejidos somáticos normales en cultivo ni en 50 tejidos normales o benignos provenientes de biopsias. Este fue el primer trabajo en el que se evidenció de manera sorprendente la relación que existe entre la presencia de actividad de telomerasa y la inmortalidad celular. En un trabajo posterior, similar al ya mencionado (ver Tabla 5), un grupo independiente corroboró estos datos también por determinación de actividad en distintas líneas celulares y tumores utilizando el mismo método levemente modificado (Shay and Bacchetti, 1997).

Estado del tejido	N° (+) / N° testeado	Telomerasa (+) (%)
Normal*	1/196	0.5
Preinvasivo (benigno)	125/410	30
Maligno	1734/2031	85
Adyacente a tejido maligno	77/660	11

Tabla 5: Detección de actividad de telomerasa en distintos tipos de tejidos humanos. *: el único resultado positivo se obtuvo de células provenientes de la capa basal de la piel.

Estos datos hacen de esta enzima un atractivo marcador en el diagnóstico del cáncer y como posible blanco de ataque para nuevos

tratamientos quimioterapéuticos. Se ha propuesto el uso de la determinación de actividad de telomerasa para la detección temprana de cánceres humanos previo a una progresión maligna. Por ejemplo, muchas lesiones previas a la aparición de un carcinoma poseen actividad detectable de telomerasa aunque son clasificadas como premalignas por los cito e histopatólogos. Esto sugiere que esas lesiones poseen un subgrupo de células malignas, y que conociendo esto, los médicos podrían asistir al paciente en un estadio temprano de la enfermedad (Shay and Wright, 1996). Algo similar sucede en los cánceres de próstata. Casi el 50% de los mismos no son detectados debido a que no existen marcadores citológicos que los identifiquen. La actividad de telomerasa puede ser detectada en casi un 90% de los casos inclusive haciendo uso de técnicas de obtención de muestras por procedimientos no invasivos como el uso de orina o lavado de próstata (Dalbagni et al., 1997; Lin et al., 1996; Sommerfeld et al., 1996; Yoshida et al., 1997). Otra aplicación es en el seguimiento posterior a la remoción de un tumor o como pronóstico de neuroblastoma en niños (Hiyama et al., 1995).

Regulación de la actividad de telomerasa

Hay muchas evidencias de que la regulación de la telomerasa es un proceso multifactorial que involucra la regulación de la transcripción, interacciones proteína-proteína como así también modificaciones post-traduccionales incluyendo fosforilación. A continuación se describen ejemplos de alguna de ellas.

La actividad de telomerasa disminuye cuando se induce experimentalmente a las células a entrar en quiescencia (por ejemplo privándolas del suero o por contacto). La cinética de esta disminución es

muy lenta, puede llevar hasta 14 días para obtener una inhibición total de la actividad. Esto se debe a la represión de la transcripción de TERT y refleja básicamente el tiempo de vida media de la RNP. En cambio, cuando las células son estimuladas a diferenciarse, la desaparición de la actividad es completa en 2 o 3 días y se han involucrado en este proceso no sólo una represión de la transcripción sino también mecanismos de degradación proteolítica o modificaciones post-transcripcionales (Holt et al., 1997; Holt et al., 1996).

Muchas onco-proteínas y genes supresores de tumores como c-Myc, Bcl-2, p21, pRb (retinoblastoma), p53, PKC (proteín quinasa C) y proteín fosfatasa 2A han sido involucrados directa e indirectamente en la regulación de la actividad de telomerasa (Liu, 1999). Existen varios estudios que han descripto que una de las maneras de regular la actividad de la telomerasa es por fosforilación de la subunidad catalítica. Uno de ellos demostró que existe fosforilación de esta subunidad en células musculares lisas que rodean a los vasos sanguíneos, cuando las mismas son sometidas a condiciones de hipoxia (como sucede en los casos de hipertensión pulmonar). Esta modificación incrementa la actividad de la telomerasa y prolonga la capacidad replicativa de estas células y a raíz del uso de distintos inhibidores, sugieren que la fosforilación estaría dada por la PKC (Minamino et al., 2001). Otro grupo demostró que cuando los linfocitos T son activados, la telomerasa es fosforilada y translocada al núcleo (Liu et al., 2001).

Un grupo estudiando los efectos de la expresión ectópica de TERT en células epiteliales mamarias humanas (cultivos primarios) demostró que cuando anulan esta expresión (escindiendo la construcción) la actividad de telomerasa persiste, debido a que la introducción de TERT incrementó la expresión de Myc, que a su vez llevó a la reactivación de la expresión del

gen endógeno para TERT (Wang et al., 2000). Otros estudios involucran la expresión ectópica de p21 (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina: cdk) o de pRb, en los cuales se observa una disminución de la actividad de telomerasa probablemente debido a que las células detienen su ciclo, más que a una intervención directa de estas proteínas sobre la expresión o actividad de la misma.

En cuanto a la regulación de la actividad de telomerasa durante el ciclo celular es campo de controversia. Con el uso de inhibidores que bloquean el ciclo celular en distintos estadios, un grupo describió que la actividad de telomerasa en células sincronizadas se encuentra aumentada en la fase S y que en células arrestadas en fase G2/M hay una notable disminución de la misma (Zhu et al., 1996). Sin embargo, otro grupo no confirmó estos resultados, concluyendo que la causa de la disminución de telomerasa en el estudio previo no se relaciona con la etapa del ciclo celular, sino con la inducción de apoptosis como así también una disminución en el índice de proliferación inducidas por el uso de estos inhibidores (Holt et al., 1997). Quizás la regulación durante el ciclo celular esté dada por un acceso diferencial de la telomerasa al telómero, que no puede ser evidenciado con la mera determinación de actividad *in vitro* a partir de extractos celulares, más que mecanismos que afecten por ejemplo la expresión de la enzima.

Se sabe que existe un represor de la telomerasa localizado en una región del cromosoma 3p, que aún no ha sido aislado. Estudios donde se introduce esta región en células telomerasa positiva, se ve una disminución de la longitud telomérica acompañada con una represión de la actividad enzimática (Ohmura et al., 1995). Experimentos posteriores en las mismas células, demostraron que la introducción de esta región del cromosoma 3 resulta en una disminución considerable del ARNm de TERT, arresto del

crecimiento y expresión de β -galactosidasa activada por senescencia (Horikawa et al., 1998).

El último mecanismo postulado de regulación de la actividad de telomerasa, es llevado a cabo mediante la expresión de variantes inactivas producidas por “splicing” alternativo. Estas variantes fueron detectadas en algunos tejidos fetales humanos y en distintos tipos de células tumorales (Ulaner et al., 1998). Una de ellas, cuando es expresada en células telomerasa positivas, actúa como un dominante negativo causando acortamiento telomérico y eventualmente la muerte celular. Entonces, el mecanismo sugerido es que las células podrían regular la actividad de telomerasa sin alterar la expresión de TERT, sólo con la producción de variantes inactivas que compitan con el sustrato dentro de la célula (Yi et al., 2000).

Senescencia y crisis (células telomerasa positivas y células ALT)

A medida que los telómeros se acortan pueden dispararse dos respuestas celulares distintas dependiendo del contexto genético en el cual se encuentran, y estas son: senescencia y crisis.

Senescencia es el arresto irreversible de la división celular, en el cual las células pasan a estar en fase G0 del ciclo celular, exhiben cambios morfológicos característicos, tienen un patrón alterado de expresión génica y permanecen metabólicamente activas. Esto es lo que describí anteriormente como límite de Hayflick. En el caso de células humanas este es el primer “checkpoint” celular que se activa cuando los telómeros se han acortado y que depende de la integridad de las proteínas p53 y pRb. Entonces, el acortamiento telomérico lleva en primer lugar a lo que se

llama senescencia celular o replicativa donde las células dejan de dividirse (Figura 9). Esta etapa puede superarse si las células presentan mutaciones en genes codificantes de las proteínas “supresoras de tumores” p53 o Rb o si las proteínas están inactivadas por la expresión de distintas oncoproteínas tales como las del virus SV40 (antígeno T-grande), o del virus Epstein-Barr, etc. Estas células no poseen actividad de telomerasa y como continúan dividiéndose, los telómeros siguen acortándose activando a los mecanismos que sensan el daño al ADN. Se genera de esta manera, una respuesta encargada de reparar este daño, la cual es llevada a cabo por el mecanismo de reparación NHEJ, que es el responsable de generar las fusiones cromosómicas terminales (end-to-end) características de esta etapa. Las mismas inducen la apoptosis celular llevando a la muerte masiva del cultivo, punto que se conoce como “crisis”. Generalmente muy pocas células sobreviven a esta última etapa (1 célula de cada 10^7) y se sabe que las células que lo hacen poseen las siguientes características invariables: 1) poseen anormalidades cromosómicas, 2) tienen activado, por algún proceso aún desconocido, uno de los dos mecanismos ya mencionados para mantener la longitud de sus telómeros (telomerasa o ALT) y 3) son inmortales, o sea que pueden dividirse indefinidamente.

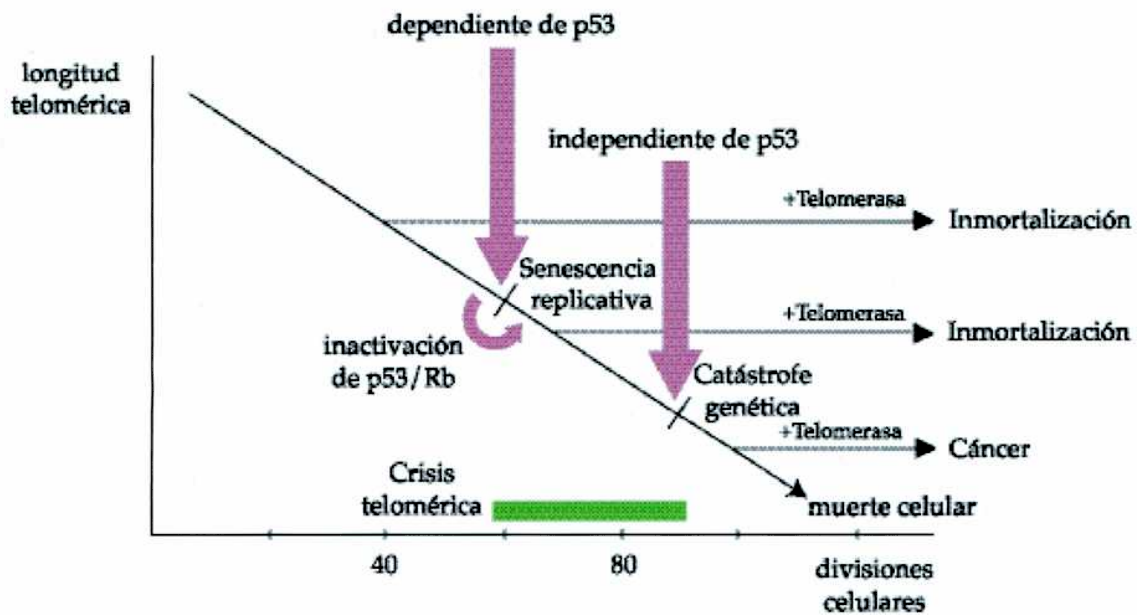


Figura 9: Esquema del acortamiento de la longitud telomérica con las sucesivas divisiones celulares.

Inhibición de la telomerasa

Un gran número de experimentos han permitido concluir que la actividad de telomerasa es importante para la capacidad replicativa a largo plazo de las células normales y organismos unicelulares. Una de las predicciones directas de estos estudios fue que la inhibición de la telomerasa en células telomerasa positivas, debería llevar en primera instancia al acortamiento telomérico. Muchos han tratado de inhibir a la telomerasa mediante oligonucleótidos anti-sentido. Sin embargo, la inhibición no resultó completa y la especificidad difícil de evaluar (Bisoffi et al., 1998; Glukhov et al., 1998; Kondo et al., 1998). Para resolver este problema, el grupo de Weinberg en el año 1999 generó una versión mutada de TERT, reemplazando en el motivo A, dos residuos aminoácidos esenciales para la actividad. Esta proteína una vez expresada en las células,

actúa como un dominante negativo sobre la telomerasa normal. Los autores observaron que la expresión de esta proteína en distintas líneas celulares humanas lleva a una inhibición completa de la actividad de telomerasa y al consecuente acortamiento telomérico con un aumento en la aparición de cromosomas dicéntricos debido a fusiones terminales. Las células transfectadas mostraron una reducción en la proliferación y finalmente dejaron de dividirse presentando características correspondientes a células en apoptosis. Lo más relevante de este resultado fue que distintas células dejaron de dividirse en distintos estadios, determinados por la longitud telomérica inicial específica de cada tipo celular. Por último, los autores demostraron que al contrario con lo que sucede con las células sin transfectar, las células que tienen inhibida la telomerasa son incapaces de formar tumores en ratones “nude” (Hahn et al., 1999). En un trabajo llevado a cabo por el grupo de M. Robinson, se obtuvieron resultados similares utilizando otra mutante de TERT y otras líneas celulares (Zhang et al., 1999).

En estudios realizados en organismos unicelulares como las levaduras y *Tetrahymena*, donde una de las maneras de inhibir específicamente a la telomerasa es mutándole el ARN, al igual de lo que sucede en células humanas, lleva al acortamiento telomérico y a la senescencia y muerte celular después de un limitado número de divisiones (McEachern and Blackburn, 1995; Singer and Gottschling, 1994; Yu et al., 1990).

Organismos “knock-out” de telomerasa

En el año ‘97, el grupo de Greider produjo ratones “knock-out” para la subunidad de ARN de la telomerasa. Estos ratones pierden por generación aproximadamente 5 kpb. Dado que los ratones mantenidos en

laboratorio por muchos años tienen telómeros que son significativamente más largos que los telómeros de los humanos y de sus contrapartes naturales (Hemann and Greider, 2000; Kipling and Cooke, 1990), no se observó ningún fenotipo discernible durante las primeras 5 generaciones aún habiendo acortamiento telomérico y aumento de las anormalidades en metafase. Sin embargo, en la sexta generación aparecieron los rasgos típicos de inhibición de la telomerasa: una muy baja proliferación de células pluripotentes en tejidos germinales y con alta tasa replicativa. Tanto los machos como las hembras eran estériles, aún cuando se los cruzó con ratones normales. Estudios histológicos del tejido reproductivo e intestino mostraron que hay un alto grado de atrofia en estos órganos. También la capacidad proliferativa del tejido hematopoyético estaba disminuída, pero no se detectaron cambios macroscópicos en la anatomía de la médula ósea, bazo y timo (Blasco et al., 1997).

En el año 1999, el grupo de Dorothy Shippen creó plantas de *Arabidopsis* transgénicas con el gen codificante para TERT deletado. En este trabajo inicial describieron que en estas plantas existe acortamiento telomérico, que es mucho más lento al descrito en el modelo del ratón (250-500 pb contra 5000 pb) y como en aquel no observaron cambios fenotípicos en las primeras generaciones (Fitzgerald et al., 1999). En un trabajo posterior, describieron los defectos que estas plantas presentaron a partir de la quinta o sexta generación. Una de las primeras características fué la detección de fusiones cromosómicas las cuales aumentaron entre el 0.7% en la quinta generación al 45% en la décima y última generación. Sorprendentemente la anafase no se extendió concluyendo que las células continuaron dividiéndose hasta que las aberraciones genómicas hicieron insostenible la viabilidad celular. A partir de la sexta generación, comenzaron a hacerse visibles las anormalidades en distintos órganos que

empeoran en las generaciones siguientes. Las mismas incluyeron la disminución del tamaño de las hojas, la aparición de callos indiferenciados en los meristemas apicales y defectos en la reproducción. Las anteras no se desarrollaron y por lo tanto no contenían polen, los óvulos no maduraron y en consecuencia la formación de semillas se redujo totalmente en las mutantes de la última generación, la germinación declina a partir de la séptima generación y la mayoría de las semillas en la novena, son inviables (Riha et al., 2001).

Estos resultados junto con los observados en el modelo de ratón descrito, llevan a concluir que el mantenimiento de la longitud telomérica es esencial para la estabilidad genómica en todos aquellos tejidos y células que poseen una alta capacidad replicativa.

Papel del acortamiento telomérico como mecanismo protector de formación de tumores

Actualmente, la interpretación más aceptada sobre el papel del acortamiento telomérico con la consecuente entrada de las células humanas en senescencia, es que intervendría en un mecanismo que restringe la aparición de células cancerígenas o tumorales, en otros términos, se ha propuesto que el acortamiento telomérico es un mecanismo supresor de tumores.

Se ha establecido que se necesitan múltiples mutaciones para generar un tumor maligno. Si el número de divisiones es limitado por la senescencia celular, aquellas células pre-malignas que hayan adquirido algunas lesiones en sus genomas, en algún estadio (definido por el acortamiento telomérico) dejarán de dividirse, impidiendo de esta manera que sigan acumulando mutaciones que las lleven a su transformación

maligna. Este modelo predice que una célula para tornarse tumoral, debe pasar por alto los tres mecanismos descritos previamente (p53, p16/pRb y el acortamiento telomérico).

Cómo lograr la inmortalidad celular

Se ha establecido que la inmortalización de células humanas está invariablemente acompañada por un cambio crucial en la dinámica de los telómeros que involucra la presencia de la telomerasa o algún mecanismo alternativo de mantenimiento del ADN telomérico. La manera más simple de explicar la presencia de actividad de telomerasa o de ALT en todos los tumores humanos, es asumir que el mantenimiento telomérico es un prerrequisito para un continuo crecimiento tumoral.

Los estudios más importantes que sentaron las bases para crear células normales inmortales y llevaron a concluir que la expresión de la telomerasa con la subsecuente estabilización de la longitud telomérica se relacionaría con la inmortalidad celular provinieron de dos estudios realizados por los grupos de Vaziri y Wright (Bodnar et al., 1998; Vaziri and Benchimol, 1998). Los autores transfectaron células humanas normales (fibroblastos de piel y células epiteliales de la retina) con la subunidad catalítica de la telomerasa. Demostraron que extractos de las células transfectadas exhiben actividad de telomerasa, que poseen un cariotipo y fenotipo normales y que la expresión de la telomerasa es capaz de extender la vida replicativa de las células por 20 divisiones poblacionales más allá del punto de senescencia establecido para las mismas. Los telómeros en lugar de acortarse se elongan en los sucesivos pasajes, y como las células sin transfectar, se inhiben por contacto a alta densidad, son incapaces de crecer sin soporte y detienen su crecimiento cuando se les reduce la

concentración de suero, tres características que definen a las células tumorales *in vitro*.

Posteriormente, se demostró en estas células (en el pasaje número 300) que el hecho de que las mismas posean una capacidad replicativa mayor que las células sin transfectar, no significa que la telomerasa *per se* sea oncogénica. Por otra parte, son incapaces de formar tumores en ratones “nude” (Jiang et al., 1999) y por más que se co-transfectaron con las oncoproteínas del virus de HPV 16 E6/E7 y RAS oncogénico, no presentaron un fenotipo transformado (Morales et al., 1999). Estas observaciones se encuentran apoyadas por el hecho de que existen células humanas normales que tienen una capacidad indefinida de replicación y sin embargo no son tumorales (por ejemplo las células germinales). En conclusión, la expresión ectópica de telomerasa en células normales es suficiente para la inmortalización de las mismas y esto no significa que las células adquieran un fenotipo asociado con transformación maligna.

La inmortalidad de los organismos unicelulares

En los organismos unicelulares que pueden dividirse indefinidamente, el mantenimiento de la longitud telomérica también debería ser esencial para una viabilidad a largo plazo. Los mismos desde el punto de vista replicativo, pueden considerarse inmortales. Es por esto que se ha postulado que los microorganismos como los ciliados, las levaduras o los trypanosomas, sólo pueden sostener una replicación indefinida si poseen un mecanismo como la telomerasa que mantenga la longitud telomérica.

Kinetoplásticos

Características

Los organismos que pertenecen al orden Kinetoplastida se caracterizan principalmente por poseer un flagelo y una única mitocondria, la cual posee una malla altamente intrincada de ADN, formada por mini y maxicírculos concatenados llamado kinetoplasto. Esta región generalmente se visualiza microscópicamente como una zona muy densa. Los maxicírculos poseen la información que codifica para algunas de las enzimas del metabolismo del microorganismo, mientras que los minicírculos codifican para ARNs pequeños llamados “ARNs guías” encargados de dirigir el mecanismo de “editing” (agregado y delección de uridinas a los ARNm producidos a partir de los maxicírculos, de manera de generarles un marco de lectura abierto correcto) (Hajduk et al., 1997; Stuart et al., 1997). Además del mecanismo de “editing” mencionado, estos organismos poseen una variedad de características que los diferencian de todos los otros organismos. Los mismos poseen glicosomas, organelas con membrana donde se desarrollan los primeros pasos de la glucólisis (de Souza et al., 2000); “trans-splicing”, mecanismo por el cual todos los ARNm adquieren post-transcripcionalmente una región o secuencia líder en sus extremos 5’ que es requisito necesario para su traducción (Belli, 2000); fermentación aeróbica de la glucosa, dado que aún en presencia de oxígeno excretan al medio compuestos que no fueron totalmente oxidados (Cazzulo, 1992), presencia de la base J en el ADN (Gommers-Ampt et al., 1993), microtúbulos subpeliculares como citoesqueleto del organismo (de Souza, 1999), etc.

Dentro de este grupo, muchos de ellos poseen ciclos de vida complejos y son capaces de infectar al ser humano, animales domésticos y

plantas. Algunos son monogénéticos, o sea que su ciclo de vida se desarrolla dentro de un único organismo hospedador mientras que los digénéticos completan su ciclo de vida pasando por dos hospedadores.

Familia Trypanosomatidae

Dentro de esta familia se encuentran dos géneros importantes desde el punto de vista sanitario y económico: *Trypanosoma* y *Leishmania*. Entre ellos se encuentran *Trypanosoma brucei*, agente que causa la enfermedad del sueño en humanos y nagana en el ganado en Africa; *Trypanosoma cruzi* causante del Mal de Chagas en América del Sur y América Central y varias especies de *Leishmania* que provocan los distintos tipos de leishmaniasis (cutánea, visceral, muco-cutánea, etc.), en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo.

Otra manera de clasificarlos se basa en la localización de las formas infectivas en el insecto vector. Salivaria son aquellos como *T. brucei* y *Leishmania* que se localizan en las glándulas salivales del vector, y estercolaria cuando estas formas se encuentran en las heces del vector como sucede en el caso de *T. cruzi*.

Trypanosoma cruzi

Formas de desarrollo

T. cruzi presenta en su ciclo de vida tres estadios morfológicamente distinguibles. La forma epimastigote, la cual se caracteriza por poseer un flagelo que emerge de la región anterior del parásito (con respecto a la dirección del desplazamiento) y su kinetoplasto por estar en una posición anterior al núcleo celular (Figura 10). Esta forma es replicativa y se

encuentra en la porción media del intestino del insecto vector. La forma amastigote también es replicativa pero carece de flagelo (o posee sólo uno muy pequeño, atrofiado) que se encuentra dentro de las células del hospedador vertebrado (Figura 10). Por último, los trypomastigotes que son las formas no replicativas, pero infectivas, dentro de los dos hospedadores. En el vertebrado la forma se conoce como trypomastigote sanguíneo (circulante en sangre) y en el vector como trypomastigote metacíclico (en la última porción del intestino del vector). Los mismos se caracterizan por poseer un flagelo que se extiende a lo largo de todo el parásito y el kinetoplasto se encuentra en una posición posterior de la célula y por detrás del núcleo (Figura 10).

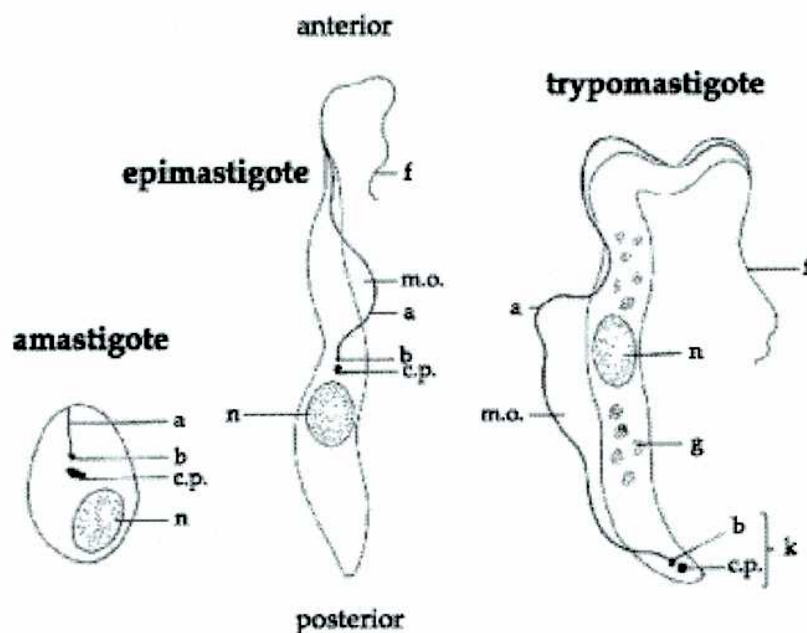


Figura 10: Esquemas de las formas de los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. n: núcleo. f: flagelo. g: gránulos. k: kinetoplasto. m.o.: membrana ondulante. b: blefaroplasto. c.p.: cuerpo parabasal. a: axonema.

Hospedadores

El *T. cruzi* completa su ciclo de vida entre dos hospedadores.

Hospedador vertebrado: más de 200 especies/subespecies de mamíferos incluyendo al hombre, animales domésticos y silvestres pueden ser infectados por este parásito (de Sousa, 1999).

Hospedador invertebrado: existen más de 70 especies de insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (de Sousa, 1999). En particular en la Argentina, el insecto vector principal es el *Triatoma infestans* o “vinchuca” en lengua quechua.

Ciclo de vida y vías de infección

El ciclo de vida de este parásito comienza cuando la vinchuca se infecta al ingerir sangre de un animal o humano infectado (Figura 11). Las formas ingeridas por el insecto son los trypomastigotes sanguíneos que en el intestino del mismo se diferencian a la forma de epimastigote, los cuales son replicativos. Los mismos se dividen y migran por el intestino de la vinchuca, diferenciándose a trypomastigotes metacíclicos al alcanzar la ampolla rectal. Cuando la vinchuca se alimenta, inmediatamente después defeca sobre la piel del vertebrado depositando junto con sus heces a los trypomastigotes. Los mismos pueden ingresar al organismo por la picadura del insecto o dado que la herida produce picazón, ser introducidos por rascado por el mismo individuo. La conjuntiva y la mucosa bucal también son vías de entrada para *T. cruzi*. Una vez que están dentro del organismo vertebrado, los parásitos pueden infectar distintos tipos celulares pero presentan cierta preferencia por células musculares o del sistema nervioso. Dentro de estas células los trypomastigotes se diferencian a amastigotes, los cuales se multiplican y se diferencian a trypomastigotes sanguíneos. Las

células son lisadas, de esta manera los parásitos son liberados a la sangre y capaces ahora de infectar a otras células o de ser ingeridos nuevamente por una vinchuca en su ingesta habitual.

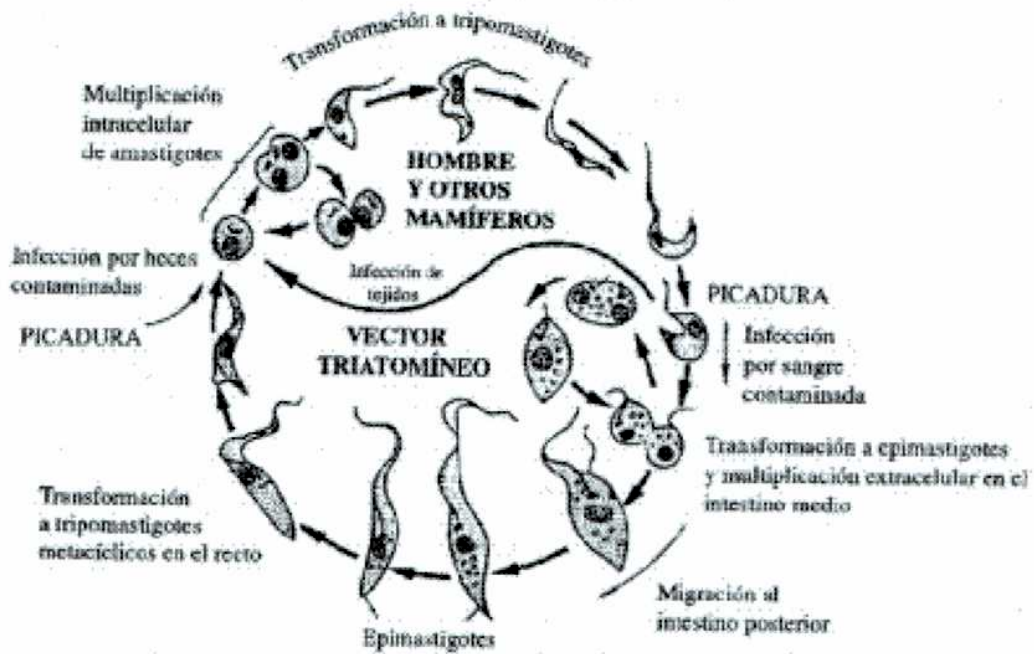


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Otras vías de infección, cada vez más frecuentes, son la transfusión sanguínea o el transplante de órganos, este último caso es agravado por el hecho de que los pacientes receptores del transplante, son sometidos a terapias inmunosupresivas. Con toda la inmigración de personas desde zonas rurales a zonas más urbanizadas, ha generado una mayor cantidad de individuos dadores de sangre o de órganos infectados con *T. cruzi* (BANK/WHO, 1989-1990). Por último, hay datos que describen casos de infección congénita (Schmunis and Szarfman, 1977).

Epidemiología

En uno de los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud, se estableció que existen entre 16 y 18 millones de personas infectadas con *T. cruzi*, y en particular en la Argentina, el 10% de la población es portadora de este parásito (BANK/WHO, 1989-1990). Las zonas de infección en el continente americano se extienden desde el sur de los Estados Unidos hasta la provincia de Chubut en Argentina. Generalmente la distribución de insectos vectores infectados es más amplia que la de la infección en sí. Esto se debe principalmente a que en aquellos países donde la calidad y condición de vida es un poco más elevada, los insectos no tendrían acceso a los hogares ni la posibilidad de generar nidos dentro de ellos, como sucede en las zonas rurales donde es más fácil mantener el ciclo doméstico de la infección.

Características de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas posee dos fases, una aguda y una crónica. **Fase aguda:** la misma es en general asintomática y pasa desapercibida en un 90% de los casos. La sintomatología de esta fase está dada por la aparición de fiebre, vómitos, diarrea y si la entrada de los parásitos fue vía la conjuntiva aparece un signo clásico llamado de Romaña (cuyo nombre proviene de la persona que lo describió), en la cual la zona alrededor del ojo presenta signos característicos de inflamación.

Fase crónica: la mayoría de las personas infectadas crónicamente, no presentan sintomatología asociada con la infección. Sólo el 30% de los mismos desarrolla a largo plazo (entre 10 y 20 años) algunos síntomas, que varían regionalmente. En el caso de la Argentina la afección más frecuente es la cardiomiopatía. Otra sintomatología es la aparición de megaórganos a

nivel del esófago y colon (Koberle, 1968) y alteraciones del sistema nervioso (Sica et al., 1986).

La desproporcionada inflamación en el miocardio, la fibrosis severa y el escaso número de parásitos en los individuos infectados crónicamente, ha llevado a postular que la patología que presenta la enfermedad de Chagas se debe a otros procesos que exceden la sola presencia y acción del parásito. De acuerdo con este modelo, la miocarditis sería perpetuada de manera independiente de la presencia del parásito, como una enfermedad autoinmune (Acosta and Santos-Buch, 1985; Santos, 1985). Sin embargo, la teoría autoinmune postulada (Hudson, 1985) y aunque se han demostrado determinantes antigénicos en común entre el parásito y el humano (Ferrari et al., 1995; Kerner et al., 1991; Levitus et al., 1991; Petry and Van Voorhis, 1991), no explica todos los aspectos de esta afección. Por otro lado, se ha demostrado por xenodiagnóstico que el parásito reaparece, por ejemplo en pacientes inmunodeprimidos, sugiriendo que el parásito permanece en el organismo bajo el control del sistema inmune del hospedador. A partir de todos estos resultados, se ha propuesto que la miocarditis se produce en un primer momento como resultado contra los focos parasitarios y que luego esto es exacerbado por una reactividad cruzada entre los antígenos del parásito y de las fibras del miocardio (Higuchi, 1999).

El porcentaje de mortalidad en esta etapa se encuentra entre el 1 y 5% de los casos, con una mayor incidencia en niños de corta edad y en pacientes que presentan cardiomiopatía puede alcanzar hasta un 50% de los casos.

Drogas utilizadas en la infección con *T.cruzi*

Actualmente existen dos drogas disponibles contra la infección de *T. cruzi*. Las mismas son benznidazole (la más utilizada) y nifurtimox (no es comercializada en todos los países de Sudamérica).

Estas drogas han probado su eficacia en el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad. En cuanto a la fase indeterminada, cuando las personas infectadas no presentan sintomatología, el tratamiento con las mismas lleva a una parasitemia negativa en aproximadamente un 70% de los casos, aunque en la mayoría de ellos la serología permanece positiva (Sosa Estani et al., 1998). También se ha demostrado que el tratamiento de pacientes jóvenes y adultos en la etapa crónica de la enfermedad, induce cambios favorables en el tratamiento de la miocarditis, sugiriendo que las mismas poseen un efecto protector dado que cualquier actividad antiparasitaria impediría la evolución clínica desencadenada por los microorganismos (Neto, 1999; Viotti et al., 1994). Generalmente existe muy buena reacción al tratamiento, si este es realizado en la primera década de vida llevando a la cura en algunos casos o eliminando el riesgo de desarrollar alteraciones viscerales en etapas más adelantadas de la enfermedad (Viotti et al., 1994). Otros investigadores dudan todavía de las bondades de estas drogas en las fases indeterminada y crónica de la enfermedad. Es difícil atribuirle a estas drogas una cura definitiva dado que la serología se mantiene positiva y la falta de progresión en las alteraciones electrocardiográficas como indicio determinante de la curación, puede ser una apreciación falaz, debido a que un alto porcentaje de personas permanece en estas condiciones, sin progresión de la enfermedad y sin tratamiento alguno.

Dado que la enfermedad de Chagas, así como también la enfermedad del sueño en Africa, son enfermedades que afectan a grupos poblacionales que viven en la pobreza, las empresas farmacéuticas no han tenido mucho interés en desarrollar nuevas drogas. Es por esto que a pesar de la alta toxicidad y de no haber sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration), benznidazole y nifurtimox desarrolladas en los años '60 son las únicas drogas que existen actualmente para el tratamiento de esta patología. Los efectos colaterales son variados e importantes e incluyen manifestaciones dérmicas o gastrointestinales (cólicos, náuseas, vómitos, etc) y toxicidad del sistema nervioso central (irritabilidad, insomnio, cefalea, anorexia). Estos efectos impiden tratamientos prolongados y están relacionados con la dosis y la edad de los pacientes, siendo mucho mejor toleradas en niños y bebés que en adolescentes y adultos.

Desde el año 1994, el programa de control de Chagas en Argentina ha recomendado el uso de estas drogas en las siguientes situaciones: a) todos los pacientes que atraviesan por la fase aguda de la enfermedad, b) personas jóvenes y adultas en la etapa indeterminada, c) adultos con lesiones incipientes en miocardio y d) personas receptoras y dadoras de transplantes.

Hasta el día de la fecha se han detectado más de 3 millones de personas infectadas con *T. cruzi* en nuestro país. La mayoría de los tratamientos en la fase crónica de la enfermedad están dirigidos principalmente a atenuar la sintomatología más que a una cura y por otro lado no existen tratamientos que sean efectivos en esta etapa de la enfermedad. En el caso de otros trypanosomas como *T. brucei*, las terapias existentes son muy onerosas o en el caso de las *Leishmanias*, rápidamente aparecen parásitos resistentes a la droga utilizada (Gustafsson et al., 1987).

Es por esto que es necesario de manera urgente el desarrollo de nuevas drogas farmacológicas para los tratamientos de estas enfermedades.

Características genómicas de los trypanosomas

Cromatina y cariotipo

Los trypanosomas se caracterizan por no condensar sus cromosomas en mitosis y porque la misma procede sin ruptura de la envoltura nuclear. Se ha sugerido que la falta de condensación cromosómica se debe a que la histona H1 presente en estos parásitos, interactúa débilmente con los nucleosomas dado que su secuencia corresponde a la mitad C-terminal de su contraparte en humanos (Sabaj et al., 2001). Se ha propuesto que esto les permitiría adaptarse rápidamente a los cambios del ambiente, a los cuales se encuentran sujetos a lo largo de su ciclo de vida. Una cromatina menos compacta podría acomodar una respuesta rápida de expresión génica generada a partir de señales externas (Belli, 2000).

Por el hecho de que estos organismos no condensan sus cromosomas ha sido difícil interpretar el grado de ploidía de los mismos. Esto ha sido facilitado con la técnica conocida como electroforesis en campo pulsado (PFGE). Mediante esta técnica, *T. cruzi* presenta aproximadamente entre 30 y 40 bandas cromosómicas cuyos tamaños se encuentran entre 0.45 y 4 Mb. La intensidad observada en algunas de ellas es mayor que en otras, sugiriendo que existen cromosomas que comigran (Henriksson et al., 1995). Un cálculo realizado eligiendo un standard de intensidad establecido a partir del área de una de las bandas, arrojó que los cromosomas serían aproximadamente entre 64 y 80 (o 32-40 pares) por epimastigote (Cano et al., 1995; Henriksson et al., 1995). Al contrario de lo que sucede en *T.*

cruzi, *T. brucei* posee sus cromosomas agrupados en tres tamaños: ~100 minicromosomas (50-150 kb), muchos de los cuales poseen uno o dos genes correspondientes a la glicoproteína variable de superficie (VSG), sin otra potencial secuencia codificante y para los cuales es difícil definir la ploidía; cromosomas intermedios (200-900 kb), su ploidía también es incierta y los mismos poseen los sitios de expresión de los genes de VSG y los megacromosomas (desde 1 a > 6 Mpb), en los cuales se observó que los cromosomas homólogos no poseen el mismo tamaño y aquellos que comigran en PFGE no necesariamente son homólogos, por lo que también es difícil cuantificarlos (Belli, 2000). El proyecto genoma estableció que al menos existen en este organismo 11 pares de cromosomas (Melville et al., 1998). En el caso de *Leishmania* se ha establecido que las mismas poseen 36 cromosomas entre 0.3 y 2.5 Mb (Wincker et al., 1996).

Secuencia telomérica y telómeros

La primera secuencia telomérica descrita en estos organismos se obtuvo a partir del clonado de un extremo cromosómico por dos grupos de trabajo en el año 1984 en *T. brucei* (Blackburn and Challoner, 1984; Van der Ploeg et al., 1984). Siendo la misma (5'-TTAGGG-3') igual a la de vertebrados. Utilizando en ensayos de "southern-blot" una sonda complementaria a esta secuencia, se estableció que la misma hibridiza con ADN de otros organismos flagelados como: *Euglena*, *Crithidia fasciculata*, *Leishmania*, *T. cruzi*, *Leptomonas*, con la excepción de *Giardia* y *Trichomonas* (Blackburn and Challoner, 1984). Se concluyó así, que los mismos poseen la misma secuencia telomérica. Pero llevó más de 10 años para que la secuencia telomérica de algunos de estos otros organismos fuera

corroborada de manera más directa (este trabajo y (Freitas-Junior et al., 1999)).

La región telomérica doble cadena de *T. brucei* contiene entre 1-10 kb. En *T. cruzi* existen dos grupos de parásitos diferenciados en base a la longitud de sus telómeros. Un grupo posee la región doble cadena corta y homogénea en tamaño, entre 0.5 y 1.5 kb y el otro grupo posee sus telómeros con una distribución más heterogénea de mayor tamaño oscilando entre 1 y > a 10 kb. Esto sugiere que la regulación de la longitud telomérica es distinta entre ellos. En general, las cepas que pertenecen a un determinado grupo por su longitud telomérica, pertenecen al mismo grupo definido por otros criterios, pero existen cepas que no siguen esta regla, de modo que se requieren más estudios para establecer si esta característica convergió en alguna de estas cepas después de que las mismas se separaron evolutivamente (Freitas-Junior et al., 1999). En cuanto a la longitud del 3' "overhang", sólo se conoce el de *T. brucei*. El mismo se determinó por unión de la proteína SSB (single strand DNA binding protein de *E. coli*) dado que un tetrámero de la misma se une a aproximadamente a ~75 nts. Con esta metodología se observó que los cromosomas de *T. brucei* contienen en sus dos extremos un "overhang" de ~75-225 nts (Muñoz-Jordán et al., 2001). Otra prueba de que los "overhangs" están presentes en los cromosomas de estos organismos, provino de la descripción reciente de la presencia de "t-loops", realizado por el grupo de de Lange. Los autores detectaron estos "loops" por microscopía electrónica en los extremos de los cromosomas (megacromosomas e intermedios) de *T. brucei* y también en ambos extremos de los minicromosomas (Muñoz-Jordán et al., 2001).

En el año 1983 el grupo de Piet Borst estudiando los minicromosomas de *T. brucei*, descubrió que sus telómeros se elongan cuando los parásitos se mantienen en ratones. La velocidad de crecimiento

establecida en este trabajo y otro posterior, es de aproximadamente 6 a 10 bases por división celular (Bernards et al., 1983; Van der Ploeg et al., 1984). Para ese entonces todavía no se había descrito aún, ninguna telomerasa y no se sabía cuáles eran los mecanismos de replicación telomérica. En el año 2000 se realizó un estudio en el mismo organismo, para establecer cuáles son los requerimientos para la formación de un nuevo telómero. Se demostró que los mismos se producen principalmente en moléculas de ADN artificialmente introducidas que terminan en repeticiones teloméricas. Todas las moléculas de ADN que recuperan poseen una longitud telomérica más extensa de la esperada con respecto a los otros telómeros, debido a una rápida y preferencial elongación del telómero recién formado. A medida que el nuevo telómero se va acercando a la longitud de los demás, la velocidad de crecimiento disminuye. Se cree que esto se debe a un mecanismo de conteo como el que existe por ejemplo en levaduras, donde a medida que la longitud del telómero aumenta, existen más sitios de unión de la proteína Rap1 la cual impide el acceso de la telomerasa al telómero (Marcand et al., 1997). Aunque estos autores no pueden descartar que el crecimiento rápido del nuevo telómero se deba a mecanismos de recombinación, la velocidad y cinética de las elongaciones teloméricas descritas en este último trabajo y en estudios previos, son consistentes con una elongación llevada a cabo por la telomerasa y concuerdan con la existencia de actividad de esta enzima, la cual fue recientemente detectada en este organismo y en otros trypanosomátidos relacionados (Muñoz and Collins, 2001 y (Cano et al., 1999)).

Los telómeros de estos organismos y en particular en el caso de *T. brucei*, son muy importantes porque es allí donde se encuentran los sitios de expresión de los genes de las proteínas VSG (variant surface glycoproteins) responsables de la alta variación antigénica de estos

parásitos. Existen más de 100 copias de estos genes asociadas a los telómeros en los minicromosomas, copias internas en los otros cromosomas y más de 20 copias en los telómeros de los megacromosomas. Lo sorprendente es que los telómeros de estos últimos son los encargados de dirigir la expresión de estos genes pero sólo uno de ellos es activo en una población en un momento determinado. Sería muy interesante establecer por qué uno solo de ellos es activo y cómo hacen estos organismos para silenciar las otras 19 copias en un contexto cromático muy similar, dado que son todos telómeros (Borst et al., 1998; Rudenko et al., 1998).

Objetivos

El primer objetivo de este trabajo fue conocer si organismos tan antiguos como los kinetoplástidos poseían la enzima telomerasa como mecanismo de mantenimiento de la estructura telomérica para sostener la ilimitada capacidad de replicación de los mismos. Esta enzima ya había sido descrita en otros organismos que divergieron más recientemente y aunque no es el único, es el mecanismo evolutivamente más extendido.

Luego de haber detectado la actividad de telomerasa en estos organismos decidimos centrarnos en el estudio de la telomerasa de *T. cruzi*, organismo patógeno de suma importancia en nuestro país. El objetivo fue conocer si la enzima estaba presente en los distintos estadios del ciclo de vida de este parásito y estudiar las características bioquímicas de la enzima en la forma epimastigote. Estas características nos permitirían compararla con las enzimas de otros organismos filogenéticamente no relacionados, incluyendo a la de los humanos, dado que elucidando las diferencias y similitudes con esta enzima presente en las células que hospedan a este parásito, contribuiríamos al diseño de nuevos agentes terapéuticos dirigidos específicamente contra la telomerasa del parásito sin afectar significativamente a la telomerasa humana.

La telomerasa es una transcriptasa reversa muy particular dado que el ARN que le sirve de templado para sintetizar las repeticiones teloméricas es parte integral de la enzima y sólo una región muy bien acotada de este ARN es la utilizada para tal fin. La pregunta que surge cuando uno estudia estas enzimas es: las telomerasas han evolucionado a partir de transcriptasas reversas virales o a partir de complejos ribonucleoproteicos que

divergieron en dos ramas dando lugar a las transcriptasas reversas virales y a las telomerasas con especializaciones características de cada una de ellas?

Con el fin de descifrar la estructura de la enzima de estos parásitos, el objetivo de este trabajo fue clonar los genes correspondientes a la subunidad catalítica y de la molécula de ARN. Esto nos permitiría realizar ensayos comparativos con otras telomerasas y con transcriptasas reversas.

Además, ensayos de mutagénesis nos permitirían resolver la cuestión planteada más arriba y estudiar las interacciones existentes entre la subunidad catalítica y la molécula de ARN que restringen al uso de sólo una pequeña porción del mismo para posicionar los sustratos y sintetizar las repeticiones teloméricas.

Por último, focalizamos nuestra atención en estudiar la biogénesis, ensamblado y localización de la telomerasa de *T. cruzi*.

Materiales y Métodos

Cepas de parásitos y condiciones de cultivo

Los distintos parásitos se crecieron como se describió previamente (Bontempi et al., 1984). Las cepas utilizadas fueron: epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuén, stock Tul2) y los cuatro estadios del clon CL Brener (Henriksson et al., 1995); trypomastigotes procíclicos de *T. brucei* (stock 427, provistos por el Dr. A. Uttaro), epimastigotes de *T. rangeli* (clon D 1, cepa Duarte, Provistos por el Dr. D'Alessandro); coanomastigotes de *Crithidia fasciculata* (cepa ATCC 11745, provistos por el Dr. Algranati), promastigotes de *Leishmania mexicana* (aislamiento de Costa Rica, provistos por el Dr. Zeledón) y las formas de cultivo de *Blastocrithidia culicis* (provistas por el Dr. Parodi), *Leptomonas seymouri* (provistas por el Dr. Algranati) y *Phytomonas* spp (provistas por el Dr. A. Uttaro). Las células Vero, utilizadas como control positivo para la determinación de actividad de telomerasa, fueron crecidas en MEM-Eagle.

Extractos celulares

Los parásitos se cosecharon a una densidad $\sim 8 \times 10^7$, lavaron en buffer PBS frío y resuspendieron en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 0.5% 3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propano-sulfonato (CHAPS), 1 mM EGTA, 5 mM β -mercaptoetanol, 2.5 mM PMSF (fluoruro de p-fenilmetilsulfonilo), 50 μ M E-64 (trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidino)-butano) y 10% glicerol). La suspensión fue incubada a 4°C por 30 min. y centrifugada a 40.000 x g durante 90 min. Se conservó el sobrenadante y la concentración proteica fue determinada

mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Las células Vero se cosecharon por tripsinización, lavaron y lisaron como se describió para los parásitos. El extracto de cerebro de ratón se obtuvo de acuerdo al protocolo descrito en Kim *et al* (Kim et al., 1994).

Extracto nuclear

Los parásitos se cosecharon a una densidad $\sim 8 \times 10^7$, se lavaron en buffer PBS frío y resuspendieron en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 10% glicerol). La suspensión fue incubada a 4°C por 20 min y centrifugada a $\sim 3.000 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante fue conservado y el precipitado se procesó con el mismo protocolo. El segundo precipitado obtenido se resuspendió en T2MG (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10% glicerol) más 50 mM KCl y sometió a 20 ciclos de sonicación en frío de 30 seg cada uno. Por último esta suspensión fue centrifugada 1 h a 40.000 $\times g$. El sobrenadante se alicuotó y preservó a -80°C.

Determinación de actividad de la telomerasa por el ensayo de TRAP

La actividad de telomerasa se determinó por el método de TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) (Kim et al., 1994). Un total de 6 μg de proteínas totales provenientes de los distintos extractos se incubaron en buffer Taq ADN polimerasa (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM $MgCl_2$, 63 mM KCl) suplementado con 1 mM EGTA, 0.005% Tween-20, 0.2 mM de cada dNTP, y 100 ng de primer TS (5'-

AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'). Las reacciones se incubaron 90 min a 28°C y finalizaron con un paso de desnaturalización (3 min a 94°C). Posterior a este paso las reacciones se suplementaron con 0.3 µl de (α-³²P) dGTP (800 Ci/mmol), 2.5 U Taq ADN polimerasa y 100 ng del oligonucleótido CX (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'). Los productos de la reacción de telomerasa se amplificaron mediante un paso de PCR consistente en 30 ciclos de: 30 seg a 94°C, 30 seg a 50°C, y 1.5 min a 72°C, cada uno. Los productos se resolvieron en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida en 0.6X TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA). Como controles negativos los extractos celulares se pretrataron 10 min a 70°C, o 10 min a 37°C con ribonucleasa A (ARNasa A) (1 µg/10 µl de extracto) (Sigma).

Determinación de actividad de la telomerasa por el método de extensión de primer (PE)

Un total de 10 µg de proteínas totales provenientes de los extractos se incubaron por 2 hs a 28-30°C con 1-10 µM de los distintos oligonucleótidos (los cuales se detallan en cada figura) en buffer de reacción 1X (50 mM Tris-acético pH 8.0, 10 mM espermidina, 5 mM β-mercaptoetanol, 2 mM MgCl₂). A menos que se indique lo contrario las reacciones contuvieron 200-800 µM dATP y TTP con 2-8 µM dGTP no radiactivo y 1.5 µM (α-³²P) dGTP (800 Ci/mmol, Amersham). Como control los extractos fueron pretratados por 10 min a 37°C con ARNasa A. Las reacciones finalizaron con el agregado de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y se extrajeron 2 veces con fenol:cloroformo:iso-amílico (25:24:1). Los productos se recuperaron por precipitaron con acetato de amonio 2.5 M, 1

μg LPA (poliacrilamida lineal) y etanol y se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (0.6X TBE-7M Urea).

En el caso de la determinación de actividad en los 4 estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, las condiciones de reacción fueron idénticas, con la excepción del uso de un oligonucleótido biotinilado en su extremo 5' (5'-b-(G₃T₂A)₃). Diez minutos previo a que las reacciones concluyan, se les agregó 10 μl de esferas de Estreptavidina-agarosa (Sigma). Las reacciones se detuvieron por el agregado de TE y las esferas se recuperaron por centrifugación 2 min a $\sim 3.000 \times g$ y se lavaron 2 veces con TE. Finalmente, cada reacción se resuspendió en una mezcla de proteinasa K (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% SDS, 1.5 μg proteinasa K) y se incubó 30 min a 37°C. Los productos se recuperaron por extracción y precipitación y se resolvieron como se describió en el párrafo anterior.

Como marcadores de migración de los productos de la telomerasa por este método, se utilizaron distintos oligonucleótidos (100 ng de cada uno de ellos) marcados durante 30 min at 37°C, con T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs) y 2-5 μl of (γ -³²P) ATP (6000 Ci/mmol, Amersham).

Purificación parcial de la telomerasa y estimación del peso molecular aparente del complejo ribonucleoproteico

Columnas de intercambio iónico

Las columnas de intercambio iónico DEAE-sefarosa, Mini S, High Q y Fosfo-celulosa fueron equilibradas y sembradas con distintos volúmenes

de extractos, en buffer T2MG con 50 mM KCl. Las mismas fueron eluidas con gradientes lineales o discontinuos de KCl.

Columna de afinidad

La columna de heparina-agarosa se equilibró, sembró y eluyó como se describió para las columnas de intercambio iónico.

Columna de afinidad (oligonucleótido biotinilado)

Esferas de estreptavidina-agarosa (15 μ l por reacción) se bloquearon como se describió previamente (Lingner and Cech, 1996), y se cargaron con 7 μ g de cada oligonucleótido sustituido y biotinilado como se indica en la figura respectiva. 200 μ l de extracto se llevaron a 0.4 M KCl e incubaron 15 min a 4°C en presencia de dos oligonucleótidos competidores (5'-TCCGCCTTTTTC-3' y 5'-TCCGCCTTTTTCGGGCACGGGAACG) en donde la región subrayada es 2'O-metil ARN). Se centrifugaron 15 min a 4°C a 10.000 x g. El sobrendante se colocó en contacto con las esferas bloqueadas y cargadas con los oligonucleótidos específicos e incubó a temperatura ambiente durante 90 min. Subsecuentemente, las muestras se centrifugaron 2 min a ~3.000 x g, los sobrenadantes se guardaron para determinarles actividad de telomerasa y las esferas se lavaron 5 veces en T2MG con 0.4 M KCl y una vez en T2MG en ausencia de KCl. Por último se resuspendieron en T2MG junto con 10 μ g de cada oligonucleótido eluyente y se incubaron 1 h a temperatura ambiente.

Columna de interacción hidrofóbica

La columna de fenil-sefarosa se equilibró con buffer T2MG con 2 M NaCl. Una vez unida la muestra a la columna, se realizó un lavado con el mismo buffer en ausencia de NaCl y se eluyó en un paso con T2MG con 1% Tritón X-100.

Gradientes de Glicerol

Los gradientes de glicerol se prepararon a partir de dos soluciones en buffer T2M (20 mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂) con 15% y 35% de glicerol. Una vez sembrados, los mismos se centrifugaron 20 hs a 197.000 x g a 4°C. Las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular fueron: tiroglobulina (~669 kDa), ferritina (~440 kDa), y catalasa (~240 kDa).

Filtración en gel (Superosa 6)

200 µl de extracto celular o distintas fracciones parcialmente purificadas que contenían actividad de telomerasa se sembraron en una columna Superosa 6, previamente equilibrada en buffer T2MG con 50 mM KCl.

Determinación de la secuencia del telómero en distintos trypanosomátidos

Los productos de la telomerasa provenientes de 5 reacciones de TRAP y de distintos organismos, se concentraron por precipitación con AcONH₄ y etanol a -80°C y se clonaron en el vector pGEM[®]-T-Easy (Promega) o TOPO-TA Vector (Invitrogen). Los clones con insertos se

secuenciaron por el método de Sanger usando el “kit” Sequenase Versión 2.0 (Amersham) o con secuenciador automático (Sequence facility, UC Davis).

Ensayos de Retardo en Geles (EMSA)

Distintas concentraciones de proteínas totales provenientes de los extractos, se incubaron con un oligonucleótido telomérico (T₂AG₃)₃, marcado en el extremo 5' con polinucleótido quinasa, como se describió en (Ramakrishnan et al., 1997). Para los ensayos de competencia de especificidad de unión, se agregaron a la mezcla de reacción 200 ng de un competidor específico o 200 ng de un competidor inespecífico (5'-ATAATCAAGATAATATTGTAATAA-3'), ambos no marcados. Los productos se separaron en geles de 0.8% agarosa-8% poliacrilamida (relación acrilamida:bis-acrilamida, 60:1) (Lamond and Sproat, 1994). Como controles negativos, el extracto fue pretratado con 100 µg de ARNasa A o 100 µg de Proteinasa K durante 30 min a 37°C.

Clonado del gen codificante de la subunidad catalítica de la telomerasa

Preparaciones de ARN

El ARN total de los distintos organismos se obtuvo utilizando el protocolo de TRIzol™ Reagent (GibcoBRL). Las preparaciones de ARN poli-A + se realizaron con el “kit” de QIAGEN (Oligotex ARNm kit).

Síntesis de ADNc

La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó con la enzima Superscript II (GibcoBRL), mediante el protocolo provisto por el fabricante y la purificación de la misma se realizó utilizando el “kit” GeneClean II (BIO 101).

Ensayos de PCR

Los ensayos de PCR se realizaron con oligonucleótidos degenerados (ver Tabla 6 en la sección Resultados), dirigidos contra los motivos conservados de retrotranscriptasas, sobre ADNc proveniente de ARN total o ARNm de distintos trypanosomátidos (Bryan et al., 1998; Collins and Gandhi, 1998), como molde se utilizó una alícuota (en general 1/10 de la reacción de síntesis del ADNc) de los ADNc cuya obtención se describió en el párrafo anterior. Los procedimientos se realizaron en un termociclador (PTC-100™, MJ Research, Inc) y consistieron en 4-5 ciclos a baja temperatura de hibridización y 30-40 ciclos con una temperatura de hibridización mayor. Un esquema del ciclado utilizado se detalla en la sección Resultados. En los primeros 4-5 ciclos también se utilizó en algunos casos, un incremento de la temperatura de 1°C/seg entre la temperatura de hibridización y la de polimerización.

Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos se obtuvieron con un sintetizador (392 ADN/ARN synthesizer, Applied Biosystems).

Clonado de los productos de PCR

Los productos obtenidos por PCR se resolvieron en geles de agarosa y se visualizaron por tinción con BrEt. Aquellas bandas identificadas que mostraron el tamaño esperado, fueron recortadas del gel, electroeluidas y precipitadas con acetato de sodio y etanol o purificadas con el “kit” de QIAGEN (para productos de PCR a partir de geles de agarosa). Una vez obtenido el ADN para clonar, se digirió con las correspondientes enzimas de restricción (New England Biolabs) según instrucciones del comerciante y se ligó durante toda la noche a 16°C en presencia de 400U T4 ADN ligasa y el vector correspondiente (pBluescript).

Identificación y clonado del ARN de la telomerasa.

Preparaciones de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de extracto celular y de fracciones parcialmente purificadas de la telomerasa utilizando una mezcla de fenol:cloroformo: isoamílico como se describe en (Sambrook et al., 1989) o con el protocolo de isotiocianato de guanidinio según se describe en Ausubel *et al* (Ausubel et al., 1996).

Northern-blots

Electroforesis y transferencia. ARN total o proveniente de distintas fracciones de la telomerasa se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6% acri:bis, 0.6X TBE, 7M Urea). Los mismos se transfirieron a filtros de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia) con un

equipo GeneTransfer (Idea Scientific) durante 45 min a 0.95 mA. Las membranas se irradiaron con UV en un horno Stratalinker.

Condiciones de hibridización. Los filtros se prehibridizaron a 37°C en una solución de 6X SSC, 4X Denhardts, 0.1% SDS durante 1h en horno rotatorio. Luego se agregó la sonda (25 ng (~75 μ Ci) del oligonucleótido marcado con polinucleótido quinasa) y se hibridizó en la misma solución a idéntica temperatura, durante toda la noche. Los lavados consistieron en 1) enjuague, 2) lavado por 10 min, 3) enjuague, 4) lavado por 10 min, y 5) enjuague, todos realizados a la misma temperatura de hibridización y en una solución de 3X SSC, 0.1% SDS.

Síntesis de la primera hebra del ADNc

Como se mencionó para el clonado de la subunidad catalítica de la telomerasa la síntesis se realizó con la enzima Superscript II a distintas temperaturas según se utilizaran oligonucleótidos específicos o random primers (hexámeros).

Agregado de nucleótidos en el extremo 3' de los ARNs con las enzimas poli A polimerasa y nucleotidil terminal transferasa (TdT)

Poli A polimerasa. Los ARNs se solubilizaron en buffer para poli A polimerasa (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 100 μ M ATP o CTP, 50 ng/ μ l BSA), se les agregó 1-2 U de poli A polimerasa, e incubaron 15 min a 37°C.

Nucleotidil Terminal Transferasa. La primera hebra del ADNc se resuspendió en buffer 1X para TdT (Promega), con el agregado de 50

$\mu\text{g/ml}$ BSA. En presencia de $20 \mu\text{M}$ del deoxinucleótido o dideoxinucleótido utilizado y 10U de TdT se incubó a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo por calentamiento 10 min a 75°C .

Eliminación del grupo fosfato del 5' de los ARNs

Las distintas preparaciones de ARN se resuspendieron en buffer 1X para fosfatasa alcalina (CIP) y se les agregó 1U de CIP e incubaron 1 h a 37°C .

Fosforilación del extremo 5' de los ARNs

Se utilizó el mismo protocolo y condiciones que las utilizadas para el marcado de los oligonucleótidos.

Tratamiento de los ARNs con ARNasa H

Los ARNs se incubaron con 10 o $50 \mu\text{M}$ de un oligonucleótido telomérico $(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ complementario al molde del ARN o $50 \mu\text{M}$ de un oligonucleótido inespecífico (5'-ATAATCAAGATAATATTGTAATAA-3'), durante 10 min a 30°C , luego se digirieron con ARNasa H 1h a la misma temperatura como se describe en (Shippen-Lentz and Blackburn, 1990).

Ligación de un oligonucleótido al extremo 3' de ácidos nucleicos de simple cadena

Se incubaron los ARNs/ADNc de simple cadena con el oligonucleótido fosforilado en el 5' en presencia de buffer 1X para ARN ligasa (50 mM Hepes, pH 8.3, 10 mM MgCl_2 , 3.3 mM DTT) con 15% de

glicerol, ARNsin (inhibidor de ARNasa), 6 μ M ATP y ~2.5U ARN ligasa, a 4°C durante 16 hs.

Ensayos de cross-linking en presencia de psoraleno

Las reacciones de actividad (por el método de PE) se realizaron con distintas fracciones de la telomerasa con sólo dos nucleótidos (dGTP (radiactivo y no radiactivo) y dATP) (la concentración de los nucleótidos utilizados fue idéntica a la que se utilizó en los ensayos de actividad por PE) y 5 μ M del oligonucleótido (5'-AGCCTCACGAGCAGGGTT-3') y 10 μ M de un oligonucleótido inespecífico (5'-AGCCTCACGAGCACTGCA-3'). Una vez finalizadas las reacciones se les agregó 1 μ l de una solución 10 mg/ml AMT (4'-aminometiltrioxsaleno) (en 100% DMSO) (Sigma) y se irradiaron con una lámpara UV a longitudes de onda superiores a 300 nm durante 30 min en frío. Las reacciones se detuvieron por el agregado de TE y los productos se extrajeron y precipitaron como se describió previamente para las reacciones de determinación de actividad realizadas por el método de PE.

Inmunoprecipitación

Anticuerpos anti-La de *T. brucei* recombinante producidos en conejo o suero preinmune, se unieron a esferas de Proteína A-sefarosa en presencia de buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 200 mM NaCl, 0.1% NP-40, 10 % glicerol, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) y bloqueantes: 20 mg/ml BSA, 20 mg/ml caseína, 10 mg/ml glucógeno y 10 mg/ml ARNt. Se incubaron con agitación durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con buffer sin bloqueantes, el

último lavado se realizó con el mismo buffer conteniendo 150 mM KCl en lugar de 200 mM NaCl. Los extractos se llevaron a 150 mM KCl e incubaron con las esferas con el anticuerpo previamente acoplado, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. El primer sobrenadante se recuperó para determinar la actividad de telomerasa y las esferas se lavaron 4 veces con el último buffer, seguido por un lavado de buffer sin sal y se resuspendieron en este último buffer. En el caso de inmunoprecipitaciones múltiples a partir del mismo extracto, el primer sobrenadante obtenido después de la primera incubación del extracto con el anticuerpo fue colocado en contacto con esferas cargadas con nuevo anticuerpo y así sucesivamente.

Resultados

Caracterización bioquímica

Detección de la actividad de telomerasa en kinetoplástidos relacionados

Hasta el año 1996 cuando comenzamos este trabajo, se habían detectado muy pocas telomerasas (Cohn and Blackburn, 1995; Greider and Blackburn, 1985; Morin, 1989). Sabiendo que las formas replicativas de los kinetoplástidos pueden llevar a cabo múltiples divisiones, supusimos que tenía que existir algún mecanismo que mantuviese la longitud telomérica de estos organismos. Por otro lado sabíamos que los telómeros de *T. brucei* mantenido en ratones, crecían a una velocidad de entre 6-10 bases por generación (Bernards et al., 1983). Esto sugería que probablemente fuese una telomerasa en lugar de un mecanismo de recombinación el que elongase los telómeros. Fue así como optimizamos la determinación de telomerasa en extractos realizados con CHAPS provenientes de distintos parásitos.

En el año 1994, Kim *et al* desarrollaron un método muy sensible para detectar la actividad de telomerasa llamado TRAP. En la Figura 12 se esquematiza dicho protocolo. Dado que la secuencia telomérica de los trypanosomátidos es la misma que en humanos, no fue necesario modificar la secuencia en los oligonucleótidos del ensayo. La telomerasa al copiar el templado en su molécula de ARN agrega 6 nucleótidos y luego reposiciona el sustrato agregando otros 6, obteniéndose de este modo, una escalera de productos de ADN cuyas longitudes difieren entre sí en 6 bases.

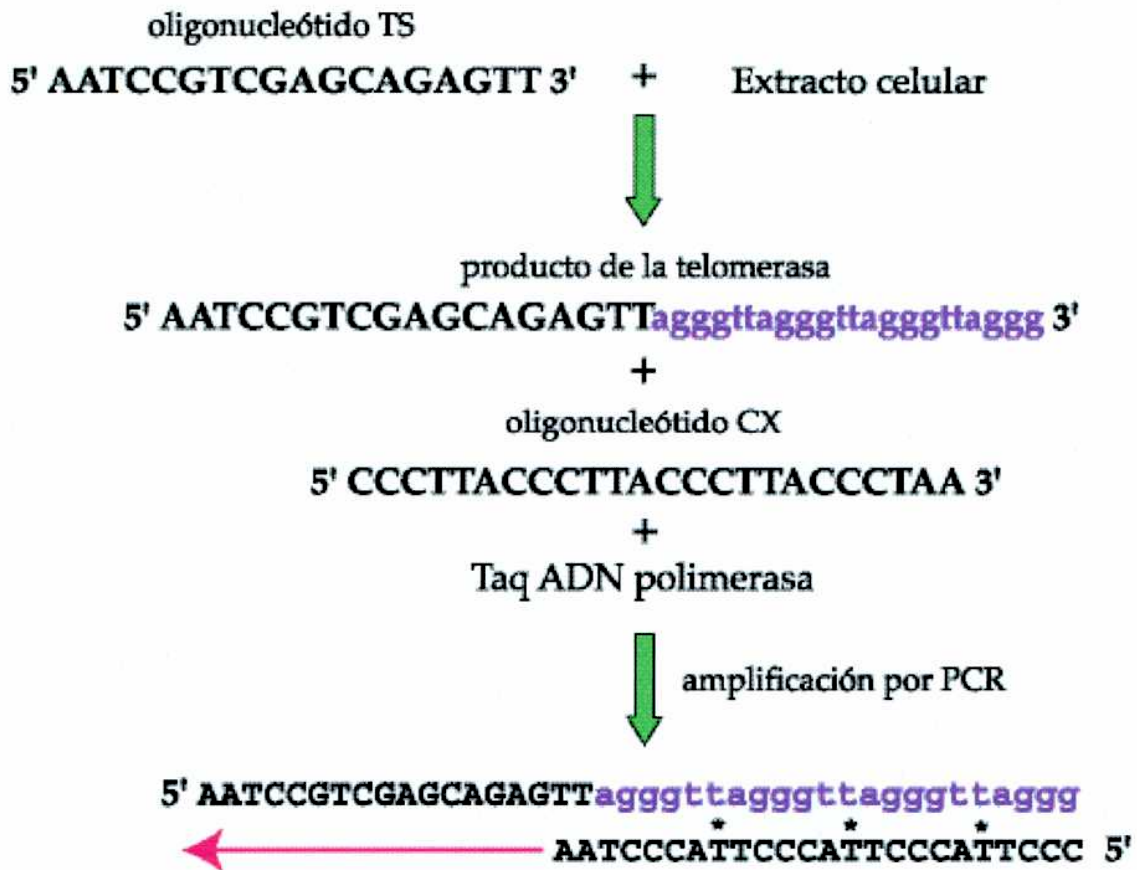


Figura 12: Esquema de determinación de actividad de la telomerasa por el método TRAP.

La Figura 13A muestra la actividad de telomerasa detectada en epimastigotes de *T. cruzi* con los respectivos controles. La actividad es totalmente dependiente de la presencia del oligonucleótido sustrato (TS) (calle 3), es inhibida si el extracto es pretratado con ARNasa (efecto característico que se observa con las telomerasas) (calle 2) o desnaturalizado por calor (calle 4). Como controles positivo y negativo se utilizó un extracto de células Vero (calle 5) y un extracto de cerebro de ratón (calle 6), respectivamente. También detectamos actividad de la enzima en extractos nucleares y en dos extracciones citoplasmáticas sucesivas realizadas con NP-40 (Figura 13B). Cabe destacar que el ensayo de TRAP es muy sensible a inhibidores que se encuentran en los extractos,

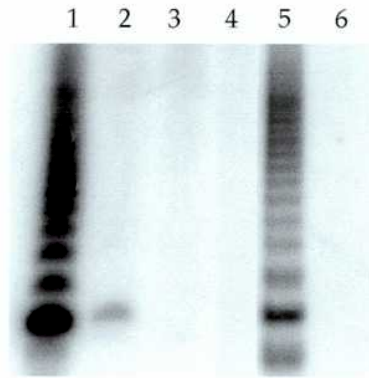
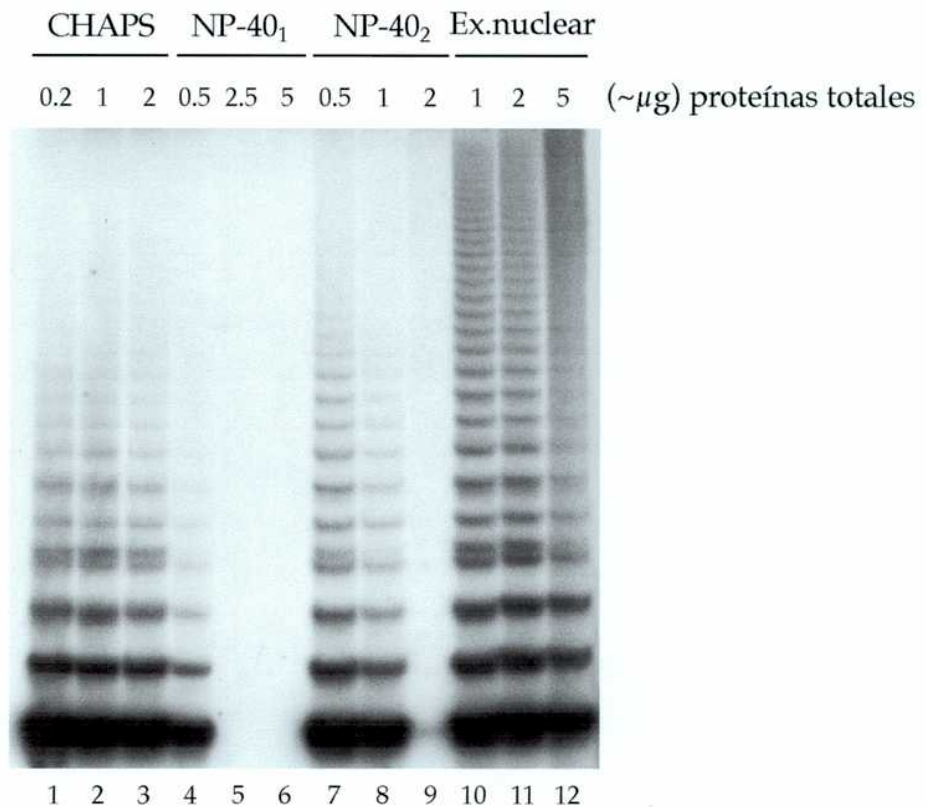
A**B**

Figura 13: Detección de la actividad de la telomerasa de *T. cruzi*. A: Determinación de la actividad de la telomerasa por el método de TRAP en extractos de epimastigotes realizados con CHAPS. Calle 1: extracto. Calle 2: pretratamiento del extracto con ARNasa A. Calle 3: sin el agregado del oligonucleótido TS. Calle 4: inactivación del extracto con calor. Calle 5: extracto de cerebro de ratón. Calle 6: extracto de células Vero. B: Detección de la actividad de la telomerasa en extractos realizados con CHAPS (calles 1 a 3), NP-40 (primera extracción calles 4 a 6, segunda extracción, calles 7 a 9) y extracto nuclear (calles 10 a 12).

es así que a una mayor concentración del mismo, da lugar a una menor actividad de telomerasa debido a la inhibición de la enzima Taq ADN polimerasa. Por ejemplo, cuando se compara la actividad del extracto realizado con NP-40, cuya concentración proteica fue aproximadamente 5 veces mayor que la obtenida con CHAPS (comparar calles 1 a 3 con 4 a 6). En los ensayos correspondientes al extracto nuclear (calles 10 a 12), la procesividad de la enzima es notoriamente mayor. Esto puede atribuirse a la pérdida de algún factor de regulación negativo por el grado de purificación alcanzado), o porque la Taq ADN polimerasa se encuentra en mejores condiciones de reacción debido a una concentración proteica óptima concomitantemente con una disminución de posibles inhibidores del extracto (comparar calles 1, 4, 7 y 10).

Una vez detectada la actividad enzimática en este parásito, decidimos ver si la enzima estaba presente en otros organismos relacionados. En la Figura 14 se muestran las actividades de telomerasa presentes en extractos de *Blastocrithidia culicis* (calle 1), *Crithidia fasciculata* (calle 2), *Leptomonas seymouri* (calle 3), *Phytomonas* spp (calle 4) y *Trypanosoma rangeli* (calle 5). En todos estos casos la actividad exhibe un patrón específico a cada organismo, el cual refleja seguramente características particulares de cada enzima y factores asociados, además la reacción resultó sensible al tratamiento con ARNasa (datos no mostrados). También detectamos actividad de telomerasa en las formas trypomastigotes procíclicos de *T. brucei* y muy débilmente en promastigotes de *L. mexicana* (datos no mostrados). Estos resultados junto con los descritos en (Cano et al., 1999), demuestran que todos los kinetoplastidos poseen a la enzima telomerasa como mecanismo fundamental para mantener la longitud de sus telómeros.

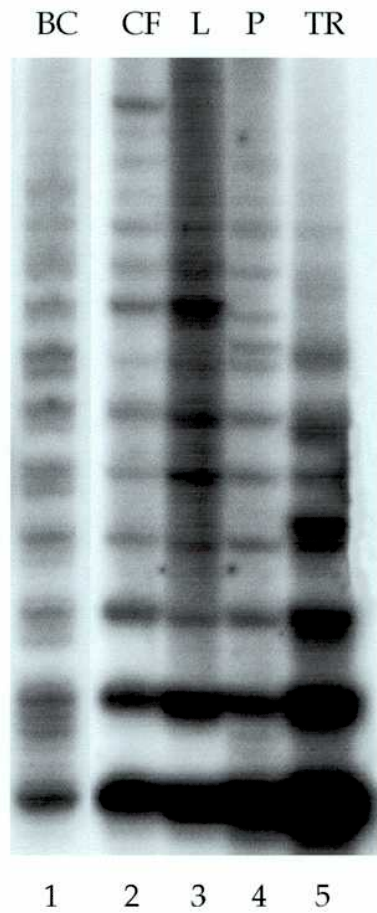


Figura 14: Detección de actividad de telomerasa por el método de TRAP en distintos kinetoplástidos. BC: *B. culicis*, CF: *C. fasciculata*, L: *L. seymouri*, P: *Phytomonas* spp, TR: *T. rangeli*.

Detección de la actividad de telomerasa en el ciclo de vida de *T. cruzi*

Dado que *T. cruzi* posee cuatro estadios en su ciclo de vida, nos interesó establecer si la actividad de telomerasa estaba presente en todos ellos o limitada sólo para las formas replicativas. La actividad enzimática fue determinada por el método de extensión de un oligonucleótido (primer extension: PE) en presencia de dATP/TTP/dGTP y ^{32}P dGTP. La Figura 15A, muestra la actividad en tres de las cuatro formas (E, TM y A, calles 2, 6 y 8). En el caso de los trypomastigotes sanguíneos (calle 4, TS) la actividad fue escasamente detectable. En todos los ensayos la actividad fue sensible al tratamiento con ARNasa (calles impares). Es importante destacar que el método de PE, tuvo que ser modificado con respecto al protocolo usualmente utilizado, dado que estas formas del parásito fueron congeladas previo a la lisis, lo que incrementó el “fondo” de la reacción. Para resolver esto utilizamos en lugar de un oligonucleótido común, uno sustituido con biotina en el extremo 5', que nos permitió una vez concluida la reacción de actividad de la telomerasa, unir los productos a esferas de estreptavidina-agarosa y lavarlos antes de precipitarlos (ver detalles en Materiales y Métodos). El método de PE es menos sensible que el de TRAP, pero es el único método que permite caracterizar enzimáticamente a las telomerasas en cuanto a su procesividad, especificidad de sustrato, regulación por nucleótidos, etc. El mismo también permite realizar comparaciones entre ellas, debido a que el método de TRAP no ha sido desarrollado para otros organismos como las levaduras y los ciliados, donde la enzimología de sus telomerasas está ampliamente estudiada. El método de PE modificado que utilizamos para detectar la presencia de telomerasa en todo el ciclo de vida de *T. cruzi* es aún menos sensible que el

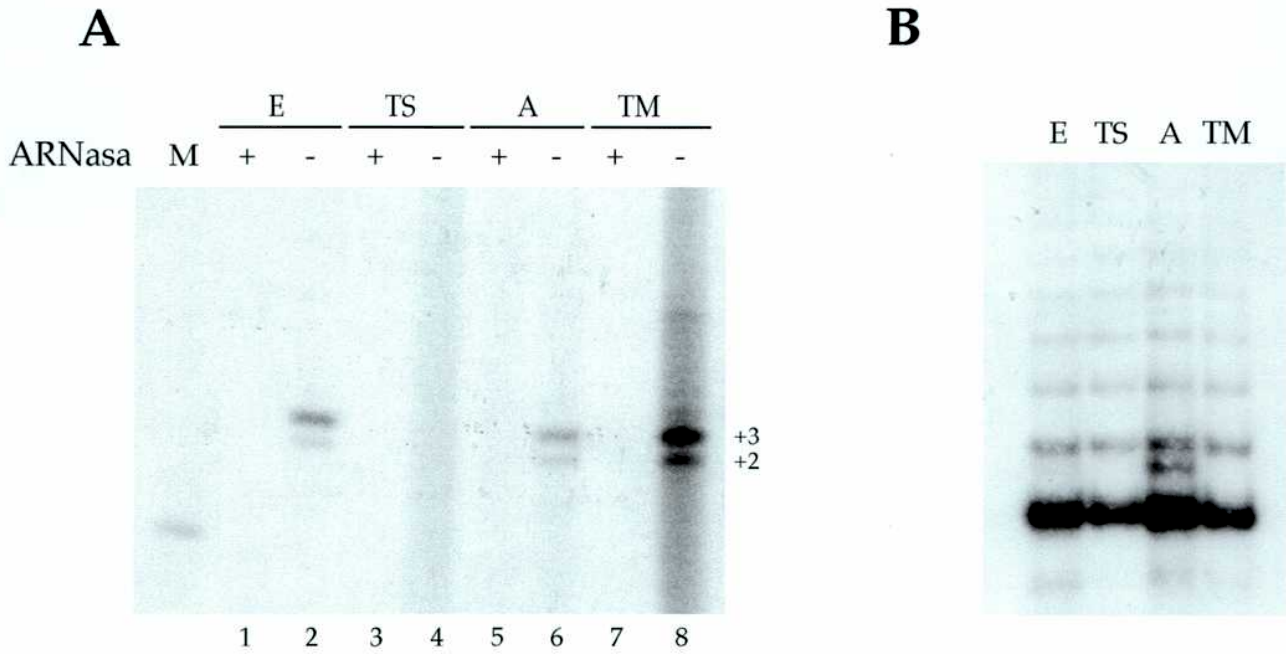


Figura 15: Detección de la actividad de telomerasa en el ciclo de vida de *T. cruzi*. A: determinación de actividad por el método de PE. B: medición de actividad por el método de TRAP. E: epimastigotes, TS: trypomastigotes sanguíneos, A: amastigotes, TM: trypomastigotes metacíclicos. M: oligonucleótido de 18 bases marcado con polinucleótido quinasa.

protocolo original, dado que generalmente el oligonucleótido no está 100% biotinilado y además durante la extracción con fenol-cloroformo, la biotina particiona en la fase fenólica. Debido a esto decidimos comprobar si la escasa actividad en trypomastigotes sanguíneos era real o artificial. La actividad fue ensayada entonces con el método de TRAP. Demostramos claramente que todos los estadios, independientemente del estado replicativo, existe actividad de telomerasa que naturalmente fue sensible al tratamiento con ARNasa (Figura 15B y datos no mostrados).

Caracterización bioquímica de la telomerasa de epimastigotes de *T. cruzi*

Baja procesividad para el agregado de repeticiones teloméricas a todas las concentraciones de dNTPs analizadas.

Todos los ensayos de actividad realizados fueron hechos, comparando el extracto total simultáneamente con una fracción parcialmente purificada de la enzima proveniente de epimastigotes de *T. cruzi* (obtenida por fraccionamiento del extracto en una columna de filtración molecular Superosa 6) con el método de PE original. Dado que no se observaron diferencias sustanciales entre una preparación y la otra en todas las condiciones probadas, sólo mostramos los resultados obtenidos con la fracción parcialmente purificada. Se probaron distintas condiciones de reacción con el fin de obtener una máxima actividad. Una de ellas, fue titular la cantidad necesaria de los tres deoxinucleótidos utilizados por esta enzima, utilizando un oligonucleótido telomérico (TAG₃T)₃ en presencia de una concentración fija de ³²P-α dGTP, variando de a un deoxinucleótido por vez y manteniendo los otros dos, a una concentración fija. La

concentración de los mismos varió entre 2 μM y 300 μM . La Figura 16 muestra los resultados de este ensayo. Para que exista incorporación de ^{32}P - α dGTP en el sustrato, se requiere que haya incorporación previa de TTP y dATP durante el copiado de la primera repetición. Como era de esperar, en ausencia de dATP (calle 1) o de TTP (calle 7) no se detectó producto marcado. Bajo condiciones estándar de reacción con 1.5 μM ^{32}P - α dGTP y 2 μM dGTP frío, el agregado de 2 μM dATP y 10 μM TTP fue suficiente para detectar la aparición de productos elongados (marcados con +5) por la telomerasa. Al igual de lo que sucede con las otras telomerasas, la afinidad de esta enzima por el dGTP es mucho mayor que la que presenta para los otros dos deoxinucleótidos (comparar calles 13-18 con 1-6 y 7-12) y un valor de K_m levemente más alto para las bases pirimidínicas (comparar calles 2 y 3 con 8 y 9), es también una propiedad que se comparte con otras telomerasas (Collins and Greider, 1993). El agregado de concentraciones crecientes de dGTP frío hacen que la actividad específica del ^{32}P - α dGTP se diluya y por lo tanto lo mismo sucede con la intensidad de la marca en los productos (calles 13 a 18). A partir de los datos obtenidos en esta figura, se ajustaron las concentraciones de los dNTPs en todos los ensayos subsiguientes.

La mayoría de las telomerasas descritas, excepto la de levaduras, pueden disociar del ARN el producto elongado y reposicionar el extremo 3' para sintetizar nuevas repeticiones teloméricas. Las telomerasas de humanos, hamster y *Tetrahymena* son moduladas en cuanto a esta procesividad para el agregado de repeticiones usando mecanismos dGTP dependientes (Hardy et al., 2000; Maine et al., 1999). Las enzimas de mamíferos (humana y hamster) son estimuladas por 50 μM y 500 μM de dGTP respectivamente, mientras que la enzima recombinante de *Tetrahymena* es estimulada por 5-10 μM de dGTP y también por dGMP y

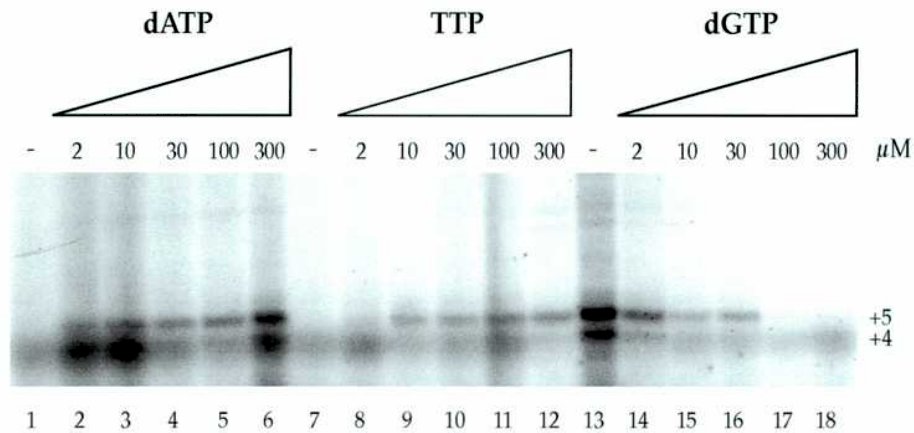


Figura 16: Titulación de la concentración de los tres deoxinucleótidos utilizados por la telomerasa de *T. cruzi*. Calles 1 a 6: dATP. Calles 7 a 12: TTP. Calles 13 a 18: dGTP. Concentraciones 0, 2, 10, 30 100 y 300 μM respectivamente.

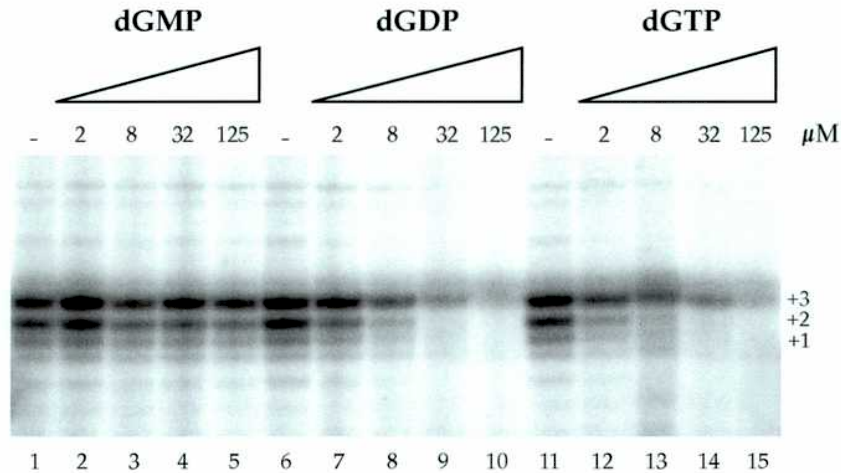


Figura 17: Ausencia de efecto estimulador en la actividad de la telomerasa de *T. cruzi* por dGTP y los análogos mono y di-fosfato. Determinación de la actividad por el método de PE con concentraciones crecientes de dGMP/ dGDP/ dGTP.

dGDP sin disminuir la actividad específica del ^{32}P - α dGTP. Para establecer si el dGTP o los análogos mono y di-fosfato, podían estimular la procesividad del agregado de repeticiones de la enzima de *T. cruzi*, determinamos la actividad por el método de PE usando concentraciones crecientes de estos tres nucleótidos en presencia de una concentración fija de ^{32}P - α dGTP. En la Figura 17 mostramos los resultados de este ensayo. Como describimos previamente (Figura 16), a medida que la concentración de dGTP aumenta, la actividad específica de este nucleótido radiactivo disminuye, por lo tanto se aprecia una disminución de la incorporación de ^{32}P - α dGTP al sustrato (calles 11 a 15). Aunque en menor grado, concentraciones altas de dGDP también inhibieron la incorporación de ^{32}P - α dGTP (calles 8 y 9) e inversamente a lo que sucede con la enzima de *Tetrahymena*, el aumento de la concentración de dGMP no interfirió con la adición de dGTP (dGTP radiactivo más no radiactivo = $6.5 \mu\text{M}$ final) y aún en concentraciones mucho mayores (calles 4 y 5). Algunos métodos de purificación parecen estimular levemente la procesividad para el agregado de repeticiones (por ejemplo empleando un oligonucleótido biotinilado en la purificación enzimática, como se describe más adelante). Sin embargo, los productos que se obtienen predominantemente en todas las reacciones son aquellos en los cuales se completó la síntesis de la primera repetición (en este caso la banda correspondiente a +3). Estos resultados nos llevan a concluir que para esta enzima no existe un aumento en la procesividad para el agregado de repeticiones por dGTP ni sus dos análogos, como así tampoco modificación del patrón de agregado de bases en una misma repetición, en ningún caso.

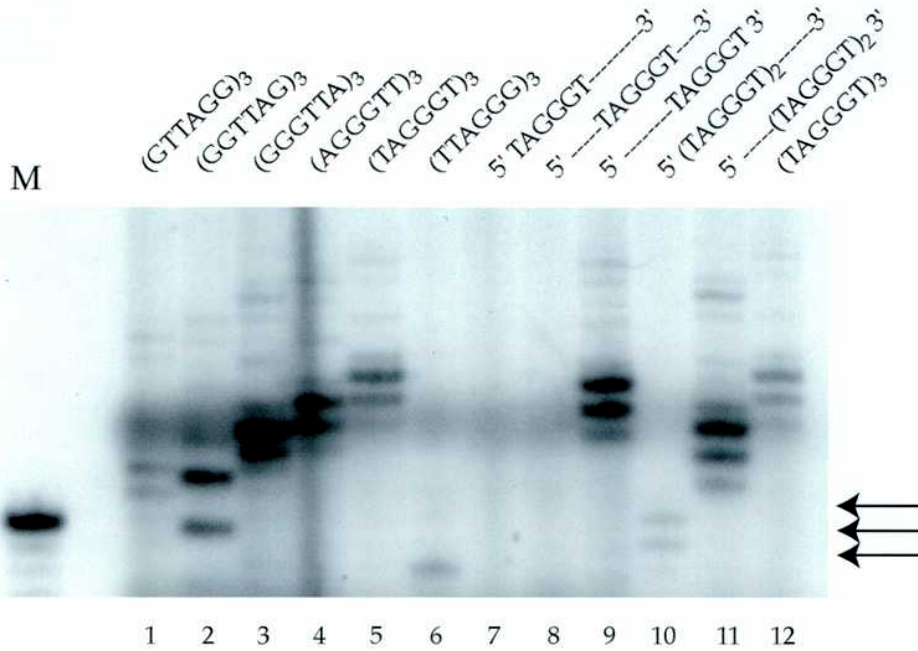
Una de las principales conclusiones que se desprende de todos estos resultados es que la telomerasa de *T. cruzi* posee una procesividad intrínsecamente baja para el agregado de repeticiones.

Requerimiento de secuencia en los sustratos de ADN. Las telomerasas descritas hasta el momento son distintas, en cuanto a la sensibilidad a variaciones en diferentes regiones de sus sustratos: extremo 5', potencial hibridización con el ARN, y permutaciones en el extremo 3'. Mientras que todas las telomerasas extienden sustratos de ADN simple cadena compuestos por repeticiones teloméricas específicas de cada especie, las enzimas de la mayoría de los organismos pueden también elongar sustratos de ADN con secuencias degeneradas ricas en TG o inclusive oligonucleótidos completamente no teloméricos con una eficiencia sorprendentemente alta (Wang and Blackburn, 1997). Esto refleja los requerimientos fisiológicos para una actividad de telomerasa en la formación de nuevos telómeros como así también de telómeros ya establecidos (Shippen, 1993). La especificidad de la interacción con el sustrato de ADN *in vitro*, está dada por una combinación entre la hibridización con el templado y la asociación del sustrato con el/los sitio/s de anclaje/s. Las telomerasas descritas hasta el momento, varían desde una absoluta dependencia de la hibridización del extremo 3' del sustrato con el templado (Lingner and Cech, 1996), a la dependencia de la presencia de un cassette telomérico interno rico en Gs que contribuye a la interacción con el sitio de anclaje (Shippen-Lentz and Blackburn, 1989), al requerimiento de solo una longitud mínima de secuencia que puede ser telomérica o no (Wang and Blackburn, 1997). Las telomerasas que poseen una gran dependencia de la hibridización con el templado para unirse a su sustrato, también poseen una mayor sensibilidad a la variación de la secuencia telomérica en los mismos.

Para conocer los requerimientos de secuencia que la enzima de *T. cruzi* posee en cuanto a su sustrato, utilizamos en primer lugar

oligonucleótidos de 18 bases con las seis permutaciones posibles de la secuencia telomérica TTAGGG. Como se observa en la Figura 18A (mitad izquierda), todos estos oligonucleótidos son elongados por la enzima aunque algunos de ellos con mayor eficiencia que otros, con una preferencia para aquellos sustratos que no terminan en G (comparar calles 1, 2, 6 con 3,4,5). Los productos obtenidos con los oligonucleótidos que terminan en G son atípicos y se observa poca actividad con el sustrato (GTTAGG)₃, un patrón aberrante con (GGTTAG)₃ y actividad casi indetectable con (TTAGGG)₃. Cuando se utilizó extracto crudo con estos mismos oligonucleótidos, el patrón fue exactamente el mismo, con excepción del oligonucleótido (TTAGGG)₃ donde la actividad resultó mayor, pudiéndose observar la banda correspondiente al agregado del sexto nucleótido (+6) (datos no mostrados). Los sustratos con las permutaciones en el extremo 3' G₃T₂A, AG₃T₂ y TAG₃T (calles 3 a 5) fueron extendidos eficientemente con el agregado de 3, 4 y 5 nts respectivamente. Esto representa la síntesis para completar la permutación TTAGGG-3' (ver esquema (Figura 18B) de la hibridización entre los sustratos utilizados en este ensayo y el ARN de la telomerasa de *T. cruzi*) como se describió previamente para la enzima de *T. brucei* (Cano et al., 1999) y por reacciones en las cuales se omitió uno de los deoxinucleótidos (dATP o TTP) o se utilizaron ddNTPs (datos no mostrados). El mismo patrón de productos se obtuvo con distintas concentraciones de oligonucleótidos y con oligonucleótidos provenientes de distintas síntesis. Estos resultados sugieren que existe una hibridización diferencial de las distintas permutaciones de los oligonucleótidos sustratos que afectan sustancialmente la eficiencia de elongación. Los mismos sugieren también que la permutación telomérica del templado en el ARN es 5'-CCCUAACCC-3' de manera que la síntesis

A



B

secuencia propuesta para el templado del
ARN de la telomerasa de *T. cruzi*

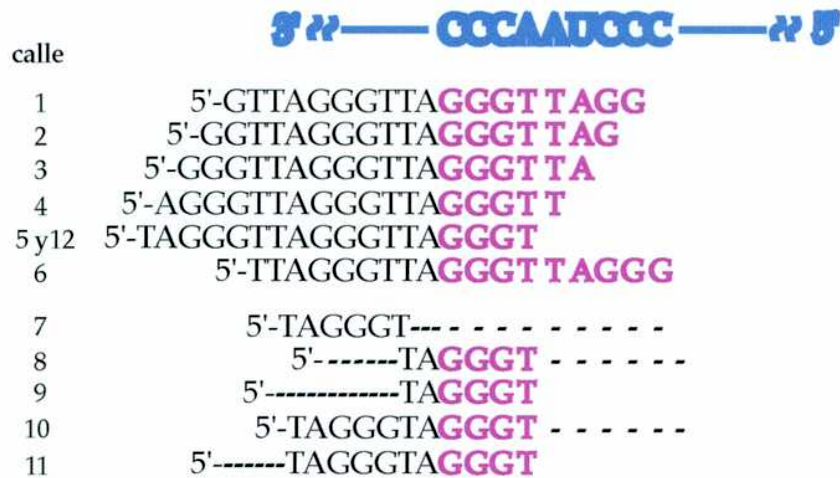


Figura 18: A: Medición de actividad de telomerasa por el método de PE con un panel de oligonucleótidos con distintas permutaciones, no teloméricos o mixtos. La diferencia de movilidad observada entre los oligonucleótidos de secuencia mixta (telomérica y no telomérica, calles 7 a 12) se debe a que los mismos poseen distinta composición nucleotídica y no a un patrón alterado en el agregado de los distintos dNTPs. Las flechas indican los productos producidos por clivaje. B: Detalle de las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el panel A con sus correspondientes hibridizaciones con el templado del ARN de la telomerasa y los productos principales de elongación obtenidos.

hacia el 5' del templado completa la síntesis de la repetición TTAGGG-3' (Figura 18B).

A continuación examinamos la dependencia de la polimerización de una o dos repeticiones teloméricas ubicadas en distintas posiciones del sustrato, acompañadas por secuencias no teloméricas. Para ello diseñamos un segundo grupo de oligonucleótidos donde cada uno de ellos posee 18 bases y los mismos contienen sólo una o dos repeticiones teloméricas (TAG₃T)_{1,2} ubicadas en el 5', en el medio o en el 3' de los mismos. En la mitad derecha de la Figura 18A se observa que existe actividad principalmente en aquellos oligonucleótidos que terminan en secuencia telomérica (calles 9, 11 y 12) pero no en los que poseen por ejemplo, repeticiones teloméricas en sus extremos 5' o internas (calles 7, 8 y 10). En el último caso (calle 10) se llega a detectar que existe elongación después del clivaje del sustrato, de manera de eliminar el extremo 3' no telomérico (productos de clivaje marcados con flechas en la Figura 18A y esquema en la parte B). Fue sorprendente observar que la presencia de sólo una repetición telomérica en el extremo 3', resulta suficiente para generar una fuerte actividad de telomerasa, y también que oligonucleótidos que no son completamente teloméricos sirvan como sustratos igual o mejor que los primeros (comparar calles 9 y 11 con 12). Esto sugiere que una repetición telomérica en el extremo 5' o interna no mejora el uso de este oligonucleótido como sustrato con respecto a un oligonucleótido que posee la misma repetición en el otro extremo. Estos resultados confirman la importancia de la hibridización con el templado más que una interacción con el sitio de anclaje en el establecimiento de la especificidad de sustrato para la telomerasa de *T. cruzi*.

Para establecer si la incapacidad de la enzima de elongar oligonucleótidos con extremos 3' no teloméricos (Figura 18A calles 7 y 8)

se debía a un problema de concentración, titulamos un oligonucleótido completamente no telomérico (TS), comparándolo con uno telomérico eficientemente elongable (Figura 19). De acuerdo con los resultados obtenidos con la elongación de los oligonucleótidos mixtos mencionados en el párrafo anterior, se observa que las reacciones con el oligonucleótido TS producen un nivel de síntesis de productos levemente detectable por el método de PE. Inclusive, concentraciones mayores del mismo oligonucleótido no fueron capaces de recuperar esta deficiencia. Como se observa, recién a una concentración de $10 \mu\text{M}$ se hace visible muy débilmente la presencia de productos (calle 5), mientras que con el oligonucleótido telomérico los productos (+4/+5) se visualizan a una concentración tan baja como 10 nM (calle 7).

Para establecer si los oligonucleótidos que fueron elongados pobremente en los ensayos de la Figura 18A, interactúan con la telomerasa en otro sitio distinto además de la hibridización con el ARN, los cuales podrían competir por unión a la enzima con oligonucleótidos teloméricos, realizamos una serie de ensayos de competencia donde determinamos la actividad con dos oligonucleótidos simultáneamente. El mismo se basó en el uso de oligonucleótidos que son elongados $(\text{TAGGGT})_3$ y $(\text{GGGTTA})_3$ en una concentración 10 veces menor que los competidores. Estos fueron: un oligonucleótido telomérico que no es eficientemente elongado $(\text{TTAGGG})_3$ (Figura 18A calle 6), uno que posee 4 Gs en su extremo 3' (pBRG_4) y uno que es no telomérico (TS). Como se observa en la Figura 20 (sólo se muestran los resultados para el oligonucleótido $(\text{TAGGGT})_3$ aunque similares resultados se obtuvieron con el segundo), sólo aquel oligonucleótido que es capaz de hibridizar con el ARN es el que inhibe la elongación del oligonucleótido telomérico (comparar calles 2 con 3 y 4). El agregado de un oligonucleótido no telomérico (TS) no inhibe la elongación

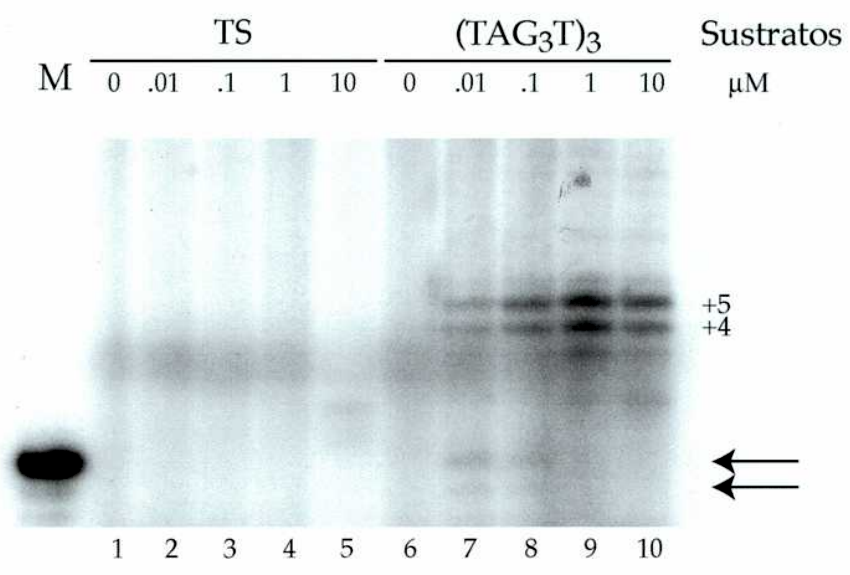


Figura 19: Determinación de actividad de telomerasa con distintas concentraciones de un oligonucleótido telomérico (TAG₃T)₃ y uno no telomérico (TS). M: oligonucleótido de 18 bases marcado con polinucleótido quinasa. Las flechas indican la altura de las bandas provenientes de productos de clivaje.

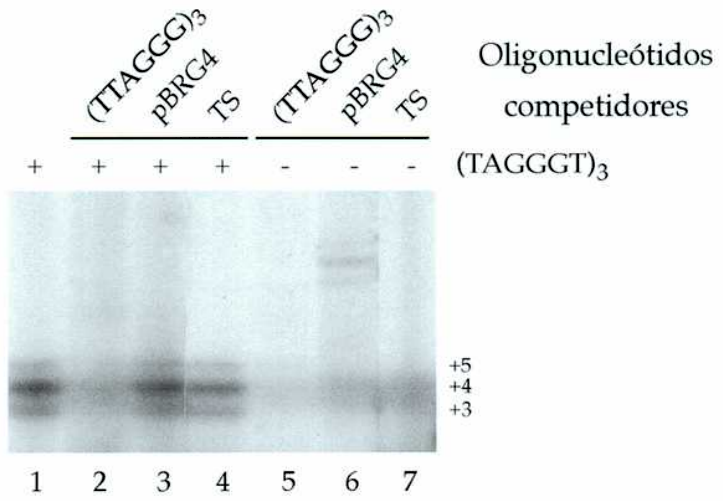


Figura 20: Determinación de la actividad de telomerasa en presencia de un oligonucleótido telomérico (TAG₃T)₃ (1μM) y oligonucleótidos competidores (TTAGGG)₃, pBRG4 y TS (10μM cada uno de ellos).

del telomérico. Y en el caso del oligonucleótido pBRG₄ aunque es elongado cuando está presente individualmente, consistente con la importancia de la hibridización entre el templado y el extremo 3' del sustrato, no es capaz de competir por el sitio activo de la enzima frente al oligonucleótido telomérico aún en una concentración 10 veces mayor (comparar calles 6 y 3).

Podemos concluir a partir de estos resultados que: 1) el hecho de no observar elongación directa del oligonucleótido TS indica la muy baja afinidad de la telomerasa de *T. cruzi* por moléculas de ADN no teloméricas y 2) la telomerasa de *T. cruzi* interactúa con sus sustratos principalmente por apareamiento de bases entre el extremo 3' de los mismos y el ARN y al menos *in vitro* el papel del sitio de anclaje en esta interacción no es relevante.

Cabe aclarar que el ensayo de medición de actividad TRAP es tan sensible, que permite detectar productos de telomerasa, aún provenientes de la elongación de un oligonucleótido no telomérico (TS) por el cual la enzima de *T. cruzi* posee muy baja afinidad.

Actividad nucleolítica de la telomerasa de *T. cruzi*

Se ha descrito que telomerasas de distintos organismos poseen además de la actividad polimerasa, una actividad nucleolítica que es capaz de clivar los sustratos de ADN. Generalmente esto se evidencia frente a condiciones específicas como: 1) cuando la elongación es inhibida por la formación de un complejo enzima-producto muy estable, 2) cuando existen bases desapareadas una vez que el sustrato de ADN se ha alineado con el templado del ARN y 3) cuando el templado es copiado hasta el final, donde

generalmente la enzima realiza una pausa antes de reposicionar el sustrato/producto. Tales consideraciones apoyan el hecho de que la reacción de clivaje es catalizada por el mismo sitio activo responsable de la actividad de polimerización (Cohn and Blackburn, 1995; Collins and Greider, 1993; Melek et al., 1996). En reacciones de actividad realizadas con tres oligonucleótidos diferentes detectamos productos de la telomerasa que son de igual longitud o más cortos que el oligonucleótido utilizado como sustrato. Estos productos también se observan aún con preparaciones de la enzima parcialmente purificadas. Esta actividad no sólo se detectó con oligonucleótidos no teloméricos o mixtos, donde la enzima es capaz de clivar el extremo 3' no telomérico que no hibridiza con el ARN (todos los productos de clivaje están señalados con flechas en las figuras que se mencionan) (Figura 18A, calles 10), sino también en teloméricos y en un oligonucleótido de 9 bases totalmente complementario al ARN de la telomerasa, donde la enzima cliva a su sustrato cuando la concentración del mismo es baja (Figura 19 calles 7 y 8), o sea que el "turn-over" del sustrato/producto es bajo, o cuando la interacción entre la enzima y el sustrato es muy fuerte (Figura 18A calles 2 y 6 y datos no mostrados). Esto sugiere que como sucede con otras telomerasas, la enzima de *T. cruzi* es capaz, bajo ciertas condiciones, de clivar su sustrato. Esto se encuentra apoyado principalmente porque los patrones de clivaje observados pueden ser explicados basándonos en la idea de la hibridización del sustrato con el ARN, como se muestra en la Figura 18B. Aunque no podemos descartar que una nucleasa asociada a la telomerasa, sea la responsable de esta actividad, los datos obtenidos son consistentes con una actividad nucleolítica intrínseca de la telomerasa de *T. cruzi*.

Secuencia del templado en el ARN de la telomerasa y purificación de la enzima por columna de afinidad

El hecho de que el oligonucleótido (TTAGGG)₃ inhibiera potentemente la actividad de la enzima en el ensayo de competencia mostrado en la Figura 20, junto con los resultados de elongación de oligonucleótidos teloméricos y no teloméricos, sugieren que la secuencia que sirve de templado en el ARN es complementaria a una repetición y media de esa permutación, o sea, 5'-CCCUAACCC-3'. Para comprobar esto y en la búsqueda de métodos específicos de purificación de la enzima, diseñamos 4 oligonucleótidos biotinilados en sus extremos 5' y con secuencia mixta de ADN y de ARN sustituido (2'O-metil ARN) (la región que hibridiza con el ARN es 2'O-metil ARN) (Figura 21A). Estos oligonucleótidos presentan varias ventajas con respecto a sus contrapartes de ADN: 1) son resistentes a la degradación por ADNasas/ARNasas, 2) la interacción con ARN es mayor que la establecida entre ARN:ADN y 3) mientras que el híbrido (ARN/ADN) es susceptible de ser degradado por ARNasas H presentes en las células o extractos de las mismas, el híbrido ARN:2'O-metil ARN no lo es. Dos oligonucleótidos fueron diseñados con la secuencia telomérica de vertebrados y trypanosomas, uno complementario a la secuencia propuesta más arriba para el ARN de la telomerasa de *T. cruzi*, y el otro dirigido contra la telomerasa humana. Otros dos fueron diseñados contra la telomerasa de *Tetrahymena* los cuales abarcan dos regiones solapadas pero de distinta longitud en el ARN como controles de especificidad (Figura 21A). Estos oligonucleótidos fueron colocados en contacto con la enzima para permitir su interacción y luego fueron unidos a esferas de estreptavidina-agarosa, y centrifugadas para recuperar la telomerasa. Una vez que la enzima fue recuperada unida a los

distintos oligonucleótidos, se intentó eluirlos utilizando un exceso de oligonucleótidos complementarios a toda la secuencia de los mismos. La Figura 21B muestra los resultados de este experimento. En las calles impares se observa la actividad ensayada en los sobrenadantes después de centrifugar las esferas y en las pares la enzima eluída de las mismas. Como se observa, sólo el oligonucleótido complementario a la secuencia propuesta más arriba para el ARN de la telomerasa de *T. cruzi* (5'-G₃U₂AG₃-3'), fue capaz de depletar totalmente la actividad presente en el extracto (comparar calle 2 con 4, 6 y 8). Es sorprendente que en estas condiciones no fue posible eluir a la enzima de este oligonucleótido, sugiriendo que la interacción es fuerte (calle 3). Inversamente, no obtuvimos una depleción total de la enzima del extracto (calle 4) resultando fácil su elución (calle 5), utilizando el oligonucleótido dirigido contra el ARN de la telomerasa humana (5'-U₂AG₃U₂AG-3'). Tal interacción fue más débil debido a que sólo existiría, si la secuencia propuesta para el templado del ARN es la correcta, hibridización de 7 bases en lugar de 9 (comparar calles 5 y 3). Con el material eluído se visualizó el agregado a un mismo sustrato de hasta cuatro repeticiones teloméricas (calle 5). La relativamente alta procesividad observada en esta fracción purificada de la enzima, apoya la idea de que la telomerasa posee una afinidad mucho mayor por sustratos teloméricos sobre los no teloméricos, dado que en esta fracción está presente en exceso el oligonucleótido utilizado para eluir a la enzima y aún así éste no es utilizado por la misma como sustrato. Como era esperable, ninguno de los dos oligonucleótidos dirigidos contra la enzima de *Tetrahymena* fue capaz de interactuar con la telomerasa de *T. cruzi*, por lo que la actividad total fue recuperada en el sobrenadante (ver calles 6 y 8) y no en los eluídos (calles 7 y 9). Estos resultados sugieren que existe una interacción particularmente fuerte con el oligonucleótido (5'-G₃U₂AG₃-3')

y otra más débil con el que posee la otra permutación de la misma secuencia (5'-U₂AG₃U₂AG-3'). Ello es consistente también con la ausencia de elución del oligonucleótido en comparación con la eficiente elución obtenida con el segundo oligonucleótido. Esto se explica por el hecho de que es más fácil escindir un híbrido de 7 bases que uno de 9. Estos datos también sugieren que la secuencia que sirve de templado en el ARN para la síntesis de las repeticiones teloméricas en este organismo sería 5'-CCCUAACCC-3' (Muñoz and Collins, 2001).

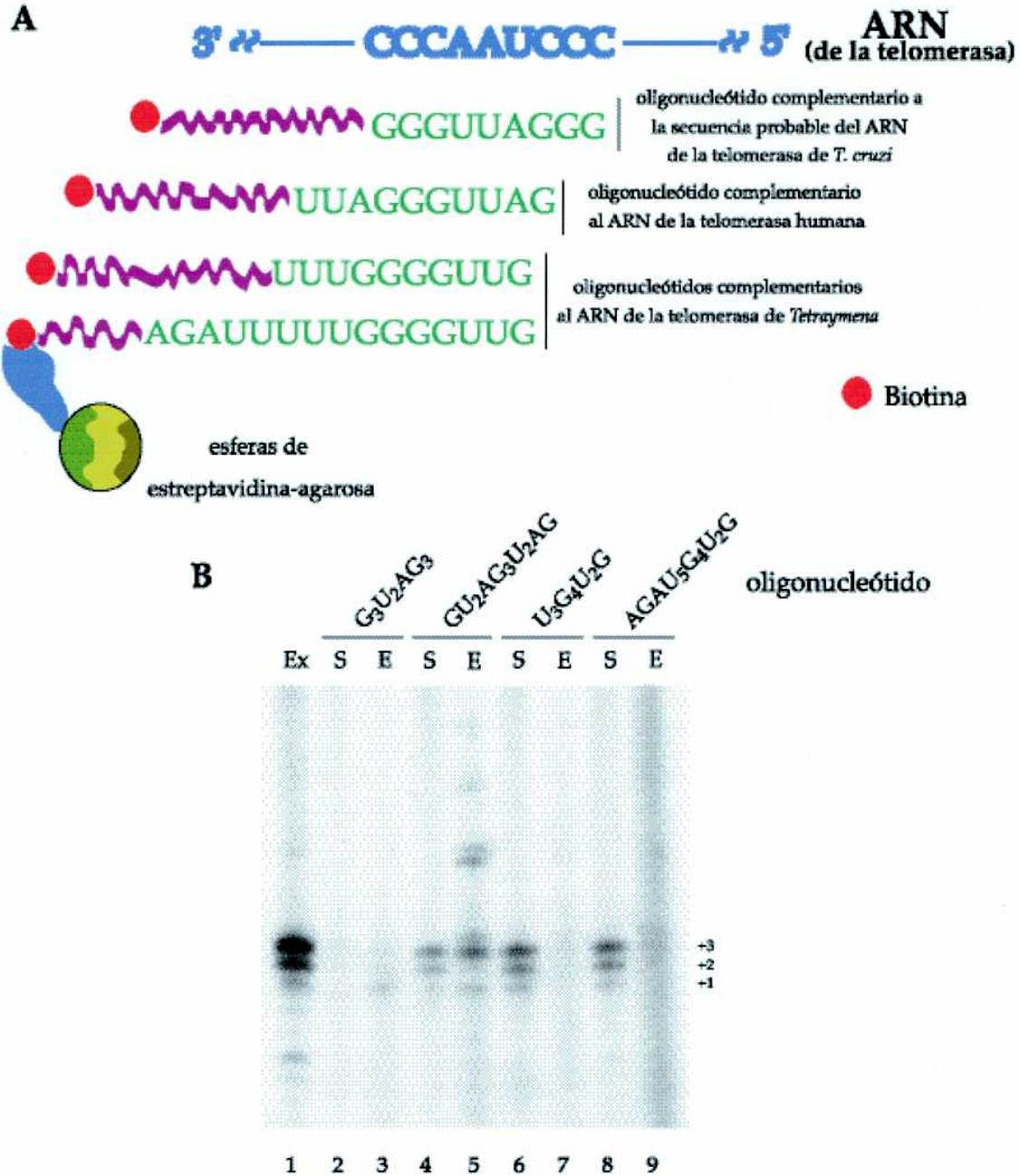


Figura 21: Purificación de la telomerasa de *T. cruzi* por columna de afinidad. A: Secuencia postulada para el ARN de *T. cruzi* y esquema de la purificación. B: Determinación de la actividad de telomerasa en los sobrenadantes (calles pares) y en los eluidos (calles impares). Ex: extracto. Calles 1 y 2, oligonucleótido b-TCCGCCTTTTCGGGUUAGGG. Calles 3 y 4, oligonucleótido b-TCCGCCTTTTCGUUAGGGUUAG. Calles 5 y 6, oligonucleótido b-TCCGCCTTTTCUUUGGGGUUG. Calles 7 y 8, oligonucleótido b-TCCGCCTTTTCAGAUUUUUGGGGUUG. (la secuencia no subrayada pertenece al ADN y la subrayada al 2'O-metil ARN).

Peso molecular aparente del complejo de la telomerasa de epimastigotes de *T. cruzi*

Muy poco se sabe sobre la composición de la RNP de la telomerasa de los kinetoplastidos. Como describí en la introducción los dos métodos más usuales para establecer el peso molecular de estos complejos son la filtración molecular y la sedimentación en gradientes de glicerol. De modo que para establecer el tamaño del complejo de la telomerasa en la forma epimastigote de *T. cruzi*, utilizamos dichos métodos.

En un principio realizamos ensayos de sedimentación en gradientes de glicerol siendo los resultados no reproducibles, probablemente debido a desestabilización de la enzima por dilución. Además esto nos impidió utilizar estas fracciones para determinar la actividad por el método de PE. Realizamos entonces tres “pools” con las fracciones provenientes de un gradiente de glicerol y concentraamos a la enzima utilizando columnas de intercambio iónico (DEAE-sefarosa) probada con éxito en ensayos previos. Los tres “pools” fueron obtenidos combinando las fracciones que sedimentan junto y por arriba de la catalasa (≤ 240 kDa) (Pool I). El segundo “pool” se obtuvo con las fracciones que sedimentan sobre la tiroglobulina pero por debajo de la catalasa (>240 kDa y < 669 kDa) incluyendo las fracciones de tamaño similar a la ferritina (~ 440 kDa) (Pool II), y el tercer “pool” proviene de las fracciones que sedimentan junto y por debajo de la enzima tiroglobulina (≥ 669 kDa) (Pool III). Cada uno de ellos fue sembrado en una columna de DEAE-sefarosa (equilibradas columna y muestra con 0.3 M KCl) y eluído con 0.4 M KCl. Se determinó actividad de telomerasa por TRAP a todas las fracciones (Figura 22A) y por PE (Figura 22B) a los “pools” previo a su aplicación en las columnas y a las primeras fracciones eluídas de las mismas. La Figura 22A (calles 13 y

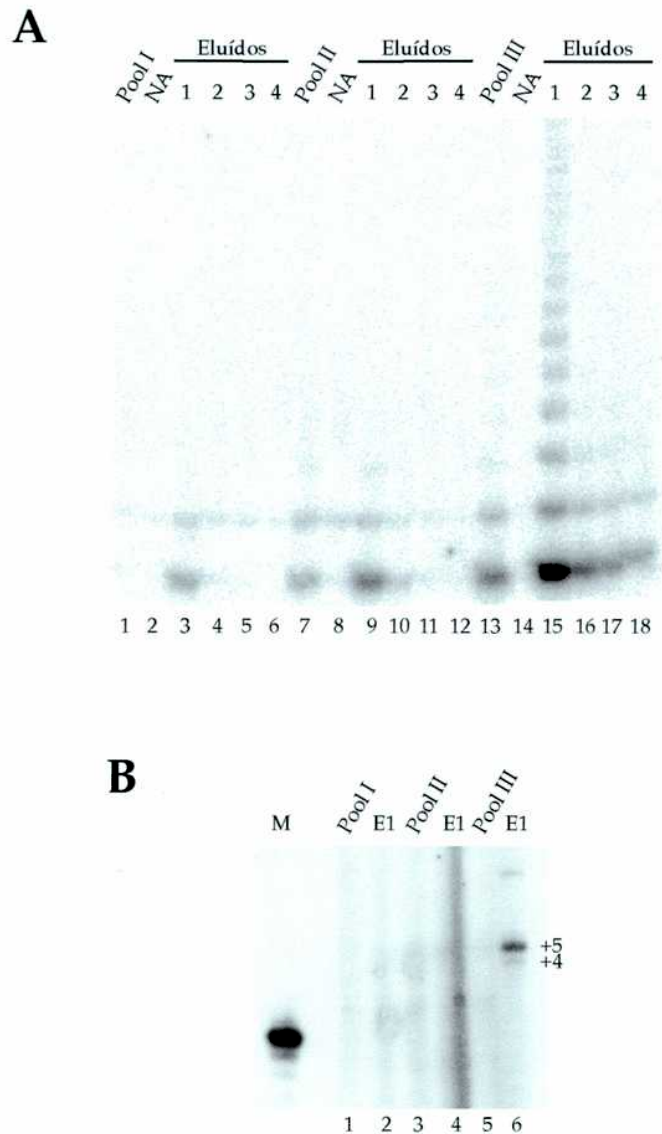


Figura 22: Purificación de la telomerasa de *T. cruzi* en gradiente de glicerol y posterior columna de DEAE sefarosa. A: Determinación de actividad de telomerasa por el método de TRAP de los "pools" provenientes del gradiente de glicerol y de las fracciones eluidas de las columnas de DEAE-sefarosa correspondientes. Calles 1, 7 y 13: "Pools I, II, y III" respectivamente previo fraccionamiento en columnas. Calles 2, 8 y 14: fracción no adsorbida. Calles 3 a 6: fracciones de elución de la columna de DEAE del "Pool I". Calles 9 a 12: fracciones de elución de la columna de DEAE del "Pool II". Calles 15 a 18: fracciones de elución de la columna de DEAE del "Pool III". B: Determinación de actividad de la telomerasa en algunas de las fracciones descritas en A, por el método de PE. Calles impares: "Pooles I, II, y III" respectivamente. Calles pares: primeras fracciones de la elución de las respectivas columnas de DEAE (E1).

15) y Figura 22B (calle 6), muestran actividad presente sólo en aquellas fracciones que pertenecen al “Pool III” del gradiente de glicerol original que incluye las proteínas de pesos moleculares mayores a ~669 kDa.

Estos datos fueron corroborados fraccionando a la enzima en una columna de filtración molecular (Superosa 6). En la Figura 23A se observa el perfil cromatográfico donde se distinguen complejos proteicos (absorbancia a 280 nm, registro azul) y por ácidos nucleicos (absorbancia a 260 nm, registro rojo). En la Figura 23B se muestran los resultados de actividad por el método de TRAP donde se detecta actividad coincidente con el volumen de exclusión de la columna. Este resultado fue reproducible y atribuible a la concentración de la enzima que no sufre la dilución como en el gradiente de glicerol. Las mismas fracciones fueron ensayadas por el método de PE. En la Figura 23C se observa actividad de telomerasa en el curso de este fraccionamiento, la cual es lo suficientemente intensa después de este paso de purificación, observándose que el pico de la actividad se encuentra principalmente en el volumen de exclusión de la columna y no en aquellas fracciones por debajo de ~670 kDa, sugiriendo que la telomerasa de *T. cruzi*, forma parte de un gran complejo ribonucleoproteico, el cual posee un peso molecular aparente superior a 670 kDa. Resultado totalmente congruente con lo obtenido en el gradiente de glicerol seguido por las columnas de DEAE-sefarosa, descritos en el párrafo anterior (Figura 22).

Estos datos indican que el complejo de la telomerasa de *T. cruzi* es de naturaleza multimérica como sucede para otras telomerasas, compuesto por proteínas regulatorias y/o accesorias además de la subunidad catalítica y la molécula de ARN (Collins, 1999; Greene and Shippen, 1998) o multímeros de la RNP como se ha demostrado para las enzimas de levaduras y humana (Prescott and Blackburn, 1997a; Wenz et al., 2001).

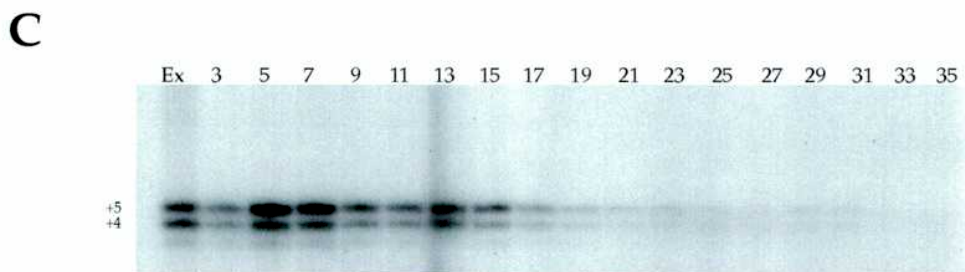
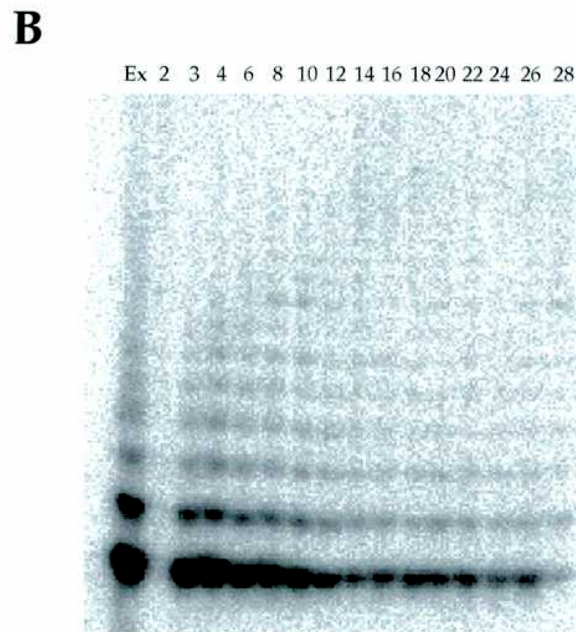
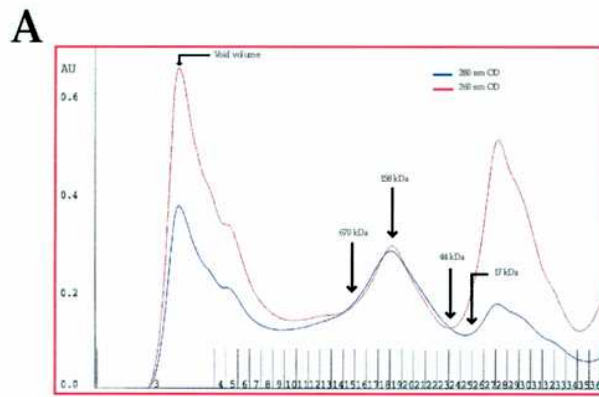


Figura 23: Extracto de epimastigotes de *T. cruzi* sometido a fraccionamiento en columna de filtración molecular (Supersosa 6). A: perfil cromatográfico donde se observan complejos proteicos y ácidos nucleicos y se indican los pesos moleculares de las proteínas estándares utilizadas para calibrar la columna. Registro azul: Absorbancia a 280 nm. Registro rojo: Absorbancia a 260 nm. B y C: Determinación de actividad de telomerasa en las fracciones de la columna Supersosa 6 por el método de TRAP y por el de PE, respectivamente. Ex: extracto original.

Ensayos de retardo en geles de poliacrilamida con oligonucleótido telomérico

En el año 1997, fue demostrada la capacidad del complejo de la telomerasa humana de unirse a un oligonucleótido telomérico, dando lugar a la visualización de dos complejos como resultado de ensayos de retardo en geles nativos de poliacrilamida (EMSA). Llevamos a cabo un ensayo similar para identificar la posible existencia de este/os complejo/s en extractos de *T. cruzi*. La Figura 24 muestra los resultados de este ensayo. Como se puede observar, al igual de lo que sucede con la telomerasa humana, detectamos en extractos de epimastigotes de *T. cruzi* la formación de dos complejos capaces de unirse al oligonucleótido telomérico marcado. Los mismos se anularon con el pretratamiento del extracto con un exceso del mismo oligonucleótido no radiactivo (calle 6), contrariamente, cuando se compitió con un oligonucleótido inespecífico, los complejos fueron evidentes (calle 7). Los complejos permanecen aún después del tratamiento del extracto con ARNasa (calle 4), aunque la banda perteneciente al complejo de mayor movilidad fue más difusa, indicando probablemente que existe en el mismo un componente de ARN “parcialmente” accesible que al ser degradado genera esta distribución. Los complejos desaparecieron completamente cuando el extracto fue tratado con proteinasa K (calle 5)

Luego de detectar estos dos complejos en extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi*, decidimos seguir el curso en los otros estadios del ciclo de vida de este parásito. Para ello preparamos extractos de las otras formas de este organismo y realizamos idénticos ensayos. Los resultados se presentan en la Figura 25. Como puede observarse, existe una diferencia en cantidad y en movilidad de estos complejos en los distintos estadios. Mientras que los trypomastigotes sanguíneos (calle TS) y los

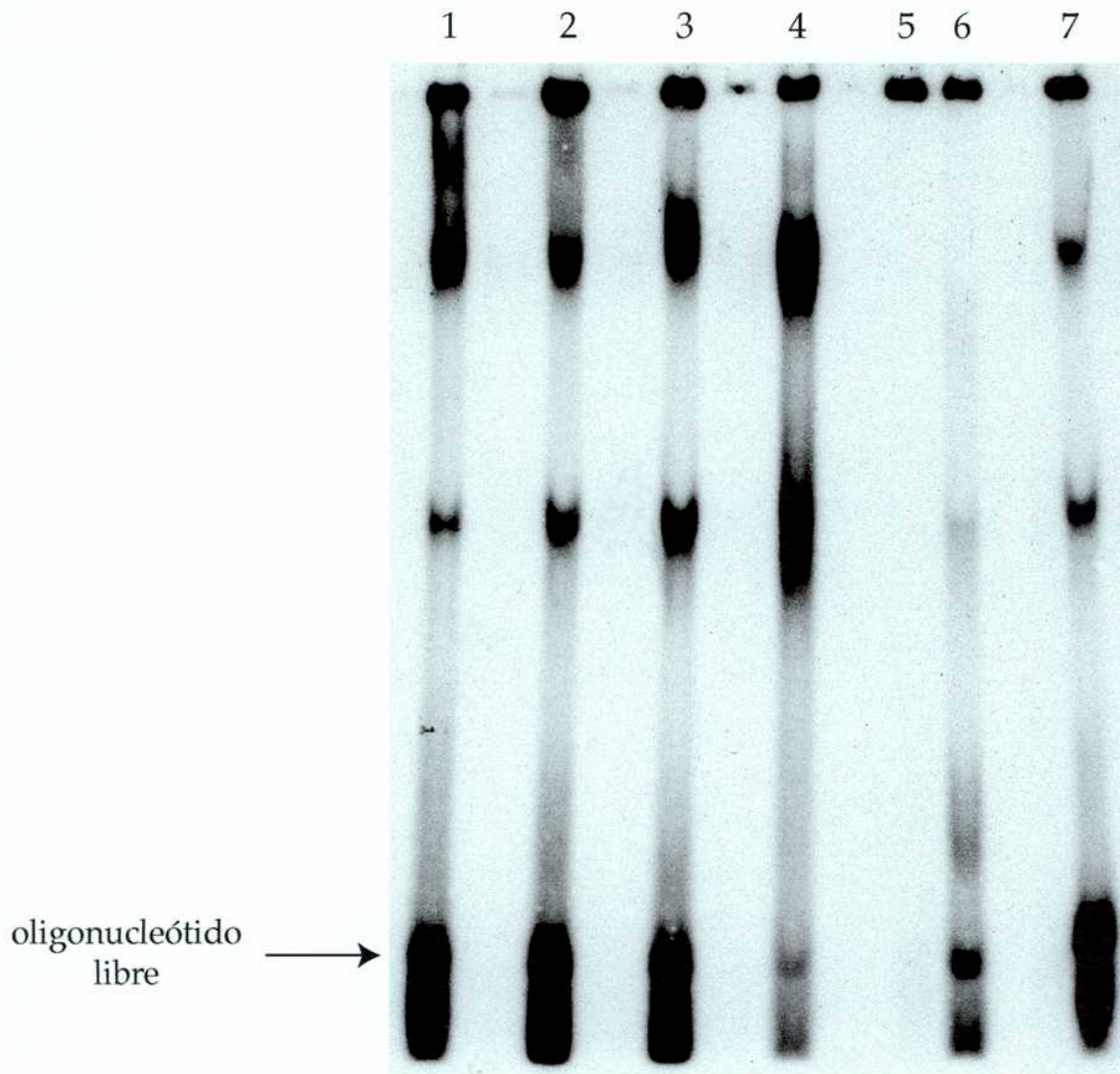


Figura 24: Ensayo de retardo en geles con extractos de epimastigotes de *T. cruzi*. Calles 1, 2 y 3: cantidades crecientes de extracto (5, 10 y 20 μg de proteínas totales). Calle 4: tratamiento con ARNasa. Calle 5: tratamiento con proteinasa K. Calles 6 y 7: competencia con exceso del mismo oligonucleótido no radiactivo o de un oligonucleótido inespecífico, respectivamente.

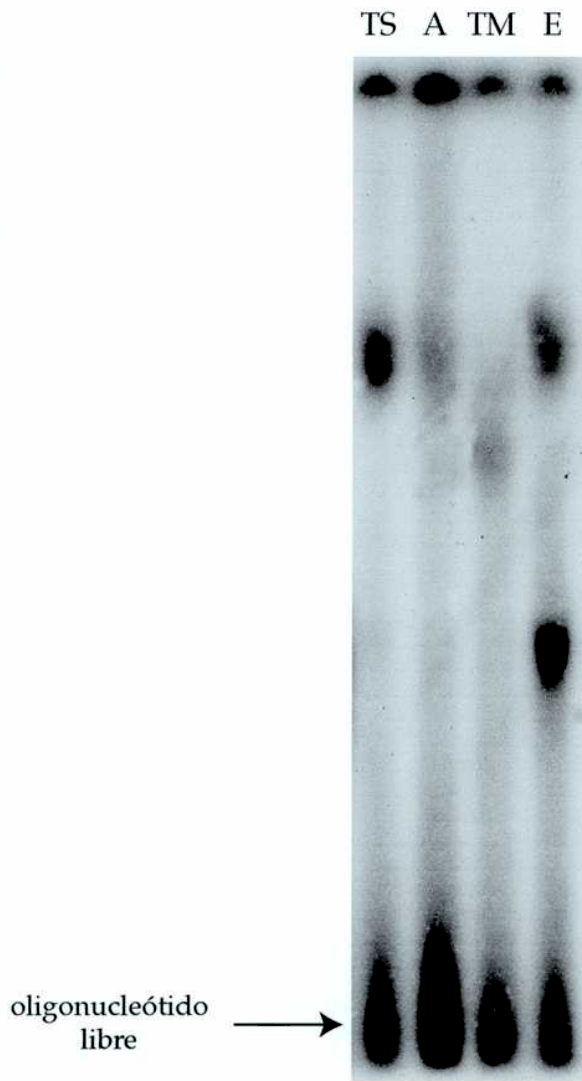


Figura 25: EMSA en los distintos estadios de *T. cruzi*. TS: trypomastigotes sanguíneos. A: amastigotes. TM: trypomastigotes metacíclicos. E: epimastigotes.

amastigotes (calle A) exhiben el complejo de menor movilidad y carecen del complejo menor, los trypomastigotes metacíclicos (calle TM) contienen sólo un complejo de movilidad intermedia a los descriptos para los epimastigotes (calle E).

Nuestra hipótesis fue correlacionar la presencia de estos dos complejos en fracciones de columnas como las de filtración molecular para establecer si alguno de ellos o los dos coinciden con la actividad de telomerasa que obtenida luego del fraccionamiento con Superosa 6. Sin embargo, estos resultados han sido infructuosos.

Determinación de la secuencia telomérica de distintos kinetoplástidos

La única secuencia telomérica en trypanosomátidos que se conocía hasta el año 1996 era la de *T. brucei* (Blackburn and Challoner, 1984; Van der Ploeg et al., 1984). Cuando diseñamos los oligonucleótidos necesarios para la detección de actividad de telomerasa por el método de TRAP, especulamos que la secuencia telomérica de *T. cruzi* podría ser idéntica a la de *T. brucei*. Sin embargo, carecíamos de la certeza de que así fuese dado que por ejemplo, dos especies muy cercanas de paramecios (*Paramecium caudatum* y *Paramecium tetraurelia*) poseen, el primero más del 95% de su secuencia telomérica correspondiente a la repetición (G4T2) y el segundo posee una mezcla al azar de las repeticiones (G4T2) y (G3T3) (McCormick-Graham et al., 1997). Razonamos que la secuencia telomérica de este organismo, debería estar representada en los productos generados durante la reacción de actividad de la telomerasa a partir de un ensayo de TRAP. Estos productos fueron clonados y secuenciados, dando como

resultado las secuencias teloméricas de varios kinetoplástidos. Por otro lado, el clonado y secuenciación de los productos de la telomerasa también arrojarían datos sobre cuán fieles son las enzimas de estos organismos en el copiado de su templado. Esto fue considerado dado que la telomerasa de *Paramecium tetraurelia* (cuya secuencia telomérica fue descrita) sintetiza repeticiones teloméricas variables, a partir de un solo ARN, por incorporación errónea de TTP en lugar de dGTP en una de las posiciones (McCormick-Graham and Romero, 1996). Sólo se muestran aquí dos de las secuencias teloméricas obtenidas a partir de las reacciones de actividad en distintos kinetoplástidos. En la Figura 26A, se detalla la secuencia de uno de los clones provenientes de la actividad de la telomerasa de *T. cruzi* y en la Figura 26B presentamos la secuencia de un clon proveniente de la actividad de telomerasa de *Leptomonas seymouri*. Las mismas fueron idénticas para todos los organismos analizados y no se detectaron variaciones en las secuencias de las repeticiones teloméricas, sugiriendo que las enzimas de todos estos organismos son fieles al copiar el templado situado en la molécula de ARN.

En el caso de *T. cruzi*, esta secuencia se utilizó como sonda en hibridaciones de filtros provenientes de PFGE y se comprobó que la misma estaba presente en todos los cromosomas separados por este método en cada una de las condiciones de corrida (datos no mostrados), por lo tanto era muy factible de que la misma fuese realmente la secuencia telomérica. Estos datos son coincidentes con el clonado de extremos cromosómicos (Chiurillo et al., 1999; Freitas-Junior et al., 1999).

Clonado de la subunidad catalítica de la telomerasa de trypanosomátidos

Sobre la base del alineamiento de secuencias de TERT clonadas previamente, se diseñaron oligonucleótidos degenerados dirigidos contra las regiones más conservadas de los distintos motivos presentes en las telomerasas (Figura 27).

	Motivo T	Motivo 1	Motivo 2	
T.t	VLRYN F YITE	KLRIIPKK	FRPIMT F L R KD	
E.a	LIRCF F YVTE	KLRLIPKK	FRPIMT F N K KI	
E.c	LIRCF F YVTE	KLRLIPKK	FRPIMT F N K KI	
O.t	LMRCY F Y S TE	KLRLIP K G	FRPIMT F N R KI	
S.p	ILQS F FYITE	VIRLL P KK	F RLI T N L R K RF	
S.c	IIQT F FY C TE	KMRIIPKK	F RI I A I PC R GA	
A.t	LVH F N F Y A TE	K FR F LP K A	V RM V LD F S---	
M.m	LLRS F FYITE	RLRFIP K P	L RP I V N MS S Y M	
H.s	LLRS F FYVTE	RLRFIP K P	L RP I V N MD Y V V	
	Motivo A	Motivo B'	Motivo C	
	PQLYY V TL D IK K CYDSI	GIPQ G	NLLMRLT D D Y LF I S D	T.t
	PKL F F A T M D I E K CYDSV	GIPQ G	NLLMRLT D D Y LL I T T	E.a
	PKLY F V T M D I E KCYDSV	GIPQ G	TLLMRLT D D Y LL I T T	E.c
	PKLY F V A M D I E KCYDN V	GIPQ G	NLLMRLT D D Y LL M T T	O.t
	- K K Y F V R I D I K S CYD R I	GIPQ G	S V L L R V V D D F L F I T V	S.p
	PELY F M K F D V K S C YD S I	GL F Q G	TL L IL K L A D D F L I I S T	S.c
	PPLY F V V A D V F K A F D S V	GIPQ G	Y K L L R F I D D Y L F V S T	A.t
	PRMY F V K A D V T G A Y D A I	GIPQ G	G LL L R F V D D F LL V T P	M.m
	PELY F V K V D V T G A Y D T I	GIPQ G	G LL L RL V D D F L L V T P	H.s

Figura 27: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de los motivos conservados entre distintas telomerasas. ■ Aminoácidos conservados en 5 o más de las secuencias, ■ aminoácidos no conservados, ■ aminoácidos no conservados pero relacionados a los que forman la secuencia conservada y ■ tres residuos aspárticos que forman la tríada catalítica de todas las polimerasas. T.t: *T. termophila*, E.a: *E. aediculatus*, E.c: *E. crassus*, O.t: *Oxytricha trifallax*, S.p: *S. pombe*, S.c: *S. cerevisiae*, A.t: *Arabidopsis thaliana*, M.m: *M. musculus*, H. s: *H. sapiens*.

La Tabla 6 contiene la lista de los oligonucleótidos diseñados y utilizados para tal fin. Todos poseen en su extremo 5' una secuencia de reconocimiento para alguna enzima de restricción, los cuales no se incluyen en la secuencia ni en la temperatura de hibridización.

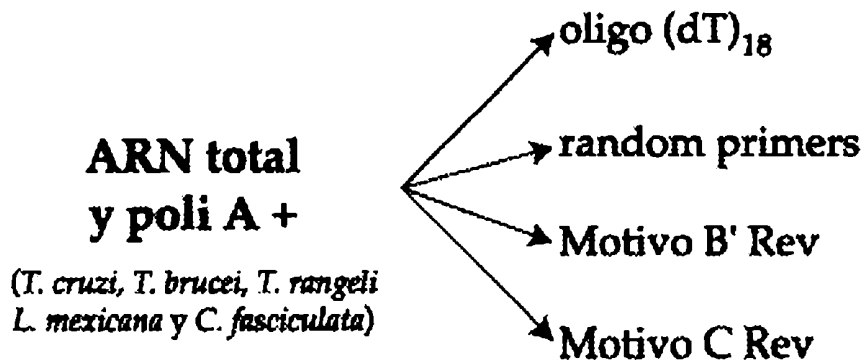
Motivo a partir del cual fue diseñado el oligonucleótido	Orientación del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Temperatura de hibridización (°C) y grado de degeneración	
Motivo T	Fwd	TTYTTYTAYDBNACNGA	60-72	1/1152
	Rev	YTCNGTINVHRTARAARAA	68-84	1/2304
	Fwd	TTYTAYNNNACNGA	32-44	1/1024
Motivo I	Fwd	MGNHTNMTNCCNNA	60-74	1/3072
Motivo B'	Fwd (I)	GGNATHYYNCARGG	66-78	1/384
	Rev (I)	CCYGTNRRNADNCC	68-84	1/1536
	Fwd (I)	GGNATHCCNCARGG	42-50	1/96
	Rev (I)	CCYGTNGGHATNCC	42-50	1/96
	Fwd (L)	GGNCTNCCNCARGG	44-52	1/128
	Rev (L)	CCYTGNGGNAGNCC	44-52	1/128
	Fwd (V)	GGNGTNCCNCARGG	44-52	1/128
	Rev (V)	CCYTGNGGNACNCC	44-52	1/128
Motivo C	Rev	AYNADNARRWARTCRTC	68-80	1/3072
	Rev	ARRWARTCRTC	26-34	1/32

Tabla 6: Descripción de los oligonucleótidos degenerados, diseñados y utilizados para clonar la subunidad catalítica de la telomerasa de distintos kinetoplastidos.

Los templados utilizados para la síntesis de la primera hebra del ADNc y sólo algunos de los protocolos de PCR usados para obtener el gen correspondiente a la subunidad catalítica de la telomerasa de distintos

kinetoplástidos se describen más abajo. En algunos casos, la primera hebra de ADNc fue purificada para eliminar el oligonucleótido utilizado en su síntesis.

Material y oligonucleótidos utilizados para la síntesis de ADNc



PCRs

Fue utilizado como molde en las reacciones de PCR una alícuota de los ADNc sintetizados a partir del material descrito. Generalmente en las mismas empleamos entre 4 y 5 ciclos completos de desnaturalización, hibridización y polimerización, a una temperatura de hibridización entre 4 y 6 grados menor a la temperatura de hibridización de los oligonucleótidos utilizados (Tabla 6) y luego entre 30 y 40 ciclos completos, con una temperatura de hibridización 4 a 6 grados menor que la temperatura correspondiente a todo el oligonucleótido, incluyendo la secuencia para las enzimas de restricción. El tiempo de polimerización fue dependiente del tamaño del fragmento a amplificar (generalmente se utilizó 1 min cada 1000 pb).

Esquema de ciclado

5'	94°C	}	X 4 - 5
45"	T° (correspondiente a cada oligonucleótido)		
1'30" ---	72°C		
3'	94°C	}	X 30 - 40
45"	T° (idem)		
1'30" ---	72°C		

Una variante a este protocolo consistió en agregar en los primeros 4 o 5 ciclos, uno de los oligonucleótidos (específico), seguido por el segundo (por ej. oligo (dT)), para incrementar el número de moléculas iniciales con la secuencia buscada, previamente a la amplificación exponencial. Otras variantes consistieron en “heminested” o “nested” PCRs, utilizando como templado una alícuota de la primera PCR, o purificando a partir de la primera PCR las moléculas de ADN presentes en las regiones de los geles que poseían el tamaño esperado (comparando con las telomerasas ya descritas).

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados de geles de agarosa y clonados en plásmidos comerciales para el clonado de productos de PCR o por digestión y ligación en sitios específicos en pBluescript.

Simultáneamente con nuestro trabajo, fueron publicadas las secuencias de dos genes de TERT de *Candida albicans*. Las mismas poseen un cambio en un aminoácido en la segunda posición en el motivo B' altamente conservado entre todas las telomerasas. Como se observa en la Figura 27, la mayoría de las telomerasas poseen isoleucina en esta posición (subrayada en la figura), salvo *S. cerevisiae* donde el aminoácido es leucina. Los dos genes de *C. albicans* codifican para valina en esta posición. Considerando estos datos y dado que todos nuestros oligonucleótidos

diseñados contra el motivo B', eran para la secuencia que contenía isoleucina, diseñamos oligonucleótidos con dos variantes en esa misma posición de manera de cubrir todas las posibilidades. Con estos oligonucleótidos se clonaron y secuenciaron 32 clones adicionales a los 158 previamente obtenidos, uno de los cuales fue una transcriptasa reversa de *T. cruzi*, pero ninguno codificante de la subunidad catalítica de la telomerasa.

Clonado del ARN de la telomerasa

El enfoque para clonar el ARN de la telomerasa de *T. cruzi*, se basó principalmente, en la obtención de fracciones parcialmente purificadas de la enzima, a partir de las cuales se extrajo el ARN. Este material fue el que se utilizó para el clonado subsiguiente. En la Tabla 7 se detallan diversos procedimientos utilizados para la purificación de la telomerasa de *T. cruzi* y el perfil de elución de la misma.

Columna	Equilibrada con:	Eluída con:	Perfil de elución
Heparina-agarosa (columna de afinidad)	50 mM KCl	Gradiente de KCl entre 50 mM y 1M	La actividad de la enzima se recupera en las fracciones correspondientes a 0.3M KCl.
Fosfo-celulosa (intercambio catiónico)	50 mM KCl	0.1/ 0.2/ 0.3/ 0.4/ 0.5 y 1M KCl	La mayor parte de la actividad se encuentra en la fracción no adsorbida. El resto aparece distribuída uniformemente en las restantes fracciones.
Fenil-selárosa (interacción hidrofóbica)	2M NaCl	1% Tritón X-100	La proteína se une a la columna y se eluye con Tritón pero el rendimiento es muy bajo.

DEAE-sel'arosa (intercambio ani6nico)	50 mM KCl	0.1/ 0.2/ 0.3/ 0.4/ 0.5 y 1M KCl	La actividad se recupera principalmente en las fracciones eluidas con 0.4M KCl.
Superosa 6 (filtraci6n molecular)	50 mM KCl	50 mM KCl	La actividad se encuentra principalmente en el volumen de exclusi6n de la columna (ver Figura 24 B, C).
High-Q (intercambio ani6nico fuerte)	100 mM KCl	0.2/ 0.4/ 0.6/ 0.8/ 1 y 2M	La enzima se une fuertemente dificultando su eluci6n. Se detecta un pico de actividad con 1M KCl siendo su recuperaci6n muy baja.
Mini S (intercambio cati6nico fuerte)	50 mM KCl	0.2/ 0.4/ 0.6/ 0.8/ 1 y 2M	La actividad de la enzima se distribuye entre el material no adsorbido y las fracciones eluidas con 0.4 M - 0.6 M KCl.
Oligonucle6tido complementario al ARN (afinidad)	50 mM KCL	150 mM KCl m'as oligonucle6tido desplazador	Dif'cil eluir la enzima una vez que interactu6 con el oligonucle6tido de secuencia correcta (ver Figura 22B).

Tabla 7: Descripci6n del comportamiento de la telomerasa en distintas columnas cromatogr'ficas.

En uno de los primeros ensayos de Northern-blot realizado con ARN total de distintos organismos e hibridizado con un oligonucle6tido sustituido (2'O-metil ARN) dirigido contra el templado del ARN de la telomerasa (Figura 28), detectamos una banda de aproximadamente 150-200 nts (tama'no similar al descrito para el ARN de ciliados (McCormick-Graham and Romero, 1995)), presente en todos ellos y de longitud semejante en todos los organismos analizados (se'nalada con flecha).

Paralelamente al fraccionamiento en columnas, determinamos actividad de la enzima por el m'etodo de TRAP combinando luego, las fracciones activas, El ARN fue purificado y analizado en geles para su identificaci6n por hibridizaci6n como describimos en la Figura 28. La

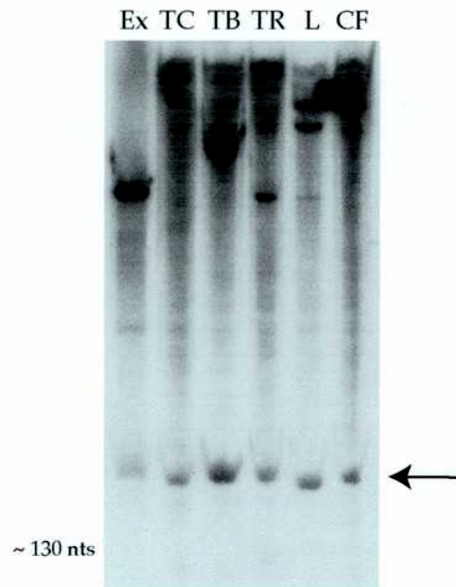


Figura 28: Northern-blot realizado con ARN total de distintos organismos kinetoplásticos e hibridizado con un oligonucleótido complementario a la secuencia del templado del ARN de la telomerasa de *T. cruzi*. Ex: Extracto CHAPS de epimastigotes de *T. cruzi*. TC: *T. cruzi*. TB: *T. brucei*. TR: *T. rangeli*. L: *L. mexicana*. CF: *C. fasciculata*.

Figura 29A muestra la actividad enzimática de las fracciones de una columna de DEAE-sefarosa y en el panel B, el Northern correspondiente a las mismas. El pico de actividad predominante pertenece a la fracción eluída con 0.4 M KCl y la intensidad de la banda de ~150-200 nts visualizada en el Northern (señalada con flecha) correlaciona con la misma.

Las bandas detectadas fueron escindidas de los geles y clonadas para su secuenciación. Dado que los primeros resultados obtenidos fueron muy diversos y carecían de la secuencia templado (única característica discernible), tratamos de obtener el ARN de la telomerasa con una mayor pureza. Paralelamente, tratamos de identificar por un nuevo método al RNA de la telomerasa. Este protocolo se describe a continuación, se basa en el uso de un oligonucleótido de ADN complementario al ARN de la telomerasa de manera que hibridizara con el mismo, y en una etapa posterior el híbrido fuese degradado por la enzima ARNasa H.

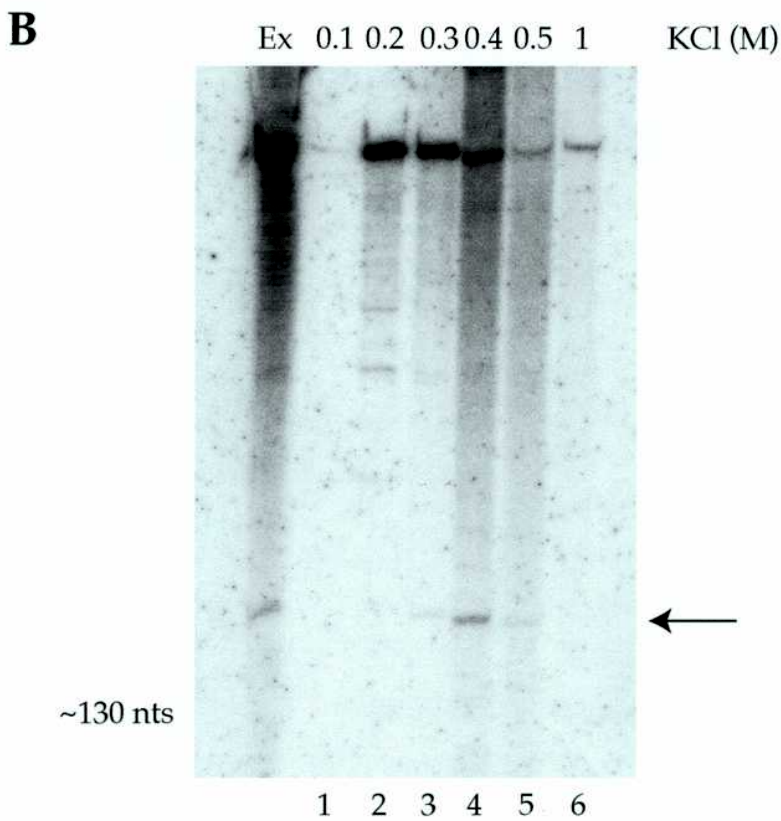
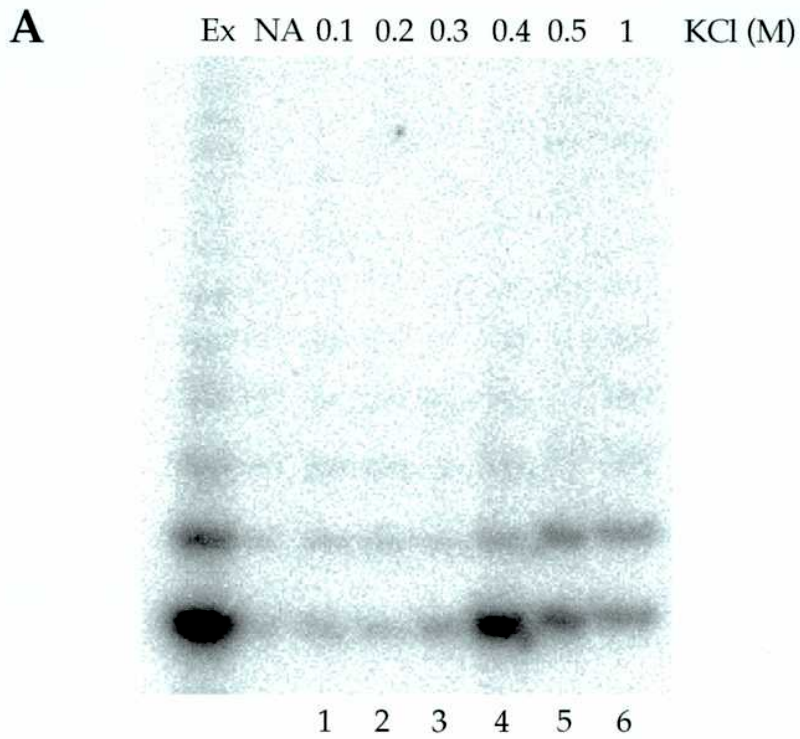
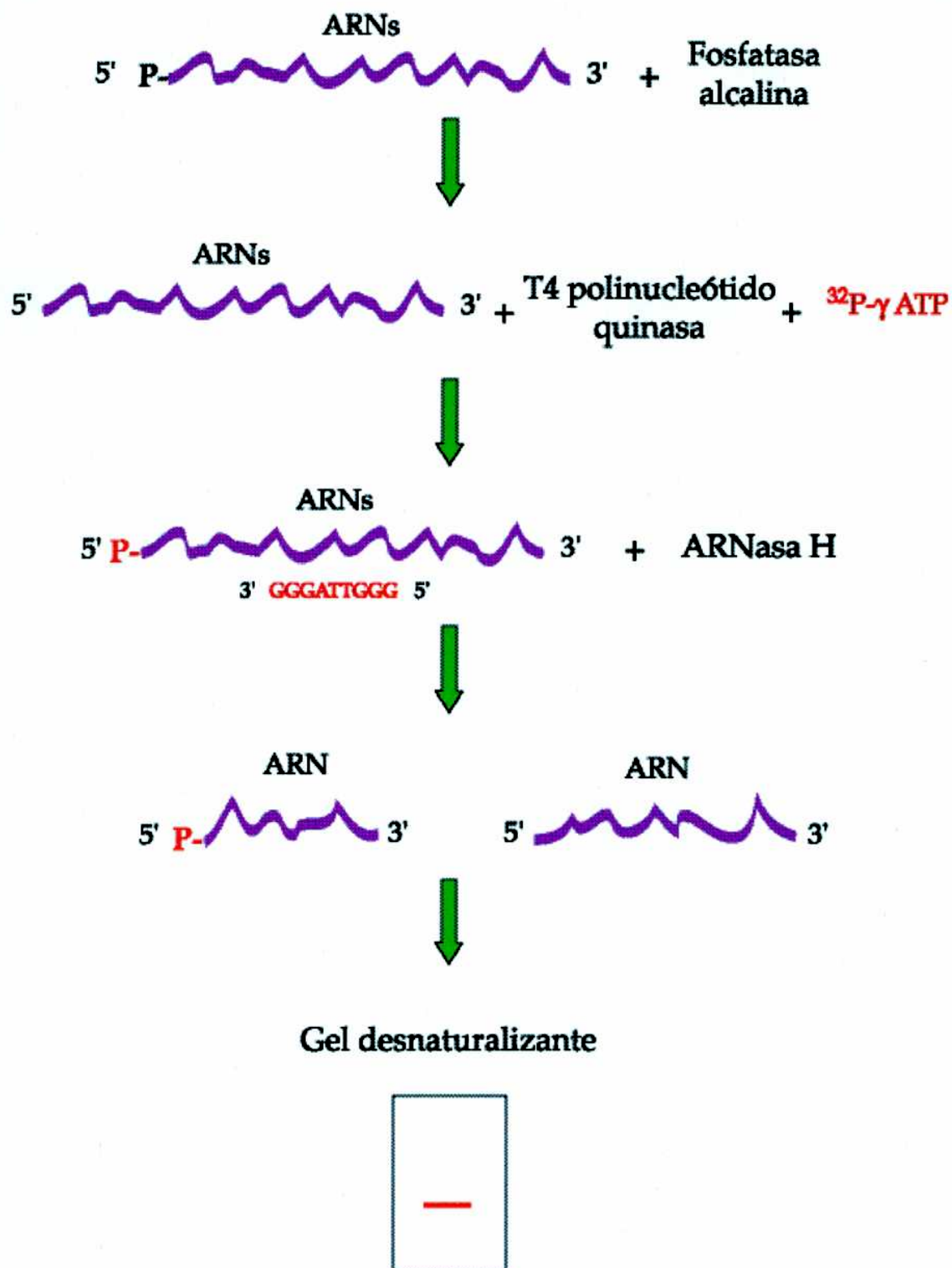


Figura 29: A: Detección de la actividad de la telomerasa por el método de TRAP, fraccionada en columna de DEAE-sefarosa. Ex: extracto. NA: material no adsorbido. Calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1 M KCl. B: Northern-blot de las fracciones de la columna DEAE-sefarosa. Calles igual que en A.



En la Figura 30 se muestran las bandas obtenidas en uno de estos ensayos.

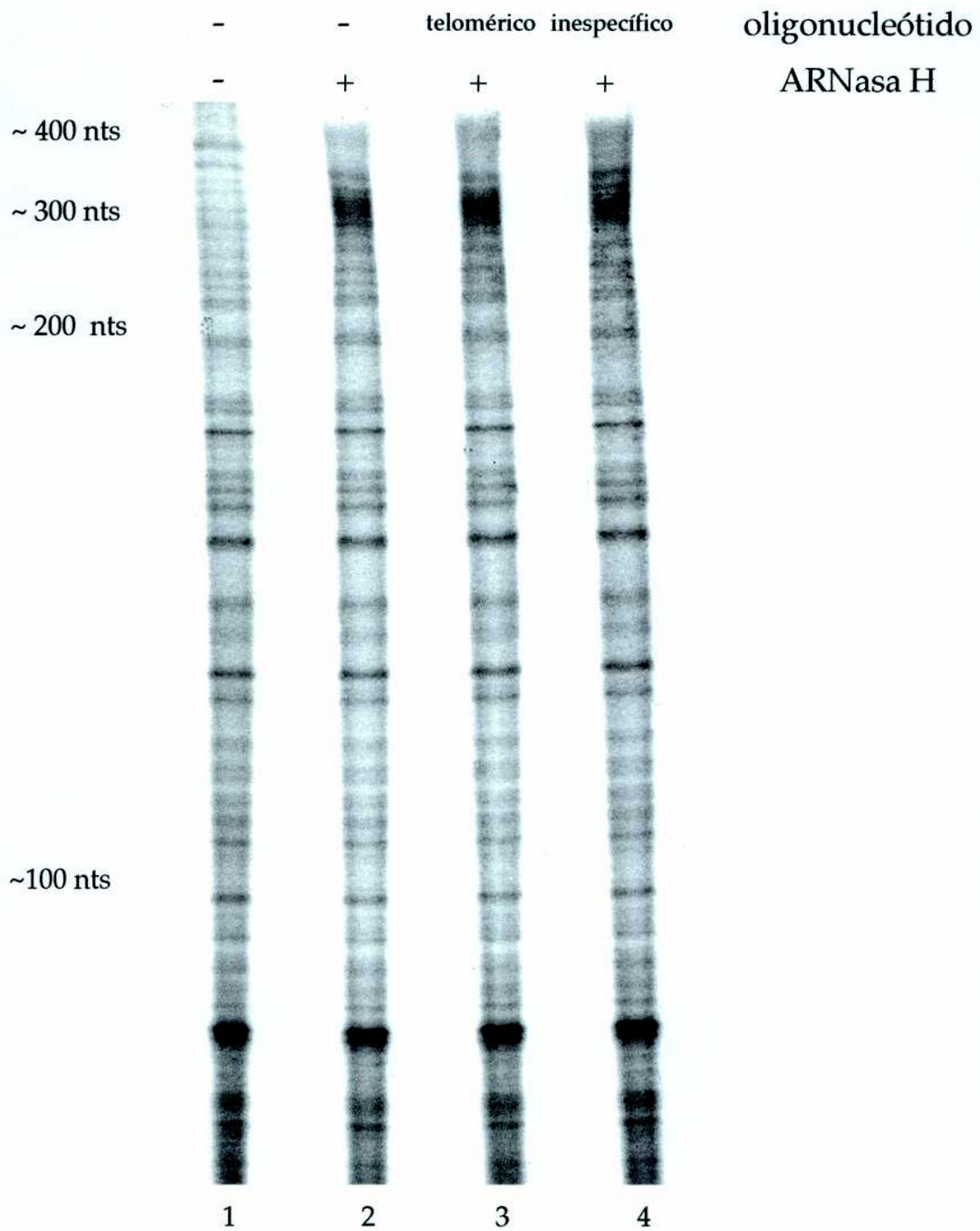
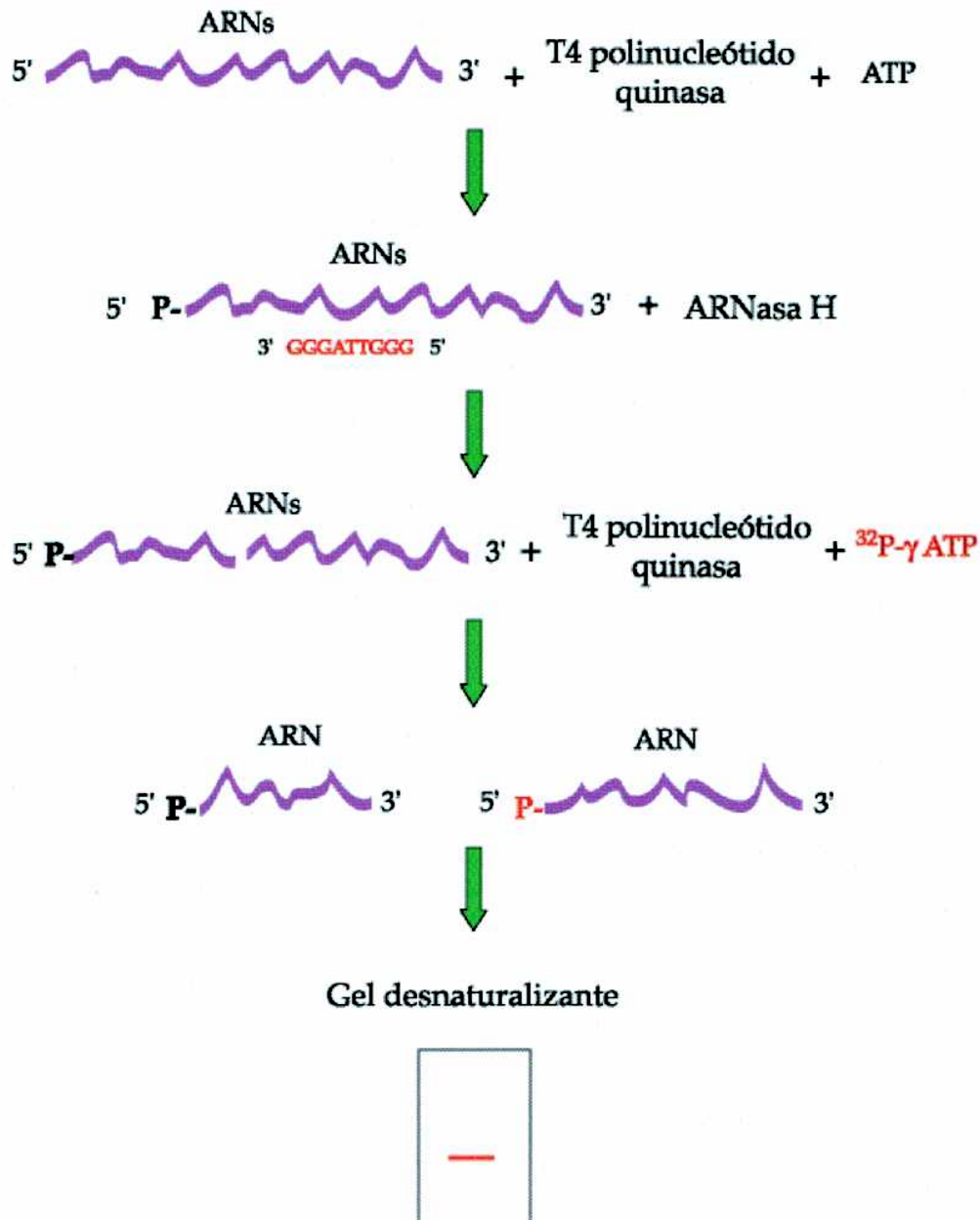


Figura 30: Degradación específica de ARNs dirigida por oligonucleótidos complementarios al templado del ARN y ARNasa H.

A pesar de haber usado para este ensayo fracciones altamente purificadas de la enzima, el gran número de ARNs presentes en estas fracciones impidió distinguir la desaparición de una banda en particular. Seguidamente invertimos dos de los pasos del protocolo anterior, como se esquematiza más abajo.



En la Figura 31 se muestra la autorradiografía de uno de los geles obtenidos en este ensayo. En las calles 2 y 3 se observa un número muy discreto de bandas, señaladas con flechas en la figura. Especulativamente alguna de las bandas podrían pertenecer a la telomerasa, dado que sólo estaban presentes en aquellos ensayos en presencia del oligonucleótido específicamente dirigido contra el ARN de la telomerasa de *T. cruzi* y no con un oligonucleótido inespecífico (calle 4).

Las bandas obtenidas con el protocolo anterior fueron clonadas y secuenciadas y ninguna de ellas correspondió al ARN de la telomerasa. Dado que los métodos convencionales de purificación enzimática no permitieron obtener un número discreto de ARNs con suficiente cantidad de material para clonar, llevamos adelante una purificación más específica de la enzima con un oligonucleótido biotinilado y sustituido (Figura 21). Dicho protocolo se utilizó como paso final en la serie de purificaciones por cromatografías convencionales tendientes a incrementar la especificidad de los ARNs obtenidos. Para disminuir la cantidad de ARNs inespecíficos eluimos a la enzima de las esferas de estreptavidina-agarosa o purificar todos los ARNs de esta fracción y someterlos al mismo procedimiento como segundo paso de purificación. El clonado se realizó con el protocolo que se describe a continuación. Se agregó en ambos extremos de los ARNs obtenidos, secuencias conocidas de manera tal de amplificar con un paso de PCR el material obtenido.

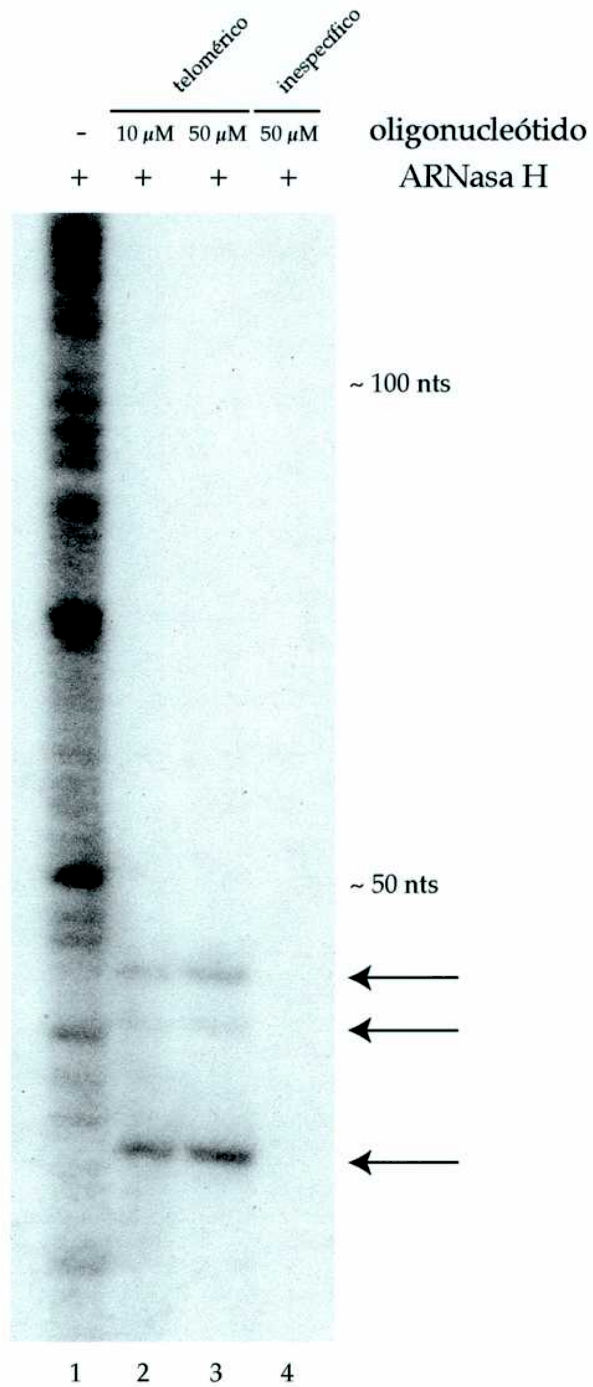
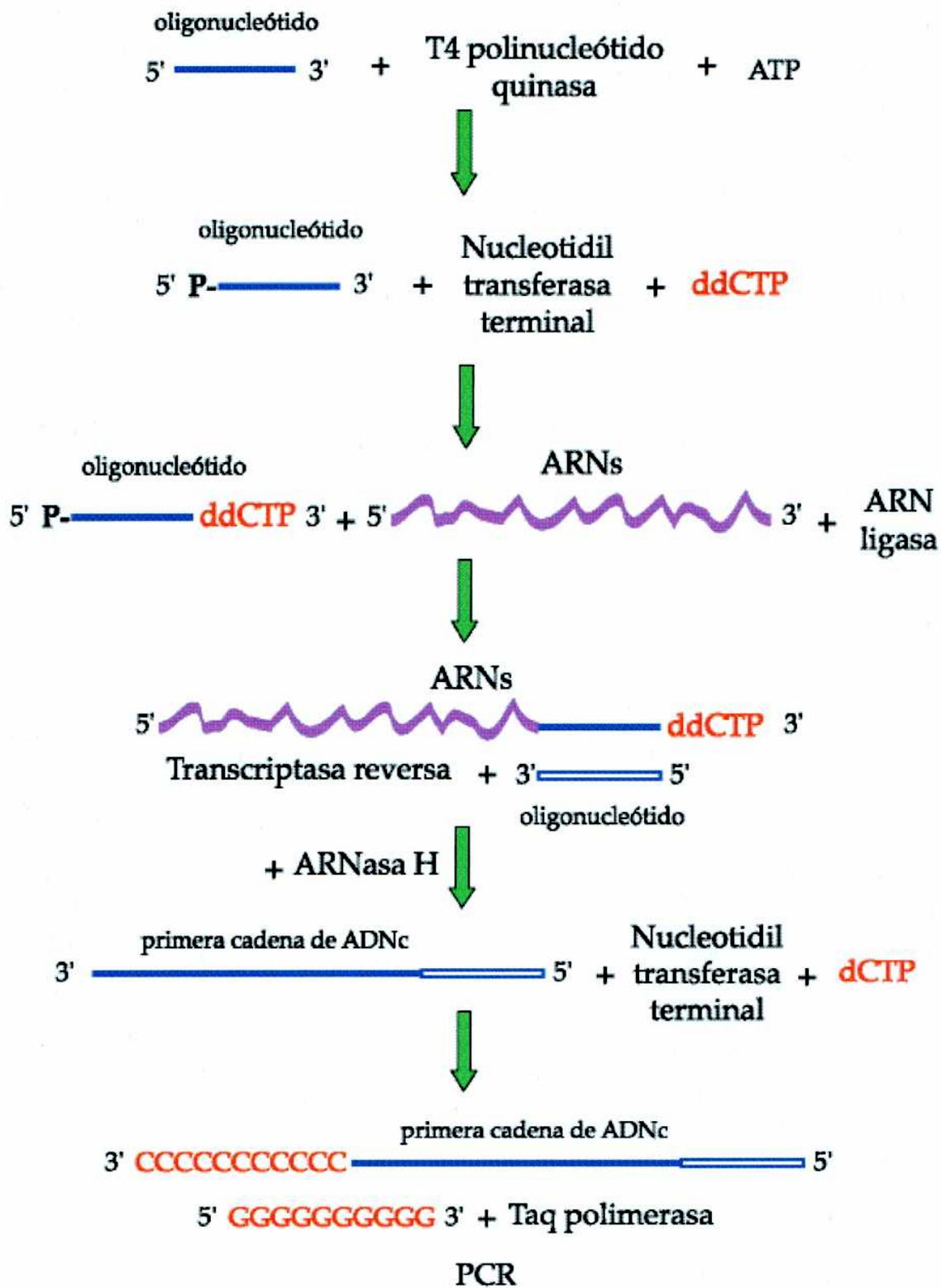
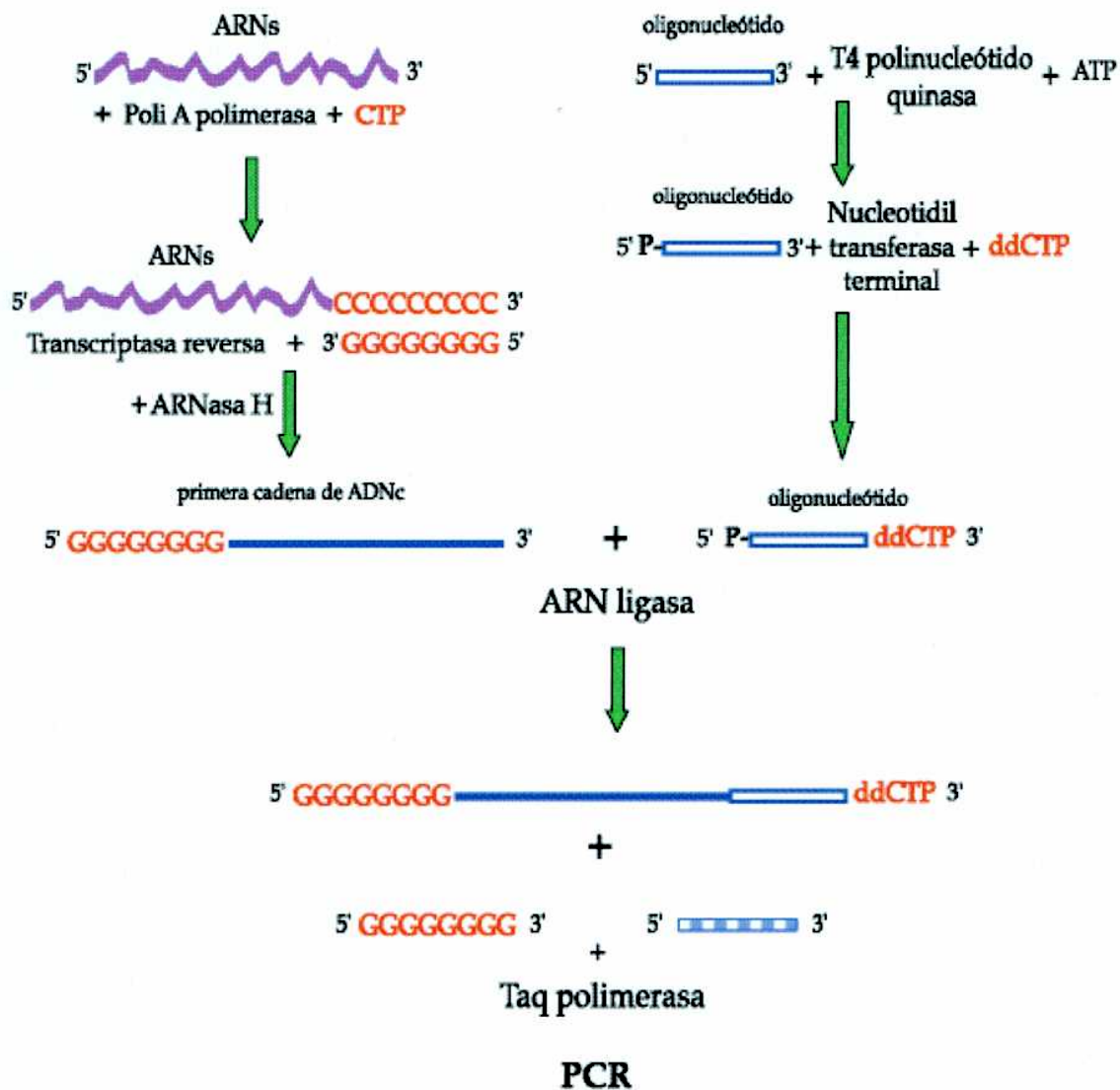


Figura 31: Degradación específica de ARNs dirigida por oligonucleótidos complementarios al templado del ARN de la telomerasa de *T. cruzi* con ARNasa H.



o la variante que sigue más abajo:



o con síntesis de ADNc con random primers (6 nts) y síntesis de la segunda hebra con una combinación de ADN ligasa, ADN polimerasa I y T4 ADN polimerasa y clonado directo por ligación de extremos romos en pBluescript.

Con los dos primeros protocolos se obtuvieron productos que poseían dos oligonucleótidos e inversiones de los mismos, por lo que decidimos variar la concentración de los oligonucleótidos en la PCR y probar con el agregado de DMSO como agente desnaturalizante en la misma. A pesar de ellos, ninguno de los clones obtenidos correspondió al

ARN de la telomerasa. Con el segundo método, el 95% de los clones secuenciados fueron ARNr 18S y el resto tampoco fueron los correctos.

Creemos sin embargo, que el conjunto de estos protocolos, con sutiles variaciones, nos permitirá en un futuro descifrar el objetivo final de este capítulo de gran interés en la organización biológica de este parásito.

Crosslinking del ARN a la subunidad catalítica de la telomerasa de *T. cruzi*

El último método utilizado para detectar y caracterizar al ARN de la telomerasa de *T. cruzi*, se basó en que moléculas fotorreactivas como los psoralenos, que intercalados entre dos hebras de ácidos nucleicos y excitados a una longitud de onda de ~300 nm, son capaces de unir covalentemente dos bases (principalmente A-T) situadas en hebras opuestas (Figura 32A). Tomando ventaja de que esta secuencia está presente cuando un sustrato de ADN es alineado al ARN de la telomerasa y elongado (Figura 32B), realizamos ensayos de actividad con un oligonucleótido que es eficientemente elongado por la enzima (datos no mostrados) y cuyo extremo 3' hibridiza con parte del templado en el ARN (~~~~GGGTT). Las condiciones de reacción utilizadas permiten a la enzima elongar únicamente hasta terminar de copiar el templado, para ello sólo agregamos a la reacción ^{32}P - α dGTP y dATP/dGTP frío. Una vez finalizada la reacción, se agregó el psoraleno (AMT) e irradió con UV. Las reacciones fueron luego resueltas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

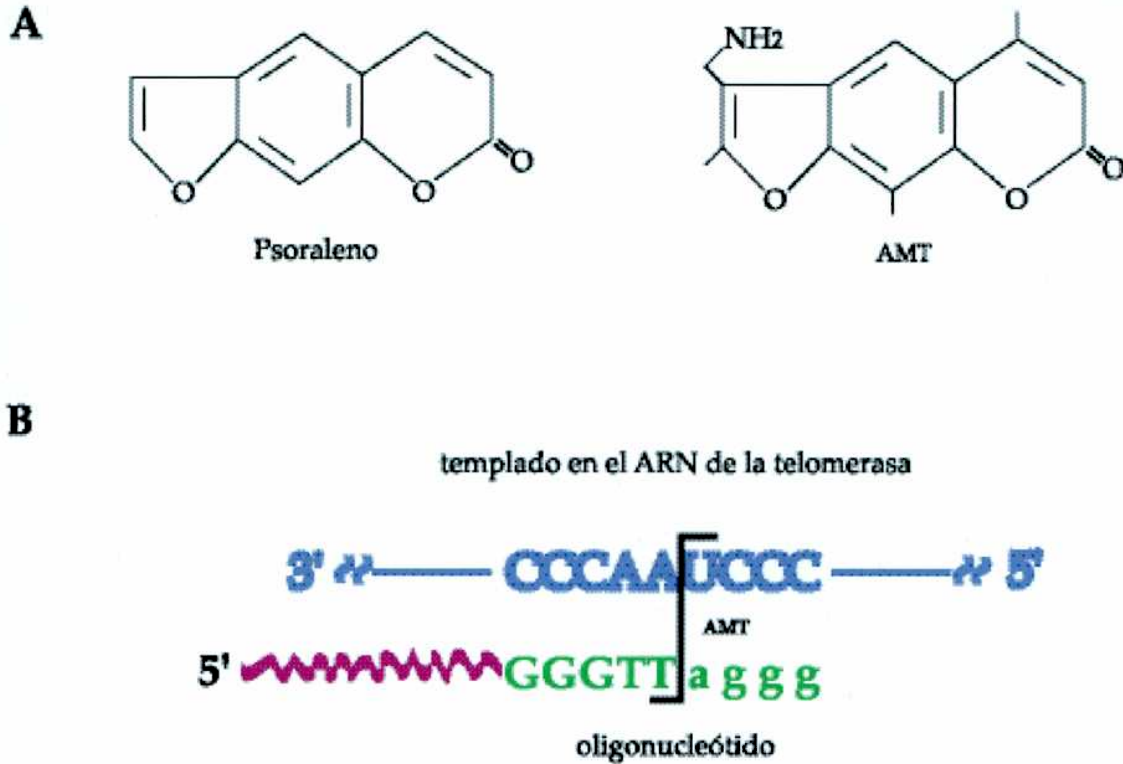


Figura 32: Esquema de los psoralenos como intercalantes entre dos hebras de ácidos nucleicos. A: psoralenos comunmente utilizados. B: posible sitio de intercalación y “crosslinking” entre la telomerasa y su sustrato elongado.

Como se muestra en la Figura 33, es posible visualizar bandas discretas de distintos tamaños (marcadas con flechas en la Figura) (calles 1, 2, 3, 5, 6, y 7), pero es difícil determinar comparando entre los distintos tratamientos, que exista una banda diferencial que pueda ser atribuída al ARN de la telomerasa de *T. cruzi*.

Todos estos resultados muestran al igual que en *Tetrahymena* que la actividad de la telomerasa de *T. cruzi* es lo suficientemente robusta para ser detectada por el método de PE, dado que la concentración del sustrato es suficientemente alta, pero para detectar el ARN probablemente se requieran concentraciones mayores de la enzima.

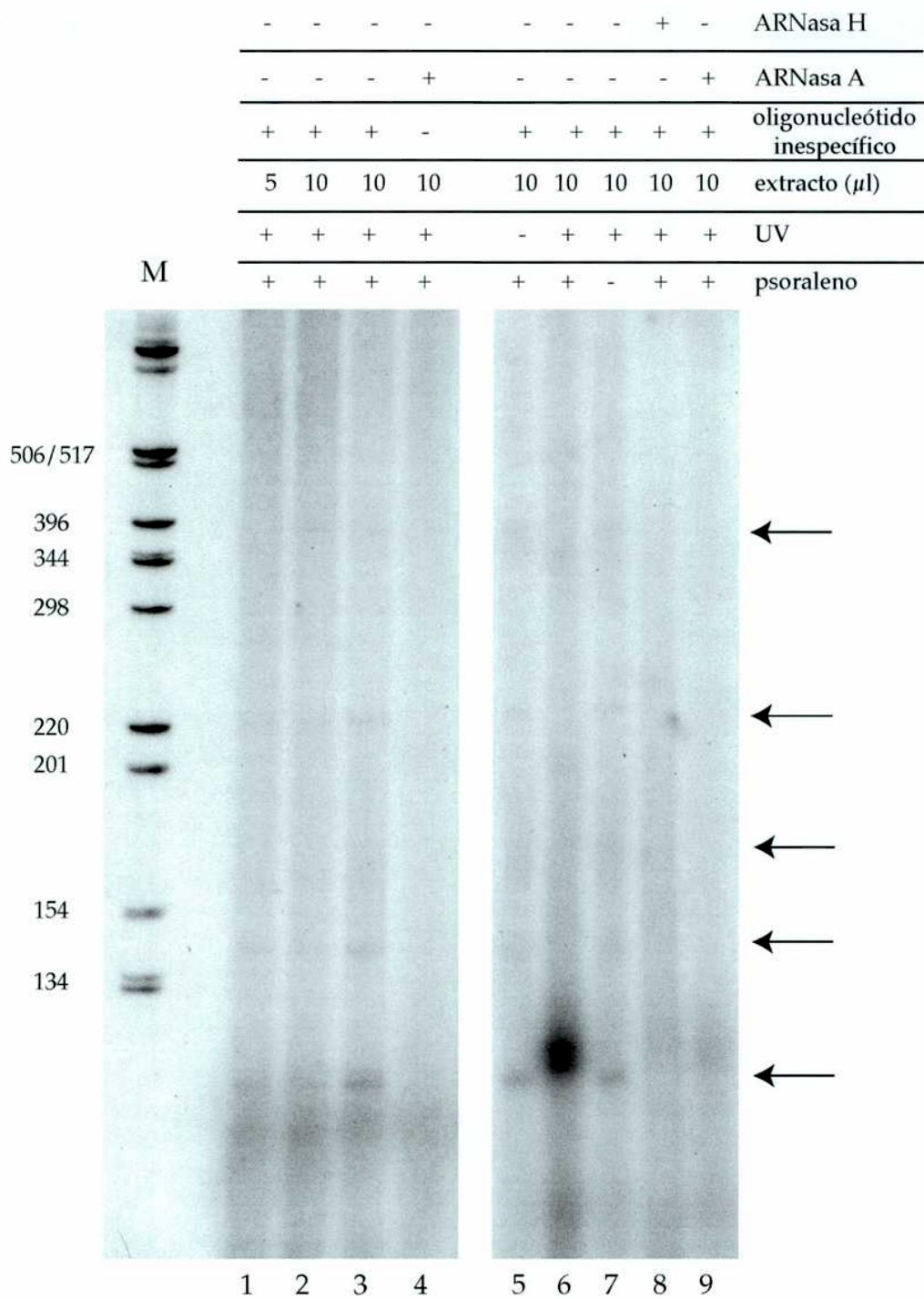


Figura 33: "Crosslinking" de un oligonucleótido al complejo de la telomerasa de *T. cruzi*. Calles 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8: reacciones con AMT. Calles 2 a 8: reacciones irradiadas con UV. Calle 4: reacción tratada con ARNasa H. Calle 5: reacción tratada con ARNasa A. Calle 8: reacción sin la presencia de oligonucleótido inespecífico. Calles 6 y 7: 5 y 10 μ l de extracto CHAPS. M: marcadores de peso molecular de ADN marcados con polinucleótido quinasa.

Asociación de la telomerasa de *T. cruzi* con la proteína La

En el año 1996 se purificó la telomerasa de *E. aediculatus* describiéndose que la RNP estaba formada por dos polipéptidos (uno de 123 kDa y otro de 43 kDa) y la molécula de ARN (Lingner and Cech, 1996). Se secuenció la proteína de 123 kDa y resultó ser la subunidad catalítica de la telomerasa. En el año 2000 se caracterizó la segunda proteína resultando ser homóloga al autoantígeno La (Aigner et al., 2000). Anticuerpos dirigidos contra ella están presentes en los enfermos que padecen de lupus eritematoso sistémico. Como mencioné en la introducción, se cree que la asociación de La con la telomerasa está involucrada en la estabilidad del ARN o en la biogénesis de la RNP. En la búsqueda de nuevos métodos de purificación de la enzima de trypanosomas y dado que esta proteína (La), fue descrita en *T. brucei*, tratamos de determinar si la misma esta también asociada a la telomerasa de *T. cruzi*. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra una versión recombinante de la proteína de *T. brucei*. La Figura 34 muestra la asociación de la telomerasa de *T. cruzi* con la proteína La, dado que anticuerpos dirigidos contra la misma son capaces de inmunoprecipitar a la telomerasa detectada por PE (calles 5 y 7). Controles utilizando suero preinmune mostraron resultados negativos (calle 3).

Dado que se detectó actividad de telomerasa remanente en el sobrenadante después de la primera inmunoprecipitación (Figura 34 calles 2, 4 y 6), intentamos establecer si la inclusión de varios ciclos de inmunoprecipitación depleta la actividad del sobrenadante. En contraste de lo que sucede con la enzima de *Euplotes* y como se observa en la Figura 35, aún después de tres ciclos de inmunoprecipitación con mayor concentración

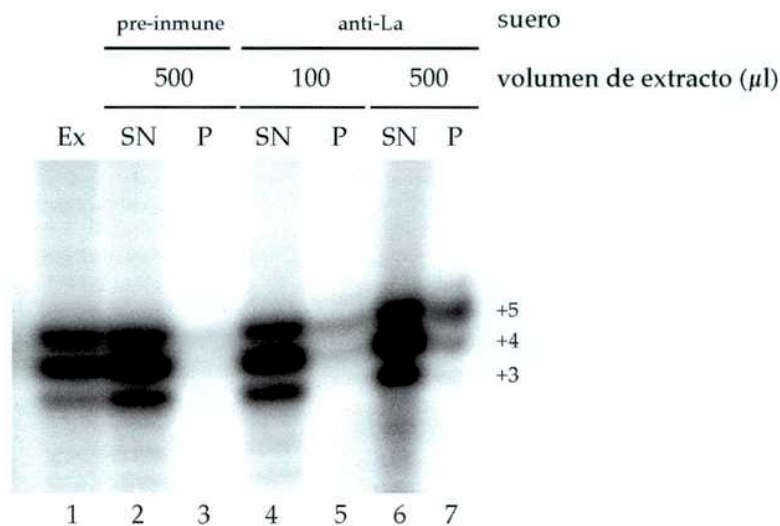


Figura 34: Asociación de la telomerasa de *T. cruzi* con la proteína La. Ex: extracto. Calles 2 y 3: suero preinmune en presencia de 500 μ l de extracto CHAPS. Calles 4 y 5: suero anti-La en presencia de 100 μ l de extracto CHAPS. Calles 6 y 7: suero anti-La en presencia de 500 μ l de extracto CHAPS. Calles 2, 4, y 6: actividad detectada por PE en los sobrenadantes (SN) después de la inmunoprecipitación. Calles 3, 5, y 7: actividad de telomerasa en los inmunoprecipitados (P).

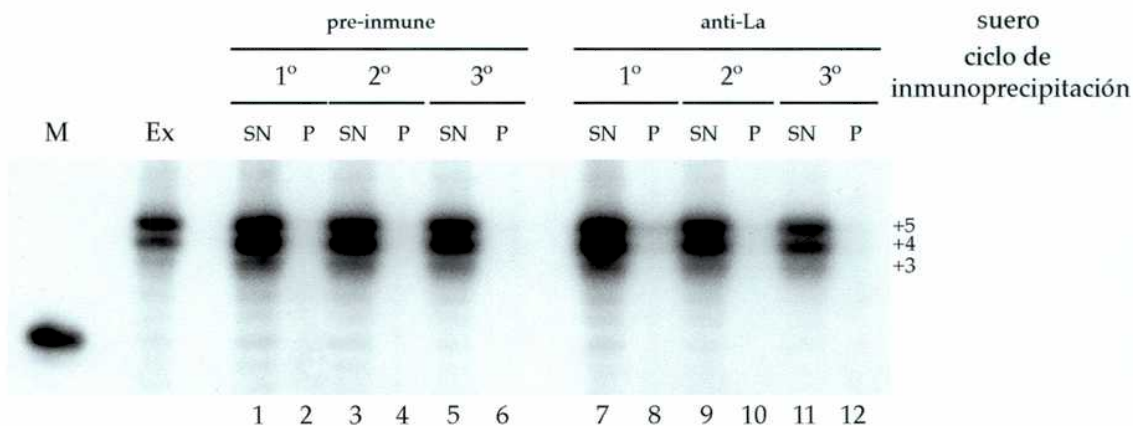


Figura 35: Inmunoprecipitación de la telomerasa de *T. cruzi* con anticuerpos dirigidos contra la proteína La. Calles 1 a 6: suero preinmune. Calles 7 a 12: suero anti-La. Calles impares: sobrenadantes (SN) después de la inmunoprecipitación. Calles pares: inmunoprecipitados (P).

de anticuerpo, persiste la actividad de telomerasa en el sobrenadante aunque haya sido depletada totalmente del extracto la proteína La, ensayado por Western-blot (dato no mostrado).

Estos resultados pueden interpretarse considerando que la proteína La se une al extremo de tres o cuatro Ues presentes en el 3' de todos los ARNs sintetizados por la ARNpol III. Este segmento es generalmente procesado, de manera que los ARNs al no poseer más el mismo, pierden también su asociación con la proteína La y son exportados del núcleo. Los ARNs de las telomerasas de los ciliados son sintetizados por esta polimerasa pero en su conformación madura retienen el extremo de Ues, y tal vez es por esta razón que toda la telomerasa de *Euplotes* se encuentra unida a esta proteína. En el caso de *T. cruzi*, tal vez en cierta etapa de su biogénesis o ensamblado o compartimentalización, la proteína La se encuentra asociada a la misma, pero sólo con una fracción de la telomerasa que corresponde a alguno de los pasos mencionados. Sería interesante establecer si esta interacción está involucrada en alguna de esas funciones y también establecer si el hecho de que este ARN esté asociado a La, significaría que el mismo es sintetizado por la ARN polIII.

Discusión y conclusiones

T. cruzi es el agente etiológico del Mal de Chagas, también conocido como trypanosomiasis americana. Existen más de 18 millones de personas infectadas con este parásito desde el sur de México hasta Chile y Argentina (Organization, 1991). En el mundo, también son muchas las personas infectadas o en riesgo de contraer otras trypanosomiasis. Las drogas existentes contra *T. cruzi* son efectivas en la cura de la enfermedad en su fase aguda, si es detectada a tiempo, pero no lo son para la etapa crónica y poseen importantes efectos colaterales. Por otra parte, las drogas contra *T. brucei* son muy onerosas y no hay laboratorios ni gobiernos con capacidad de inversión o interés para adquirirlas, y en el caso de las *leishmanias* rápidamente surgen parásitos resistentes a la terapia aplicada. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas drogas para tratar estas infecciones. Un mejor entendimiento de la biología de estos parásitos y sus requerimientos en las distintas etapas de sus ciclos de vida, deberían promover el desarrollo de nuevas drogas específicas, con bajos efectos colaterales, y económicamente más accesibles.

En este trabajo demostramos que la actividad de telomerasa está presente en extractos celulares provenientes de las cuatro formas del ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 15) y en extractos provenientes de otros siete kinetoplastidos relacionados (Figura 14). Esto sugiere que la telomerasa ha surgido muy temprano en la evolución como mecanismo para el mantenimiento de la longitud telomérica, dado que varios organismos bastante primitivos como los kinetoplastidos, poseen esta enzima para mantener sus telómeros.

La capacidad de detectar a la actividad de telomerasa en *T. cruzi* por el método de PE, sugiere que existe una sustancial cantidad de la enzima en

este parásito. Este resultado fue sorprendente dado que este organismo sólo posee entre 64 y 80 cromosomas (Cano et al., 1995; Henriksson et al., 1995) y no parece haber mecanismos de reparación cromosómica programada (“chromosome healing”), como en el macronúcleo de los ciliados donde el número de telómeros puede llegar a 10^7 (Prescott and Blackburn, 1997b). Fue también sorprendente detectar esta alta actividad, aún en estadios del ciclo de vida que no son replicativos (por ejemplo, los trypomastigotes metacíclicos). Quizás la necesidad de un cambio rápido entre alguno de esos estadios o de una rápida proliferación de los mismos, obliga a los parásitos a tener una cantidad de enzima activa siempre debido a la carencia de mecanismos de síntesis, ensamblado o regulación rápidos más específicos. El hecho de tener una enzima activa en extractos celulares en un ensayo *in vitro*, no significa necesariamente que la enzima este activa *in vivo*, dado que la misma puede no tener acceso por ejemplo a su sustrato natural (los extremos 3' de los cromosomas). Este acceso puede estar limitado por distintas proteínas (Evans and Lundblad, 1999), por estructuras como los t-loops presentes en los extremos cromosómicos (Griffith et al., 1999; Muñoz-Jordán et al., 2001) o porque la enzima no está en el núcleo, como sucede en el caso de los linfocitos T humanos, donde la telomerasa es fosforilada y translocada al núcleo cuando estas células son activadas (Liu et al., 2001). En este trabajo demostramos que la enzima de epimastigotes de *T. cruzi* está presente tanto en extractos citoplasmáticos como en nucleares (Figura 13B). En base a estos datos sería interesante investigar si existe alguna diferencia entre estos dos “pools” de la enzima y si la localización diferencial de la misma involucra también un paso de fosforilación. También sería interesante establecer si por ejemplo la presencia de la enzima en los estadios no replicativos se debe a que es enzima remanente de los estadios previos (replicativos) o es que la

expresión de la misma es constitutiva a lo largo de todo el ciclo de vida de este parásito.

Los estudios bioquímicos de la enzima de *T. cruzi* sugieren que aunque las propiedades individuales de la enzima no son totalmente novedosas con respecto a las descritas previamente para otras telomerasas de otros grupos filogenéticos, la combinación de dichas características de la telomerasa de *T. cruzi* son únicas y por lo tanto permiten distinguirla de las enzimas de otros organismos como la de los ciliados, levaduras y mamíferos. En particular en nuestro caso, una enzima de gran tamaño se combina con un papel mínimo de un sitio independiente de hibridización con el templado para la interacción con el sustrato.

La actividad de telomerasa de *T. cruzi* particiona en una columna de filtración molecular (Superosa 6, Figura 23) mayoritariamente en el volumen de exclusión de la misma, sugiriendo que el peso molecular aparente de la RNP es bastante superior a 670 kDa. Los métodos de filtración molecular y gradientes de glicerol han arrojado tamaños de RNPs de 250-500 kD para las enzimas de *Tetrahymena* y *Euplotes aediculatus* (Collins, 1999; Lingner and Cech, 1996; Wang and Blackburn, 1997); de 280, 550 y 1600 kD para las RNPs catalíticamente distintas de *Euplotes crassus* (Greene and Shippen, 1998); y de más de 700 kD para las enzimas de levaduras y mamíferos (Lingner et al., 1997a; Lue and Peng, 1997; Schnapp et al., 1998). En estas telomerasas se han identificado distintos componentes que permanecen en los complejos activos de las mismas, pero funcionalmente independientes que no aportan a la actividad catalítica de las mismas, confiriéndole estabilidad, compartimentalización, biogénesis, etc, de la RNP. (Aigner et al., 2000; Mitchell et al., 1999b; Seto et al., 1999). Nuestros resultados sugieren que probablemente la RNP de la telomerasa de *T. cruzi* posee otros componentes (estables o transitorios como puede

ser la proteína La), además de la subunidad catalítica y la molécula de ARN, que pueden tener funciones similares a los descritas para otras telomerasas y que den lugar a esta RNP activa con un gran peso molecular como el descrito. Aunque nosotros no detectamos por ningún método de fraccionamiento por tamaño, actividad de telomerasa en fracciones con pesos moleculares aparentes menores a ~600 kDa, no podemos descartar que el alto peso molecular de la enzima de *T. cruzi* se deba a la formación de multímeros de la misma como se ha demostrado para las telomerasas de levaduras y de humanos (Prescott and Blackburn, 1997a; Wenz et al., 2001).

Para las telomerasas que han sido caracterizadas utilizando el método de PE, se ha demostrado que las mismas son capaces de elongar una diversidad grande de oligonucleótidos de simple cadena (Collins, 1999). *In vivo*, proteínas asociadas a la telomerasa y a los telómeros restringen el acceso de la telomerasa a su potencial sustrato, pero *in vitro*, la especificidad por los mismos parece menos estricta. La hibridización del extremo 3' del oligonucleótido sustrato con el templado promueve la síntesis de repeticiones teloméricas precisas, aún si la permutación de la repetición en el sustrato no es constante. Sin embargo, para la mayoría de las telomerasas, esta hibridización no es un prerrequisito para que exista elongación. De hecho, la afinidad por el sustrato *in vitro* parece derivar predominantemente de la interacción con un sitio de anclaje en el componente proteico de la RNP. Las propiedades de la interacción del sustrato con el/los sitio/s de anclaje/s varían entre las distintas telomerasas e inclusive en telomerasas de un mismo organismo pero en distintos estadios de desarrollo (Greene and Shippen, 1998). Contrariamente a lo que sucede con la mayoría de las otras telomerasas, el reconocimiento del sustrato por la enzima de *T. cruzi* es absolutamente dependiente de la presencia de

secuencia telomérica en el extremo 3' del mismo. Este resultado obtenido *in vitro* es totalmente consistente con los resultados obtenidos en un estudio *in vivo*, en el cual se introdujeron moléculas lineales de ADN en las formas sanguíneas de *T. brucei* con el objetivo de estudiar la formación de un nuevo telómero. Los autores observaron que para que haya formación de un nuevo telómero se requieren en estos sitios secuencias teloméricas preexistentes (Horn et al., 2000). Al igual de lo que sucede con la telomerasa humana (Morin, 1989), aunque no con la misma especificidad, encontramos que la telomerasa de *T. cruzi* discrimina aún entre distintos oligonucleótidos teloméricos y esto hace que sustratos con determinadas permutaciones teloméricas en sus extremos 3' sean mucho mejor elongados que otros. Oligonucleótidos que terminan en GGGTTAGGG-3' parecen hibridizar con el templado de manera tan fuerte que no son bien elongados, son preferencialmente sujetos a clivaje nucleolítico (Figura 18) y pueden inhibir la elongación de oligonucleótidos teloméricos con otras permutaciones (Figura 20). Oligonucleótidos de 9 bases (datos no mostrados) o con una sola repetición telomérica en el extremo 3' (Figura 18) son eficientemente extendidos por la telomerasa de *T. cruzi* como sus contrapartes teloméricas de 18 nts. Todos estos resultados sugieren que la interacción entre la telomerasa de este parásito y sus sustratos de ADN *in vitro*, es mediada principalmente por la hibridización con el templado en la molécula de ARN. Quizás la permutación atípica rica en Cs propuesta por nosotros para el templado, provee una afinidad de unión mayor que compensa la carencia de interacciones en el/los sitio/s de anclaje/s.

Además de existir mínima contribución de ese/os sitio/s a la interacción de la enzima con sus sustratos, parece tener muy poca influencia aparente de los mismos en un aumento de la procesividad para el agregado de repeticiones. Una moderada procesividad para el agregado de

repeticiones puede detectarse en la telomerasa de *T. cruzi* cuando los geles provenientes de ensayos de actividad con extractos crudos, se exponen por un largo período o en algunas preparaciones de la enzima parcialmente purificadas (Figura 21). En las condiciones descritas aquí para las reacciones de actividad existe un gran exceso de sustrato, lo que sugiere que la síntesis de repeticiones múltiples obtenida, deriva del agregado de estas repeticiones a un mismo sustrato sin disociación del complejo enzima-sustrato/producto. Nosotros no observamos ningún aumento sustancial en esta procesividad con los distintos pasos de purificación por cromatografías convencionales ni en relación con la concentración de dGTP o sus análogos mono y difosfato (Figura 17). Como mencioné anteriormente, los telómeros de *T. brucei* mantenido en ratones, crecen a una velocidad de 6-10 bases por división (Bernards et al., 1983). De acuerdo con este resultado no sería necesaria una gran procesividad para mantener esta velocidad de elongación telomérica. La gran cantidad de telomerasa presente en epimastigotes de *T. cruzi*, sugerido por la robusta actividad detectada por el método de PE, puede compensar el hecho de agregar una sola repetición por cada evento de unión a su sustrato.

Se obtuvo un buen grado de purificación con el oligonucleótido sustituido complementario al ARN de la telomerasa como fuera demostrado para las enzimas de *E. aediculatus* y humanos (Lingner and Cech, 1996; Schnapp et al., 1998). Se pudo lograr depletar completamente la actividad de telomerasa del extracto cuando se utilizó el oligonucleótido cuyo extremo es: 5'-G₃U₂AG₃-3' comparado con un oligonucleótido más extenso terminado en la permutación 5'-GU₂AG₃U₂AG-3'. Esta es la evidencia más fuerte hasta el momento que nos permite predecir que la secuencia del templado en la molécula de ARN es 5'-CCCUAACCC-3'. Aunque, el límite 5' exacto del templado y la precisa longitud del mismo, deberían ser

confirmadas a partir del clonado y la secuenciación de esta subunidad. Sin embargo, nuestros esfuerzos por aislar e identificar el ARN de la telomerasa de *T. cruzi* han sido hasta ahora infructuosos.

En la búsqueda de nuevos métodos de purificación de la enzima y para establecer si el ARN era un producto de la ARN polIII como sucede en los ciliados, intentamos purificar a la telomerasa utilizando anticuerpos realizados contra la proteína La recombinante de *T. brucei* (Marchetti et al., 2000; Westermann and Weber, 2000). Sólo una pequeña fracción de la actividad de la telomerasa fue recuperada por este método aún después de tres ciclos de inmunoprecipitación (Figura 35), ello deja abierta el interrogante planteado más arriba e inclusive el significado de esta asociación en cuanto a la composición y la biogénesis de la RNP de la telomerasa de *T. cruzi*.

Describimos en este trabajo la secuencia telomérica de cinco kinetoplástidos. La misma es igual para todos ellos e invariable, lo que nos permite concluir que al contrario de lo que sucede con la enzima de *P. tetraurelia* (McCormick-Graham et al., 1997; McCormick-Graham and Romero, 1996), las telomerasas de los kinetoplástidos son fieles al copiar el templado presente en la molécula de ARN componente de la RNP.

Todos nuestros intentos de clonar la subunidad catalítica de la telomerasa de distintos kinetoplástidos han sido también infructuosos. En el mismo momento en que nosotros probábamos uno de los últimos protocolos con este fin, se publicaron las secuencias de dos nuevas posibles TERTs: la de *Caenorhabditis elegans* y la de *Giardia lamblia*. Como se observa en el esquema de la Figura 36, la telomerasa de *G. lamblia* posee una tamaño similar al resto de las TERTs aunque carece del motivo T, que era una característica única de estas polimerasas hasta ese entonces. Lo mismo es válido para la secuencia descrita en *C. elegans* aunque de menor

tamaño. Posteriormente a esto, decidimos esperar a que el proyecto genoma de *T. cruzi* arroje la secuencia de esta subunidad. En un congreso en Cold Spring Harbor (2001), se describió una posible secuencia de TERT en *Plasmodium falciparum* la cual no sólo difiere en secuencia en los motivos altamente conservados, sino que también es distinta en tamaño total a las telomerasas descritas y también en que no se mantiene el espaciamiento entre los motivos de transcriptasas reversas, característica que era utilizada como parámetro para distinguir a las telomerasas de estas otras polimerasas. Dado que los kinetoplástidos y los organismos apicomplejos como *Plasmodium*, son parásitos que poseen algunas características en común, especulamos que tal vez las telomerasas de estos organismos sean más similares entre sí que con otros organismos y si esto es de esta manera, el clonado se dificulta aún más dado que carecemos de parámetros que sirvan de referencia en cuanto a tamaño o secuencia de los motivos.

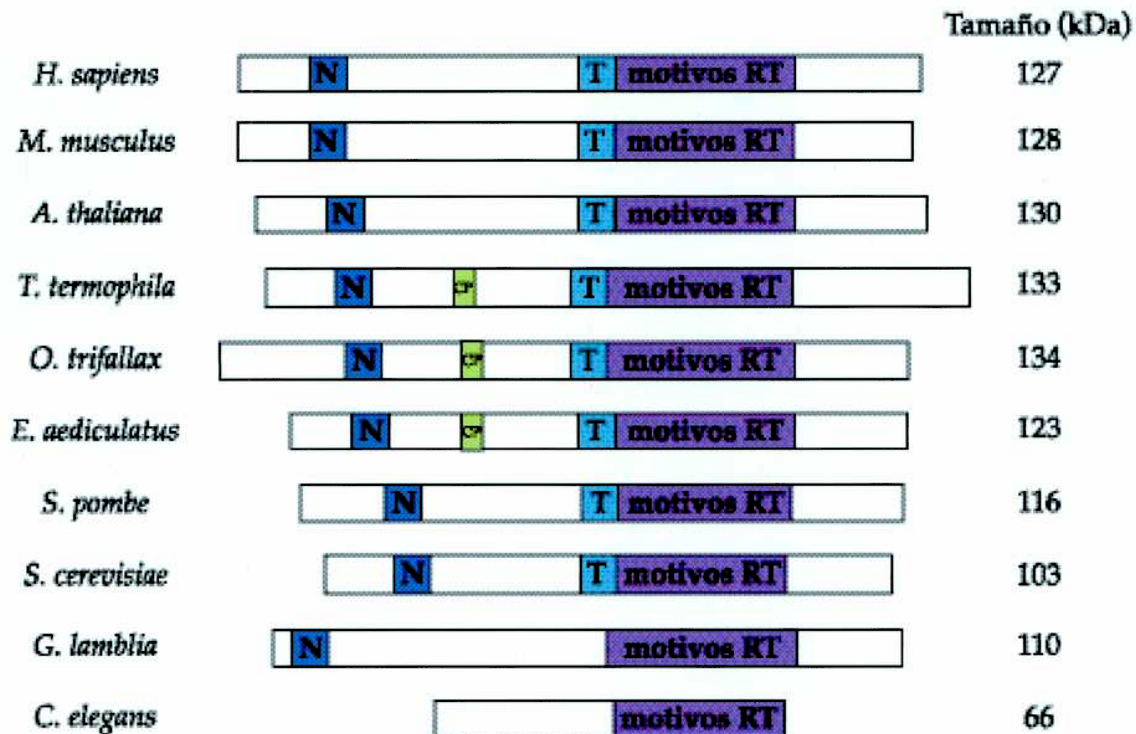


Figura 36: Comparación esquemática de los dominios conservados y tamaños de algunas de las telomerasas descritas hasta el día de la fecha. N: motivo conservado entre todas las telomerasas menos la de *C. elegans*. CP: motivo conservado entre las telomerasas de los ciliados. Motivos RT: motivos conservados entre las telomerasas y las transcriptasas reversas.

Este es el primer trabajo en el que se describen por primera vez las características bioquímicas de la telomerasa en todo el ciclo de vida de un organismo patógeno para el hombre como lo es *T. cruzi*. La presencia constitutiva de esta enzima, sugiere una regulación un tanto más laxa que a la que está sujeta por ejemplo la telomerasa humana en células somáticas que hospedan a este parásito. Además, la telomerasa de *T. cruzi* difiere de la telomerasa humana en la especificidad de sustrato y en el uso de distintas permutaciones en sus templados en las moléculas de ARNs, a pesar de que ambas enzimas sintetizan la misma repetición telomérica. Estas diferencias permitirían intentar una inhibición terapéutica de la telomerasa del parásito sin un impacto importante en el humano infectado, en el caso de que este

organismo posea mayores requerimientos de una actividad de telomerasa constitutiva y las características bioquímicas singulares puedan ser explotadas para el desarrollo de drogas específicas contra la enzima del parásito. Nuestros estudios de la telomerasa de *T. cruzi* presentados en este trabajo, amplían el rango filogenético de la enzimología comparativa de las telomerasas.



Dr. ALBERTO BALDE
IBYME - CONIGET



Lic. Denise Paula Muñoz

Referencias

- Acosta, A. M., and Santos-Buch, C. A. (1985). Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* 71, 1255-1261.
- Adam, R. D., Nash, T. E., and Wellems, T. E. (1991). Telomeric location of *Giardia* rDNA genes. *Mol Cell Biol* 11, 3326-3330.
- Adams, A. K., and Holm, C. (1996). Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 4614-4620.
- Aigner, S., Lingner, J., Goodrich, K. J., Grosshans, C. A., Shevchenko, A., Mann, M., and Cech, T. R. (2000). Euplotes telomerase contains an La motif protein produced by apparent translational frameshifting [In Process Citation]. *Embo J* 19, 6230-6239.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., and Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10114-10118.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, F., Smith, J., and Struhl, K. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.).
- Autexier, C., Pruzan, R., Funk, W. D., and Greider, C. W. (1996). Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *Embo J* 15, 5928-5935.
- BANK/WHO, U. W. (1989-1990). Tropical disease research.
- Bass, H. W., Marshall, W. F., Sedat, J. W., Agard, D. A., and Cande, W. Z. (1997). Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *J Cell Biol* 137, 5-18.

- Baumann, P., and Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171-1175.
- Belli, S. I. (2000). Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* 30, 679-687.
- Berman, J., Tachibana, C. Y., and Tye, B. K. (1986). Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3713-3717.
- Bernards, A., Michels, P. A., Lincke, C. R., and Borst, P. (1983). Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes. *Nature* 303, 592-597.
- Biessmann, H., Carter, S. B., and Mason, J. M. (1990). Chromosome ends in *Drosophila* without telomeric DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1758-1761.
- Biessmann, H., and Mason, J. M. (1988). Progressive loss of DNA sequences from terminal chromosome deficiencies in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 7, 1081-1086.
- Bisoffi, M., Chakerian, A. E., Fore, M. L., Bryant, J. E., Hernandez, J. P., Moyzis, R. K., and Griffith, J. K. (1998). Inhibition of human telomerase by a retrovirus expressing telomeric antisense RNA. *Eur J Cancer* 34, 1242-1249.
- Blackburn, E. H., and Challoner, P. B. (1984). Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 36, 447-457.
- Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B., and Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., and Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA [see comments]. *Cell* 91, 25-34.

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., and Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [see comments]. *Science* 279, 349-352.

Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B., Ruiz, A., and Cazzulo, J. J. (1984). Purification and properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemical Physiology* 77, 599-604.

Borst, P., Bitter, W., Blundell, P. A., Chaves, I., Cross, M., Gerrits, H., van Leeuwen, F., McCulloch, R., Taylor, M., and Rudenko, G. (1998). Control of VSG gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91, 67-76.

Bottius, E., Bakhsis, N., and Scherf, A. (1998). *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing. *Mol Cell Biol* 18, 919-925.

Boulton, S. J., and Jackson, S. P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* 17, 1819-1828.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 17, 231-235.

Broccoli, D., Young, J. W., and de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9082-9086.

Bryan, T. M., Sperger, J. M., Chapman, K. B., and Cech, T. R. (1998). Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena*

thermophila and *Oxytricha trifallax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8479-8484.

Camasses, A., Bragado-Nilsson, E., Martin, R., Seraphin, B., and Bordonne, R. (1998). Interactions within the yeast Sm core complex: from proteins to amino acids. *Mol Cell Biol* 18, 1956-1966.

Cano, M. I., Dungan, J. M., Agabian, N., and Blackburn, E. H. (1999). Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3616-3621.

Cano, M. I., Gruber, A., Vazquez, M., Cortes, A., Levin, M. J., Gonzalez, A., Degrave, W., Rondinelli, E., Zingales, B., Ramirez, J. L., and et al. (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol* 71, 273-278.

Casjens, S., Murphy, M., DeLange, M., Sampson, L., van Vugt, R., and Huang, W. M. (1997). Telomeres of the linear chromosomes of Lyme disease spirochaetes: nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmid telomeres. *Mol Microbiol* 26, 581-596.

Cazzulo, J. J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *Faseb J* 6, 3153-3161.

Chapon, C., Cech, T. R., and Zaug, A. J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna* 3, 1337-1351.

Chen, J. L., Blasco, M. A., and Greider, C. W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503-514.

Chiurillo, M. A., Cano, I., Da Silveira, J. F., and Ramirez, J. L. (1999). Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 100, 173-183.

Cohn, M., and Blackburn, E. H. (1995). Telomerase in yeast. *Science* 269, 396-400.

Cohn, M., McEachern, M. J., and Blackburn, E. H. (1998). Telomeric sequence diversity within the genus *Saccharomyces*. *Curr Genet* 33, 83-91.

Collins, K. (1999). Ciliate telomerase biochemistry. *Annu Rev Biochem* 68, 187-218.

Collins, K., and Gandhi, L. (1998). The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8485-8490.

Collins, K., and Greider, C. W. (1993). *Tetrahymena* telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation. *Genes Dev* 7, 1364-1376.

Collins, K., Kobayashi, R., and Greider, C. W. (1995). Purification of *Tetrahymena* telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* 81, 677-686.

Cooper, J. P., Nimmo, E. R., Allshire, R. C., and Cech, T. R. (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385, 744-747.

Cooper, J. P., Watanabe, Y., and Nurse, P. (1998). Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature* 392, 828-831.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 11, 1921-1929.

Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B., and Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320.

Dalbagni, G., Han, W., Zhang, Z. F., Cordon-Cardo, C., Saigo, P., Fair, W. R., Herr, H., Kim, N., and Moore, M. A. (1997). Evaluation of the

telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1593-1598.

Dandjinou, A. T., Dionne, I., Gravel, S., LeBel, C., Parenteau, J., and Wellinger, R. J. (1999). Cytological and functional aspects of telomere maintenance. *Histol Histopathol* 14, 517-524.

de Lange, T. (1992). Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *Embo J* 11, 717-724.

de Lange, T. (1998). Ending up with the right partner. *Nature* 392, 753-754.

de Sousa, M. A. (1999). Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 205-210.

de Souza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 17-36.

de Souza, W., Carreiro, I. P., Miranda, K., and Silva, N. L. (2000). Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 72, 421-432.

Evans, S. K., and Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Ailion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., and et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.

Ferrari, I., Levin, M. J., Wallukat, G., Elies, R., Lebesgue, D., Chiale, P., Elizari, M., Rosenbaum, M., and Hoebeke, J. (1995). Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1- adrenergic receptor. *J Exp Med* 182, 59-65.

Fitzgerald, M. S., Riha, K., Gao, F., Ren, S., McKnight, T. D., and Shippen, D. E. (1999). Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14813-14818.

Freitas-Junior, L. H., Porto, R. M., Pirrit, L. A., Schenkman, S., and Scherf, A. (1999). Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. *Nucleic Acids Res* 27, 2451-2456.

Gineitis, A. A., Zalenskaya, I. A., Yau, P. M., Bradbury, E. M., and Zalensky, A. O. (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 151, 1591-1598.

Glukhov, A. I., Zimnik, O. V., Gordeev, S. A., and Severin, S. E. (1998). Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 368-371.

Gommers-Ampt, J. H., Van Leeuwen, F., de Beer, A. L., Vliegenthart, J. F., Dizdaroglu, M., Kowalak, J. A., Crain, P. F., and Borst, P. (1993). beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil: a novel modified base present in the DNA of the parasitic protozoan *T. brucei*. *Cell* 75, 1129-1136.

Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H., and Gasser, S. M. (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 134, 1349-1363.

Gottschling, D. E., and Zakian, V. A. (1986). Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* 47, 195-205.

- Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P., and Wellinger, R. J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741-744.
- Greene, E. C., and Shippen, D. E. (1998). Developmentally programmed assembly of higher order telomerase complexes with distinct biochemical and structural properties. *Genes Dev* 12, 2921-2931.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop [see comments]. *Cell* 97, 503-514.
- Gupta, G., Garcia, A. E., Guo, Q., Lu, M., and Kallenbach, N. R. (1993). Structure of a parallel-stranded tetramer of the *Oxytricha* telomeric DNA sequence dT4G4. *Biochemistry* 32, 7098-7103.
- Gustafsson, L. L., Beerman, B., and Abdi, Y. A. (1987). *Handbook of drugs for tropical parasitic diseases* (London, Taylor and Francis, Ltd).
- Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., and Weinberg, R. A. (1999). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells [see comments]. *Nat Med* 5, 1164-1170.
- Hajduk, S. L., Adler, B., Madison-Antenucci, S., McManus, M., and Sabatini, R. (1997). Insertional and deletional RNA editing in trypanosome mitochondria. *Nucleic Acids Symp Ser* 36, 15-18.

Hammond, P. W., Lively, T. N., and Cech, T. R. (1997). The anchor site of telomerase from *Euplotes aediculatus* revealed by photo-cross-linking to single- and double-stranded DNA primers. *Mol Cell Biol* 17, 296-308.

Hardy, C. D., Schultz, C. S., and Collins, K. (2000). Requirements for the dGTP-dependent Repeat Addition Processivity of Recombinant *Tetrahymena* Telomerase. *J Biol Chem*.

Harle-Bachor, C., and Boukamp, P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6476-6481.

Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

Harrington, L., Hull, C., Crittenden, J., and Greider, C. (1995). Gel shift and UV cross-linking analysis of *Tetrahymena* telomerase. *J Biol Chem* 270, 8893-8901.

Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.

Heller, K., Kilian, A., Piatyszek, M. A., and Kleinhofs, A. (1996). Telomerase activity in plant extracts. *Mol Gen Genet* 252, 342-345.

Hemann, M. T., and Greider, C. W. (2000). Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res* 28, 4474-4478.

Henriksson, J., Porcel, B., Rydaker, M., Ruiz, A., Sabaj, V., Galanti, N., Cazzulo, J. J., Frasch, A. C., and Pettersson, U. (1995). Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 73, 63-74.

Higuchi, M. d. L. (1999). Human chronic Chagas cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 263-267.

Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M. A., and Shay, J. W. (1995). Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes [see comments]. *Nat Med* 1, 249-255.

Hohaus, S., Voso, M. T., Orta-La Barbera, E., Cavallo, S., Bellacosa, A., Rutella, S., Rumi, C., Genuardi, M., Neri, G., and Leone, G. (1997). Telomerase activity in human hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 82, 262-268.

Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J. B., Morin, G. B., Toft, D. O., Shay, J. W., *et al.* (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 13, 817-826.

Holt, S. E., Aisner, D. L., Shay, J. W., and Wright, W. E. (1997). Lack of cell cycle regulation of telomerase activity in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10687-10692.

Holt, S. E., and Shay, J. W. (1999). Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 180, 10-18.

Holt, S. E., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1996). Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol* 16, 2932-2939.

Horikawa, I., Oshimura, M., and Barrett, J. C. (1998). Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Mol Carcinog* 22, 65-72.

Horn, D., Spence, C., and Ingram, A. K. (2000). Telomere maintenance and length regulation in *Trypanosoma brucei*. *Embo J* 19, 2332-2339.

Horvath, M. P., Schweiker, V. L., Bevilacqua, J. M., Ruggles, J. A., and Schultz, S. C. (1998). Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* 95, 963-974.

Hsu, H. L., Gilley, D., Blackburn, E. H., and Chen, D. J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12454-12458.

Hudson, L. (1985). Experimental studies on *Trypanosoma cruzi*. *Ann Soc Belg Med Trop* 65, 71-77.

Huffman, K. E., Levene, S. D., Tesmer, V. M., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2000). Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem* 275, 19719-19722.

Hughes, T. R., Evans, S. K., Weilbaecher, R. G., and Lundblad, V. (2000). The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* 10, 809-812.

Javerzat, J. P., Bhattacharjee, V., and Barreau, C. (1993). Isolation of telomeric DNA from the filamentous fungus *Podospora anserina* and construction of a self-replicating linear plasmid showing high transformation frequency. *Nucleic Acids Res* 21, 497-504.

Jiang, X. R., Jimenez, G., Chang, E., Frolkis, M., Kusler, B., Sage, M., Beeche, M., Bodnar, A. G., Wahl, G. M., Tlsty, T. D., and Chiu, C. P. (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21, 111-114.

Joffe, B. I., Solovei, I. V., and Macgregor, H. C. (1998). Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes). *Chromosoma* 107, 173-183.

Kerner, N., Liegeard, P., Levin, M. J., and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991). *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp Parasitol* 73, 451-459.

Kickhoefer, V. A., Stephen, A. G., Harrington, L., Robinson, M. O., and Rome, L. H. (1999). Vaults and Telomerase Share a Common Subunit, TEP1. *J Biol Chem* 274, 32712-32717.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [see comments]. *Science* 266, 2011-2015.

Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.

Kipling, D., and Cooke, H. J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.

Kirk, K. E., Harmon, B. P., Reichardt, I. K., Sedat, J. W., and Blackburn, E. H. (1997). Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 275, 1478-1481.

Klobutcher, L. A., Swanton, M. T., Donini, P., and Prescott, D. M. (1981). All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3015-3019.

Koberle, F. (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6, 63-116.

Kondo, S., Tanaka, Y., Kondo, Y., Hitomi, M., Barnett, G. H., Ishizaka, Y., Liu, J., Haqqi, T., Nishiyama, A., Villeponteau, B., *et al.* (1998). Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *Faseb J* 12, 801-811.

Konig, P., and Rhodes, D. (1997). Recognition of telomeric DNA. *Trends Biochem Sci* 22, 43-47.

Koziol, C., Borojevic, R., Steffen, R., and Muller, W. E. (1998). Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent

somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech Ageing Dev* 100, 107-120.

Kyo, S., Takakura, M., Kohama, T., and Inoue, M. (1997). Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 57, 610-614.

Lamond, A. I., and Sproat, B. S. (1994). Isolation and characterization of ribonucleoprotein complexes. In *RNA processing*, S. J. Higgins, and B. D. Hames, eds. (Oxford, IRL Press).

Levis, C., Giraud, T., Dutertre, M., Fortini, D., and Brygoo, Y. (1997). Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. *FEMS Microbiol Lett* 157, 267-272.

Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Van Regenmortel, M. H., and Levin, M. J. (1991). Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol* 85, 413-417.

Lin, Y., Miyamoto, H., Fujinami, K., Uemura, H., Hosaka, M., Iwasaki, Y., and Kubota, Y. (1996). Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2, 929-932.

Lingner, J., and Cech, T. R. (1996). Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10712-10717.

Lingner, J., and Cech, T. R. (1998). Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 8, 226-232.

Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R., and Lundblad, V. (1997a). Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11190-11195.

Lingner, J., Hendrick, L. L., and Cech, T. R. (1994). Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev* 8, 1984-1998.

Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T. R. (1997b). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase [see comments]. *Science* 276, 561-567.

Liu, J. P. (1999). Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *Faseb J* 13, 2091-2104.

Liu, K., Hodes, R. J., and Weng, N. (2001). Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J Immunol* 166, 4826-4830.

Liu, Y., Snow, B. E., Hande, M. P., Baerlocher, G., Kickhoefer, V. A., Yeung, D., Wakeham, A., Itie, A., Siderovski, D. P., Lansdorp, P. M., *et al.* (2000). Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance In vivo [In Process Citation]. *Mol Cell Biol* 20, 8178-8184.

Luderus, M. E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F., and de Lange, T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* 135, 867-881.

Lue, N. F., and Peng, Y. (1997). Identification and characterization of a telomerase activity from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 25, 4331-4337.

Lue, N. F., and Peng, Y. (1998). Negative regulation of yeast telomerase activity through an interaction with an upstream region of the DNA primer. *Nucleic Acids Res* 26, 1487-1494.

Maine, I. P., Chen, S. F., and Windle, B. (1999). Effect of dGTP concentration on human and CHO telomerase. *Biochemistry* 38, 15325-15332.

Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.

Malik, H. S., Burke, W. D., and Eickbush, T. H. (2000). Putative telomerase catalytic subunits from *Giardia lamblia* and *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 251, 101-108.

Mantell, L. L., and Greider, C. W. (1994). Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *Embo J* 13, 3211-3217.

Marcand, S., Gilson, E., and Shore, D. (1997). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275, 986-990.

Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L., and Ullu, E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J Cell Sci* 113, 899-906.

Martin-Rivera, L., Herrera, H., Albar, J. P., and Blasco, M. A. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10471-10476.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes of *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.

McCormick-Graham, M., Haynes, W. J., and Romero, D. P. (1997). Variable telomeric repeat synthesis in *Paramecium tetraurelia* is consistent with misincorporation by telomerase. *Embo J* 16, 3233-3242.

McCormick-Graham, M., and Romero, D. P. (1995). Ciliate telomerase RNA structural features. *Nucleic Acids Res* 23, 1091-1097.

McCormick-Graham, M., and Romero, D. P. (1996). A single telomerase RNA is sufficient for the synthesis of variable telomeric DNA repeats in ciliates of the genus *Paramecium*. *Mol Cell Biol* 16, 1871-1879.

McEachern, M. J., and Blackburn, E. H. (1995). Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature* 376, 403-409.

Melek, M., Greene, E. C., and Shippen, D. E. (1996). Processing of nontelomeric 3' ends by telomerase: default template alignment and endonucleolytic cleavage. *Mol Cell Biol* 16, 3437-3445.

Melville, S. E., Leech, V., Gerrard, C. S., Tait, A., and Blackwell, J. M. (1998). The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol Biochem Parasitol* 94, 155-173.

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.

Meyne, J., Ratliff, R. L., and Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7049-7053.

Miller, C. M., and Collins, K. (2000). The Tetrahymena p80/p95 complex is required for proper telomere length maintenance and micronuclear genome stability.[In Process Citation]. *Mol Cell* 6, 827-837.

Mills, K. D., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1999). MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97, 609-620.

Minamino, T., Mitsialis, S. A., and Kourembanas, S. (2001). Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol* 21, 3336-3342.

- Mitchell, J. R., Cheng, J., and Collins, K. (1999a). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* 19, 567-576.
- Mitchell, J. R., Wood, E., and Collins, K. (1999b). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551-555.
- Morales, C. P., Holt, S. E., Ouellette, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K. S., White, M. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21, 115-118.
- Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.
- Morin, G. B. (1991). Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. *Nature* 353, 454-456.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622-6626.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net - Woods Hole* 13, 181-195.
- Muñoz, D. P. and Collins, K. (2001). Enviado a MCB. Biochemical characterization of telomerase in *T.cruzi*.
- Muñoz-Jordán, J. L., Cross, G. A. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001). T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J*.
- Murti, K. G., and Prescott, D. M. (1999). Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14436-14439.

Nakamura, T. M., Cooper, J. P., and Cech, T. R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* 282, 493-496.

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human [see comments]. *Science* 277, 955-959.

Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A., and Ishikawa, F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88, 875-884.

Neto, V. A. (1999). Etiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 337-339.

Nimmo, E. R., Pidoux, A. L., Perry, P. E., and Allshire, R. C. (1998). Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 392, 825-828.

Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F., and Lundblad, V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274, 249-252.

Oguchi, K., Liu, H., Tamura, K., and Takahashi, H. (1999). Molecular cloning and characterization of AtTERT, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 457, 465-469.

Ohmura, H., Tahara, H., Suzuki, M., Ide, T., Shimizu, M., Yoshida, M. A., Tahara, E., Shay, J. W., Barrett, J. C., and Oshimura, M. (1995). Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3. *Jpn J Cancer Res* 86, 899-904.

Olovnikov, A. M. (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201, 1496-1499.

Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41, 181-190.

Organization, W. H. (1991). Control of Chagas' disease (Geneva, WHO).

Pan, C., Xue, B. H., Ellis, T. M., Peace, D. J., and Diaz, M. O. (1997). Changes in telomerase activity and telomere length during human T lymphocyte senescence. *Exp Cell Res* 231, 346-353.

Petry, K., and Van Voorhis, W. C. (1991). Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. *Res Immunol* 142, 151-156.

Podgornaya, O. I., Bugaeva, E. A., Voronin, A. P., Gilson, E., and Mitchell, A. R. (2000). Nuclear envelope associated protein that binds telomeric DNAs. *Mol Reprod Dev* 57, 16-25.

Pogacic, V., Dragon, F., and Filipowicz, W. (2000). Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol* 20, 9028-9040.

Polotnianka, R. M., Li, J., and Lustig, A. J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* 8, 831-834.

Pommier, J. P., Lebeau, J., Ducray, C., and Sabatier, L. (1995). Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequences. *Biochimie* 77, 817-825.

Prescott, J., and Blackburn, E. H. (1997a). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev* 11, 2790-2800.

Prescott, J., and Blackburn, E. H. (1997b). Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev* 11, 528-540.

Ramakrishnan, S., Sharma, H. W., Farris, A. D., Kaufman, K. M., Harley, J. B., Collins, K., Pruijn, G. J., van Venrooij, W. J., Martin, M. L., and Narayanan, R. (1997). Characterization of human telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10075-10079.

Ramirez, R. D., Wright, W. E., Shay, J. W., and Taylor, R. S. (1997). Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* 108, 113-117.

Ramsden, D. A., and Gellert, M. (1998). Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *Embo J* 17, 609-614.

Reddel, R. R., Bryan, T. M., Colgin, L. M., Perrem, K. T., and Yeager, T. R. (2001). Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 155, 194-200.

Richards, E. J., and Ausubel, F. M. (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53, 127-136.

Riha, K., Fajkus, J., Siroky, J., and Vyskot, B. (1998). Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell* 10, 1691-1698.

Riha, K., McKnight, T. D., Fajkus, J., Vyskot, B., and Shippen, D. E. (2000). Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures. *Plant J* 23, 633-641.

Riha, K., McKnight, T. D., Griffing, L. R., and Shippen, D. E. (2001). Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science* 291, 1797-1800.

Romero, D. P., and Blackburn, E. H. (1991). A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67, 343-353.

Rudenko, G., Cross, M., and Borst, P. (1998). Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends Microbiol* 6, 113-116.

Sabaj, V., Aslund, L., Pettersson, U., and Galanti, N. (2001). Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem* 80, 617-624.

Saito, T., Schneider, A., Martel, N., Mizumoto, H., Bulgay-Moerschel, M., Kudo, R., and Nakazawa, H. (1997). Proliferation-associated regulation of telomerase activity in human endometrium and its potential implication in early cancer diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 610-614.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, Second edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sandell, L. L., Gottschling, D. E., and Zakian, V. A. (1994). Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12061-12065.

Sandell, L. L., and Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.

Santos, R. d. (1985). *Imunopatologia*. In *Cardiopatía Chagásica*, J. C. M. Chuster, ed. (Belo Horizonte, Fundação Carlos Chagas), pp. 10-22.

Sasaki, T., and Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur J Biochem* 267, 3025-3031.

Schmunis, G. A., and Szarfman, A. (1977). [Congenital Chagas' disease]. *Medicina (B Aires)* 37, 47-53.

Schnapp, G., Rodi, H. P., Rettig, W. J., Schnapp, A., and Damm, K. (1998). One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res* 26, 3311-3313.

- Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L., and Cech, T. R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177-180.
- Shay, J. W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.
- Shay, J. W., Werbin, H., and Wright, W. E. (1997). Telomerase assays in the diagnosis and prognosis of cancer. *Ciba Found Symp* 211, 148-155.
- Shay, J. W., and Wright, W. E. (1996). Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 8, 66-71.
- Sheng, H., Hou, Z., Schierer, T., Dobbs, D. L., and Henderson, E. (1995). Identification and characterization of a putative telomere end-binding protein from *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 15, 1144-1153.
- Shippen, D. (1993). Telomeres. *Curr Opin in Genetics and Dev.*
- Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H. (1989). Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. *Mol Cell Biol* 9, 2761-2764.
- Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546-552.
- Sica, R. E., Filipini, D., Panizza, M., Fumo, T., Baso, S., Lazzari, J., and Molina, H. A. (1986). Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina* 46, 662-668.
- Singer, M. S., and Gottschling, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase [see comments]. *Science* 266, 404-409.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.

- Sommerfeld, H. J., Meeker, A. K., Piatyszek, M. A., Bova, G. S., Shay, J. W., and Coffey, D. S. (1996). Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 56, 218-222.
- Sosa Estani, S., Segura, E. L., Ruiz, A. M., Velazquez, E., Porcel, B. M., and Yampotis, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59, 526-529.
- Strahl, C., and Blackburn, E. H. (1994). The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res* 22, 893-900.
- Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., and Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* 11, 83-93.
- Stuart, K., Allen, T. E., Heidmann, S., and Seiwert, S. D. (1997). RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 105-120.
- Taylor, R. S., Ramirez, R. D., Ogoshi, M., Chaffins, M., Piatyszek, M. A., and Shay, J. W. (1996). Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J Invest Dermatol* 106, 759-765.
- Teng, S. C., and Zakian, V. A. (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 8083-8093.
- Tomaska, L., Nosek, J., and Fukuhara, H. (1997). Identification of a putative mitochondrial telomere-binding protein of the yeast *Candida parapsilosis*. *J Biol Chem* 272, 3049-3056.
- Tsao, J., Zhao, Y., Lukas, J., Yang, X., Shah, A., Press, M., and Shibata, D. (1997). Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin Cancer Res* 3, 627-631.

Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. (1998). Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58, 4168-4172.

Van der Ploeg, L. H., Liu, A. Y., and Borst, P. (1984). Structure of the growing telomeres of Trypanosomes. *Cell* 36, 459-468.

van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.

Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8, 279-282.

Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., and Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 127, 151-162.

Wang, H., and Blackburn, E. H. (1997). De novo telomere addition by Tetrahymena telomerase in vitro. *Embo J* 16, 866-879.

Wang, J., Hannon, G. J., and Beach, D. H. (2000). Risky immortalization by telomerase. *Nature* 405, 755-756.

Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet* 17, 498-502.

Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., and Zakian, V. A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85, 423-433.

Wellinger, R. J., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1993). Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51-60.

Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K., and Lingner, J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *Embo J* 20, 3526-3534.

Westermann, S., and Weber, K. (2000). Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* 1492, 483-487.

Wicky, C., Villeneuve, A. M., Lauper, N., Codourey, L., Tobler, H., and Muller, F. (1996). Telomeric repeats (TTAGGC)_n are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8983-8988.

Wilkie, A. O., Lamb, J., Harris, P. C., Finney, R. D., and Higgs, D. R. (1990). A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* 346, 868-871.

Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. P., and Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24, 1688-1694.

Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18, 173-179.

Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11, 2801-2809.

Wu, G., Lee, W. H., and Chen, P. L. (2000). NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 275, 30618-30622.

Yi, X., Tesmer, V. M., Savre-Train, I., Shay, J. W., and Wright, W. E. (1999). Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol Cell Biol* 19, 3989-3997.

Yi, X., White, D. M., Aisner, D. L., Baur, J. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2000). An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia* 2, 433-440.

Yokoyama, Y., Takahashi, Y., Shinohara, A., Lian, Z., and Tamaya, T. (1998). Telomerase activity in the female reproductive tract and neoplasms. *Gynecol Oncol* 68, 145-149.

Yoshida, K., Sugino, T., Tahara, H., Woodman, A., Bolodeoku, J., Nargund, V., Fellows, G., Goodison, S., Tahara, E., and Tarin, D. (1997). Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 79, 362-369.

Yu, G. L., and Blackburn, E. H. (1991). Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* 67, 823-832.

Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D., and Blackburn, E. H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs [see comments]. *Nature* 344, 126-132.

Zahler, A. M., and Prescott, D. M. (1988). Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucleic Acids Res* 16, 6953-6972.

Zakian, V. A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-1607.

Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M. O. (1999). Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells [In Process Citation]. *Genes Dev* 13, 2388-2399.

Zhou, J., Hidaka, K., and Futcher, B. (2000). The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Mol Cell Biol* 20, 1947-1955.

Zhu, X., Kumar, R., Mandal, M., Sharma, N., Sharma, H. W., Dhingra, U., Sokoloski, J. A., Hsiao, R., and Narayanan, R. (1996). Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6091-6095.

Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J. H., and Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 25, 347-352.