

Tesis de Posgrado

Control de la expresión génica en Trypanosoma Cruzi : proteínas que participan en la regulación del procesamiento de pre-RNA mensajeros

Portal, Daniel

2002

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

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

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

Cita tipo APA:

Portal, Daniel. (2002). Control de la expresión génica en Trypanosoma Cruzi : proteínas que participan en la regulación del procesamiento de pre-RNA mensajeros. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3491_Portal.pdf

Cita tipo Chicago:

Portal, Daniel. "Control de la expresión génica en Trypanosoma Cruzi : proteínas que participan en la regulación del procesamiento de pre-RNA mensajeros". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3491_Portal.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

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

**CONTROL DE LA EXPRESION GENICA EN *TRYPANOSOMA CRUZI*:
PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL
PROCESAMIENTO DE pre-RNA MENSAJEROS**

Autor: Daniel Portal
Director: Dr. Héctor N. Torres

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
(INGEBI-CONICET-UBA)



2002

Agradecimientos.

A medida que uno escribe su Tesis, se hace absolutamente evidente que existe muchísima gente a la que uno debe agradecer por haber ayudado de una u otra forma a la concreción del trabajo, ya sea experimental o espiritualmente. Son todos importantes para mi y por eso les agradezco de corazón.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra Mirtha Flawiá por haberme ofrecido trabajar en el laboratorio allá por el año 1995, y al Doc por haber sido mi director. A ambos, agradezco profundamente la gigantesca paciencia que han tenido conmigo. Igualmente, quiero agradecerles la libertad con la que trabajé, siempre alentándome a hacer todos los experimentos que quise hacer. Difícilmente pueda sentirme mas cómodo en algún otro lado.

A Claudio Pereira (el gran "Peiro") por todo lo que hizo por mí, por su amistad, por esa oportunitísima palmada en el hombro, por SIEMPRE tener tiempo INMEDIATAMENTE. Por escuchar siempre, sin importar la estupidez que se me hubiera ocurrido, por proponer y discutir. Pero sobre todo, por hacerme reír aún sin ganas. (Gracias por aquel día que estuviste y que no voy a olvidar, Peiro)

A Joaquín Espinosa, (Joaco), además de la paciencia que me ha tenido, porque sin su incomparable tenacidad esta tesis no hubiera siquiera comenzado. Gracias por enseñarme tanto, también.

A Guille Lobo, por soportarme en momentos de "locura pipetera", por animarse a trabajar conmigo. Gracias por tu amistad y complicidad, guillote!.

A Buiyi, por siempre tener tiempo, por ese entusiasmo que contagia, y por tanta, pero tanta "espontaneidad". (Gracias por haber estado conmigo aquel día, no me lo olvido)

A Sole, por esas charlas interesantísimas.

A Cata por enseñarme a no dejarse intimidar ni aún en los momentos más difíciles, haciéndome entender que lo esencial pasa por uno.

A Cris Paveta, por haberme querido, mimado y entendido siempre. Es, sin dudas, una gran bichera, con la que puedo compartir y sentirme entendido en mis locuras. Te quiero muchísimo, Cris.

A Albertito Diaz Añel, por las millones de preguntas (muchas repetidas!) que respondió con la misma tranquilidad. Y por su bondad y amistad, claro.

A los mas "jóvenes miembros del 209": León (esta loquísimo) y Santi.

De la gente de los otros labs, no puedo dejar de agradecer a:

A Dani Calvo, Belén, y Eleo, por siempre tener buena onda y predisposición a ayudarme.

Carlita, por su sensibilidad, a flor de piel.

A Pao, por su delicadeza y disponibilidad.

A Julián, por su amistad, y quiero agradecerle la compañía de aquellos sábados y domingos eternos en la mesada, llamados y mangazos... Gracias por invitarme a Carlos Paz para la SAIB 2001, inolvidable... (y tantos asaditos!)

A Pablo y Gucci, por la buenisima onda de siempre.

A Tom y Dieguito. Desde nuestras épocas de estudiantes, desde "Chachalamaca" hasta la fecha, la mejor onda. Están allá arriba....

A Dani Noain, petisa increíble, maestra total.

Al resto de los becarios transgénicos también, gracias.

A Isabel, por la honestidad y la buena onda.

A Serge, Hemi, Martín y Pablo, por la ayuda desinteresada, por esa mano a tiempo y la discusión de resultados y protocolos.

A Jorge Muschietti, de quien admiro profundamente muchas cosas y agradezco esos comentarios "off the record" y charlas cómplices y personales. Agradezco de corazón su complicidad.

A Alberto Kornblihtt, por "apadrinarme" en alguna medida y darme siempre una ayuda invalorable, experimental y personal. Muchas gracias por el par de charlas que atesoro, en Cold Spring Harbor, en Septiembre 2001.

A Sebastián Kadener, por la cantidad de experimentos que no hubieran podido hacerse sin su enorme capacidad intelectual y su incomparable empuje. Gracias por CSH 2001 también, Sebas!.

A Paula Cramer, por tanta dedicación para enseñarme, como tan genial docente que es.

A Fernando Bravo, por tantísimas consultas aclaradas, por esa ayuda desinteresada.

A Horacio Martinetto por la disponibilidad y las charlas de fútbol.

A Adolfo Iribarren, por hablarme con el corazón, siempre y hacerme sentir las cosas.

A Leonor, Mary, Gladys y Francisco, sin quienes no hubiera podido hacer nada de todo este trabajo, además de admirar su gigantesca capacidad de trabajo, que obliga a redoblar esfuerzos cuando uno se siente "cansado". (Francis, gracias por riquísimos asados)

A la Tere, por las charlas perrunas.

A Irma, sin palabras, mis mas absolutos respetos por "soluciones express..." y mil gracias por haber pasado las actas a tiempo...

A Mary, Alicia y Marta, por tener comentarios positivos siempre.

A Rosa, por haberme solucionado el temita del puntaje.

Finalmente, gracias,

A Fer y Leo, por la incondicionalidad. Por bancarme sin importar nada y la sinceridad permanente.

A mi vieja, Anita. Que se puede decir...?. Gracias ma!! No se me ocurre cómo puede ser una madre mejor que vos. Sos el mejor ejemplo de todo lo que una madre ideal debe ser.

A Nani, a quien le tocó compartir conmigo una etapa tan difícil (por momentos) como hermosa. Sin su ayuda, nada hubiera sido posible. Siempre voy a recordar todo aquello, na. Es imborrable, nunca. Gracias también por Pedrito (demostraste que cuando hay que estar, estás y punto). También, sé que vas a cuidarlo como al pequeño Dante, estoy tranquilo... (nos vemos allá)

A JP, por ser mi hermano mayor, con todo lo que eso significa para mi. Te admiro profundamente, J. Me siento en deuda con vos, hermano.

A Pa, por bancarme, y por ser sincero conmigo, siempre. Eso vale muchísimo.

A Cris, por mostrar una enorme entereza en momentos durísimos, que requerían fuerza, valor y coraje. Enorme lección para mí.

A Athos, mi hijo, a quien dedico esta Tesis por sobre todo lo demás, y a quien voy a llevar en lo más profundo de mi alma por el resto de mis días. Gracias por todo, Lolo (no te fallé, viste?...)

Finalmente, a Caro, el amor de mi vida. Gracias por hacerme tan feliz y por jugarte a compartir conmigo tantas cosas. Sos la única persona que supo y sabe hacerme feliz, gracias, negrita!!

"They are ill discoverers that think there is no land, when they can see nothing but sea".

The advancement of learning, 1605.

Francis Bacon (1561-1626)

"Je vais vous dire un grand secret, mon cher. N'attendez pas le jugement dernier. Il a lieu tous les jours". La tombée, 1956.

Albert Camus (1913-1960)

"I don't want to achieve immortality through my work....I want to achieve it by not dying"

Woody Allen (1935-)

Resumen.

El *Trypanosoma cruzi*, es el parásito protozoario flagelado responsable de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Esta enfermedad produce miles de muertes y un costo elevado para los países de la región.

El mecanismo de control de la expresión génica en el parásito es objeto de fuertes estudios, ya que éste procesa sus pre-RNA mensajeros de manera diferente a la forma en que lo hacen sus hospedadores, mediante un mecanismo conocido como trans-splicing. Por lo tanto, entender las bases moleculares de dicho control es importante para encontrar puntos potenciales para el desarrollo de drogas terapéuticas que puedan interrumpir el ciclo vital del parásito.

Presentamos aquí el clonado y la caracterización de dos proteínas importantes para la catálisis y el control del procesamiento de los pre-RNA jamás descritas anteriormente en ningún protozoario poseedor del sistema de trans-splicing. Estas proteínas, llamadas TcSR, perteneciente a la familia de factores de splicing ricas en serina y arginina y su quinasa asociada, TcSRPK mostraron un altísimo grado de conservación a todo nivel con sus contrapartes de eucariotas superiores tanto en ensayos in vivo como in vitro. Si bien esto las descarta, en principio, como base para el desarrollo de drogas terapéuticas, ilustra sobre el grado de conservación que pueden tener dos vías aparentemente discímiles como el cis- y el trans-splicing. Además, los resultados sugieren que los mecanismos de control de la expresión génica a nivel del procesamiento del RNA están altamente conservados a pesar de la distancia evolutiva, demostrando la enorme presión de selección a la que está expuesto dicho mecanismo.

Abstract.

The *Trypanosome cruzi*, is a flagellate protozoan parasite responsible for the Chagas' disease in Latin America.

The mechanisms of control of gene expression are not well understood, since the parasite processes nearly all of its pre-mRNAs by trans-splicing which is different from cis-splicing, in their insect and mammalian hosts. Understanding the molecular basis of such mechanism is important in order to develop drugs that could interrupt the parasite's vital cycle.

Here we present for the first time in a trans-splicing performing organism, the cloning and characterization of two important proteins involved in the catalysis and control of pre-mRNA processing. These proteins, called TcSR, a member of the serine-arginine (SR) protein family of splicing factors and its associated kinase, TcSRPK, showed a highly conserved activity both in vitro and in vivo, in a variety of functional assays.

Although this discards the proteins as potential targets for therapeutic drug development, it illustrates on the striking conservation that two apparent different pathways like cis- and trans-splicing can show. Moreover, the results suggest that the mechanisms of control of gene expression at the pre-mRNA processing level are highly conserved despite the evolutionary distance that separates the organisms. This demonstrates the huge selection pressure to which pre-mRNA processing is exposed.

Índice general.

Prefacio	1
Objetivos generales de esta Tesis	3
INTRODUCCION	
Introducción	5
Ubicación taxonómica de los Trypanosomátidos	5
Importancia sanitaria de los Trypanosomátidos	6
Los Trypanosomátidos: Descubrimiento.	8
El <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Enfermedad de Chagas	14
Consideraciones generales	14
Fases de la enfermedad	16
Control de vectores	17
Aspectos generales de la biología de los Trypanosomátidos	18
El kinetoplasto: una organela característica de estos organismos	18
Los glicosomas	20
Evasión del sistema inmune	20
Los Glicosil-fosfatidilinositoles	22
Expresión génica en Trypanosomátidos	23
Organización genómica	24
Transcripción policistrónica	26
Promotores génicos	27
Polimerasas de RNA	29
Regulación transcripcional	30
Regulación post-transcripcional	32
El "capping" por trans-splicing y la poliadenilación	32
Edición de RNA	39
Regulación traduccional	40
Estabilidad de proteínas	41
Splicing	41
Factores de splicing: proteínas ricas en dipéptidos de serina-	

arginina (Proteínas SR)	44
Introducción	44
ASF/SF2	47
SC35	50
Rol de las proteínas SR en splicing constitutivo y alternativo	51
Las proteínas hnRNP A/B antagonizan la actividad de las proteínas SR en el splicing alternativo	54
Mecanismos de acción de las proteínas SR	54
Interacciones proteína-proteína mediada por los dominios RS	55
Las proteínas SR y U1 snRNP se unen cooperativamente a los sitios 5' de splicing	57
Proteínas SR y enhancers de splicing exónicos (ESE)	57
Regulación de la expresión y actividad de las proteínas SR	58
Relación proteínas SR/hnRNP variable	59
Regulación de la expresión de las proteínas SR	60
Fosforilación de las proteínas SR	61

RESULTADOS

Resultados Parte I: TcSR

Introducción	64
Clonado de <i>tcsr</i>	65
Expresión de TcSR	67
Ensayos de fosforilación in vitro	68
Caracterización genómica del gen <i>tcsr</i> y localización celular	72
Ensayos funcionales de TcSR	77
Splicing in vitro	77
Ensayos de splicing alternativo funcional en células HeLa	80
Estudio de la actividad de TcSR en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	86
Sobre-expresión de TcSR en la cepa salvaje 1913, de <i>S. pombe</i>	87
Sobre-expresión de TcSR en las cepas 2 ⁹⁵ y B8, de <i>S. pombe</i>	92
Sobre-expresión de TcSR en la cepa mutante doble 2D4, de <i>S. pombe</i>	92

Resultados Parte II: TcSRPK y TbSRPK

Introducción	94
Clonado y análisis de la secuencia de los genes de <i>tcsrpk</i> y <i>tbsrpk</i>	95

Análisis de la expresión de TcSRPK en <i>Trypanosoma cruzi</i>	102
Estudio de la especificidad de sustrato de TcSRPK	105
TcSRPK restaura el fosfoepítotope reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb104, en ASF/SF2	108
Estudio de la actividad de TcSRPK y TbSRPK in vivo en la levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	109
Sobre-expresión de TcSRPK y TbSRPK en la cepa salvaje 1913, de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	109
Complementación de la cepa mutante 2D4 con TcSRPK y TbSRPK	115
TcSRPK y TbSRPK modulan la actividad de splicing alternativo funcional en células HeLa	116
Actividad de TcSRPK en ensayos de splicing constitutivo in vitro con extractos de células HeLa	120
Las proteínas SR tienen diferente estado de fosforilación en distintos estadios del ciclo de vida del parásito	122
DISCUSION	124
MATERIALES Y METODOS	135
Medios y Soluciones	135
Medios de cultivo	135
Soluciones	136
Técnicas electroforéticas	137
Geles de agarosa	137
Geles de agarosa con formaldehído	137
Geles de poliacrilamida desnaturizantes para secuenciación de DNA	138
Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE)	138
Parásitos: cultivo y preparación de extractos	138
Cultivo de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	138
Preparación de extractos protéicos de epimastigotes	138
Preparación de DNA genómico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	139
Preparación de RNA total de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	139
Preparación de fracciones nucleares y citoplasmáticas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	140

Manipulación de ácidos nucleicos	140
Purificación fenólica y precipitación alcohólica de ácidos nucleicos	140
Cuantificación de DNA, RNA y oligonucleótidos	141
Digestión de DNA con enzimas de restricción	141
Secuenciación de DNA	141
Preparación del vector con extremos adhesivos	142
Ligación de extremos adhesivos	142
Preparación de bacterias competentes, expresión heteróloga de genes y amplificación y purificación de plásmidos	142
Transformación de bacterias competentes	143
Identificación de los plásmidos recombinantes	143
Preparación de DNA plasmídico	144
Minipreparación rápida (método TELT)	144
Minipreparación de alta pureza para secuenciación (PEG)	145
Secuenciación de DNA	146
Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> con el sistema pRSET/His6x	146
Concepto	146
Protocolo	147
Anticuerpos: obtención y usos	150
Obtención de anticuerpos	150
Western blot	151
Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos	152
Southern blot	152
Northern blot	154
Clonado de genes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	155
<i>tcsr</i>	155
<i>tcsrpk</i> y <i>tbsrpk</i>	157
Ensayos in vivo con levaduras de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	158
Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> utilizadas	158
Expresión de proteínas recombinantes en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	158
Transformación de levaduras con pREP1	159

Inducción de proteínas en las levaduras transformadas	160
Expresión transitoria en células HeLa	161
Transfección y medición de la capacidad de modular la reacción de splicing	161
Ensayos de splicing in vitro	162
Protocolo	163
Ensayos de fosforilación in vitro (Ensayo Quinasa EK o EQ)	163
Fijación de parásitos e inmunofluorescencia (IFI)	164
Tinción con DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride)	165
Precipitación de proteínas SR de extractos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	165
BIBLIOGRAFIA	166

Abreviaturas.

ASF/SF2	associated splicing factor/splicing factor 2
BSA	albúmina sérica bovina
CTD	dominio carboxi-terminal
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride
dNTP	deoxinucleótidos tri fosfato
DO	densidad óptica
EDTA	ácido
EMM2	edinburg minimal medium 2
ESE	exonic splicing enhancer
EST	expressed sequence tag
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GPI	glicosil-fosfatidilinositol
H1	histona H1
hnRNA	RNA hetero nucleares (" <i>heteronuclear RNA</i> ")
hnRNP	ribonucleoproteínas heteronucleares (" <i>heteronuclear ribonucleoprotein</i> ")
IFI	nmunofluorescencia
IPTG	iso-propil-tio-galactósido
LIT	liver infusion triptose
mAb	anticuerpo monoclonal
MBP	proteína básica de mielina
ME	miniexón
NE	extracto nuclear
PBS	buffer fosfato salino
PMSF	phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride
prp	pre-RNA processing
PZFP	Poly Zinc Finger Protein
RBD	dominio de unión a RNA (" <i>RNA Binding Domain</i> ")
RRM	dominio de unión a RNA (" <i>RNA recognition motif</i> ")
SAS	sitio aceptor del splicing
SC35	spliceosomal component 35
SDS	sodio dodecyl sulfato
SL	" <i>splice leader</i> "

snRNA	RNAs pequeños nucleares (" <i>small nuclear RNA</i> ")
snRNP	ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (" <i>small nuclear ribonucleoproteins</i> ")
SR	serina/arginina
SRPK	quinasa de proteínas ricas en serina/arginina (" <i>serine/arginine protein kinase</i> ")
TAE	tris acético EDTA
TBE	tris bórico EDTA
TCA	tricloro acético
TE	tris EDTA
UTR	región no traducida (" <i>untranslated region</i> ")
VSG	glicoproteínas variables de superficie
YES	yeast extract + supplements

Prefacio.

Este trabajo de Tesis, estará estructurado de manera de ofrecer en primer lugar una introducción básica general a la Familia Trypanosomatidae, a la cual pertenece nuestro organismo modelo de estudio, el *Trypanosoma cruzi*; destacando distintos aspectos básicos y característicos de su biología. Cabe aclarar que dicha introducción describirá aspectos generales que en algunas ocasiones no se ajustarán estrictamente al *Trypanosoma cruzi* en particular, pero que hacen al entendimiento general de la biología de la Familia. Sabemos que a veces estas diferencias serán grandes pero consideramos inoportuno no mencionarlas ya que hacen a las características de los Trypanosomátidos. Pretendemos, de esta forma, ilustrar sobre aspectos de interés para comprender el funcionamiento de estos organismos parasitarios. En segundo lugar, abordaremos el estudio de algunos aspectos particulares de la biología del *Trypanosoma cruzi*, y por último, presentaremos brevemente algunos conceptos relacionados con mecanismos moleculares de interés para el entendimiento de los resultados presentados. Desde ya, uno de los puntos mas interesantes de nuestra área de trabajo es su gran dinámica, por lo que aconsejamos al lector tomar los datos aquí presentados como una pequeña foto tomada en un preciso instante del desarrollo de los acontecimientos y que considere que todos los temas de estudio en esta Tesis son ampliados diariamente en gran cantidad de laboratorios en todo el mundo.

Luego, presentaremos la sección de Resultados. Estos están separados en dos partes (I y II). Esta separación es arbitraria, fue realizada al solo efecto de aumentar la simplicidad y facilitar la presentación de los resultados. No debe perderse de vista, como nos resultó evidente, el hecho de que ambas partes están intensamente conectadas. Esperamos que esto también resulte evidente al lector. Luego, se discutirán los resultados obtenidos, analizando implicaciones de todo tipo. Otra vez, es

posible que estas discusiones no satisfagan plenamente al lector y que éste considere que otras explicaciones se ajustan mejor a los resultados observados. No pretendemos la exclusividad de la verdad, por lo que diferentes interpretaciones y observaciones hechas sobre nuestros resultados serán bienvenidas. Finalmente, se presentarán los Materiales y Métodos utilizados para la obtención de los resultados. Por último, esperamos que estos resultados, obtenidos con el esfuerzo de 5 años, sirvan como base a futuras generaciones de tesis en la búsqueda de un mejor entendimiento de la enfermedad de Chagas, particularmente de la biología del *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos generales de esta Tesis.

El presente trabajo de Tesis, intentará presentar la identificación y caracterización por primera vez en Trypanosomátidos, de una red de proteínas conocida como "SR-network", con funciones en la modulación en reacciones de splicing.

El trabajo fue dividido en dos partes, I y II. Esta división es arbitraria y ha sido pensada en función de la claridad del trabajo.

Objetivos generales de la Parte I:

Caracterizar a TcSR como miembro de la familia de proteínas SR, en *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares de la Parte I:

1. Clonar el gen que codifica para TcSR, una proteína SR de *Trypanosoma cruzi*.
2. Expresar TcSR en sistemas heterólogos, y desarrollar anticuerpos para estudiar la expresión y la localización subcelular de TcSR.
3. Analizar a TcSR como sustrato de diferentes quinasas de proteínas
4. Analizar la actividad de TcSR, caracterizando dominios funcionales importantes en reacciones de splicing
 - 4.1. En reacciones de splicing in vitro
 - 4.2. En sistemas in vivo
 - 4.2.1. En levaduras de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.
 - 4.2.2. En ensayos de splicing alternativo funcional en células HeLa.

Objetivos generales de la parte II:

Caracterizar a TcSRPK y TbSRPK, como un miembros de la familia de quinasas de proteínas SR (SRPK) en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

Objetivos particulares de la Parte II:

1. Clonar el gen que codifica para TcSRPK y TbSRPK, en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, respectivamente.
2. Expresar ambos genes en sistemas heterólogos, y analizar la actividad de las proteínas in vitro.
3. Estudiar la actividad de las proteínas in vivo
 - 3.1. En *Schizosaccharomyces pombe*.
 - 3.2. En ensayos de splicing alternativo funcional en células HeLa.
 - 3.3. En ensayos de splicing in vitro, con distintos extractos de células HeLa.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1 Ubicación taxonómica de los Trypanosomátidos.

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario perteneciente al subtipo *Sarcomastigophora*, clase *Zoomastigophora*, orden *Kinetoplastida*. Los kinetoplastidos (orden *Kinetoplastida*) son organismos flagelados que se caracterizan por poseer una única mitocondria, llamada kinetoplasto (ver mas adelante), situada cerca de la base del flagelo, que contiene gran cantidad de DNA. La mayoría de los kinetoplastidos flagelados son parásitos de vertebrados, invertebrados o plantas. En la Figura 1 se detalla la ubicación taxonómica del *Trypanosoma cruzi* y la de los Trypanosomátidos *Leishmania major*, *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei* (Hoare, 1972)

Tipo:	Protozoa
Subtipo:	Sarcomastigophora
Clase:	Zoomastigophora
Subclase:	Mastigophora
Orden:	Kinetoplastida
Suborden:	Trypanosomatina
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<ul style="list-style-type: none"> • Leishmania <ul style="list-style-type: none"> Leishmania (subgénero) Leishmania major • Crithidia <ul style="list-style-type: none"> Crithidia fasciculata • Trypanosoma <ul style="list-style-type: none"> Schizotrypanum (subgénero) Trypanosoma cruzi Trypanosoon (subgénero) Trypanosoma brucei

Figura 1. Clasificación taxonómica de los Trypanosomátidos más estudiados.

El *Trypanosoma cruzi* pertenece al género *Trypanosoma*, donde están comprendidos parásitos digenéticos que tienen en uno de sus estadios de desarrollo la forma trypomastigote. Este género se divide en dos secciones: *Salivaria* y *Stercoraria* (Hoare, 1972). En la primera están comprendidos trypanosomas patógenos que se multiplican en el estadio trypomastigote en el mamífero, completan su desarrollo en las glándulas salivales del vector y son transmitidos por inoculación, por ejemplo *T. brucei* (transmisión anterior). En la segunda se agrupan especies no patógenas con excepción de *Trypanosoma cruzi* que se multiplican en el mamífero en forma de amastigote, completan su desarrollo en la parte posterior del intestino del vector, y son transmitidos a los huéspedes mamíferos a través de las heces del insecto (transmisión posterior). En cuanto al subgénero *Schizotrypanum*, comprende a los Trypanosomas que se multiplican en los vertebrados a través de etapas intracelulares.

1.2 Importancia sanitaria de los Trypanosomátidos.

Lamentablemente, no hace falta destacar la importancia sanitaria de los trypanosomas. Con solo ver la gran variedad de enfermedades producidas por estos organismos y la gran cantidad de infectados y potenciales infectados, sin mencionar los millonarios costos para los países ya de por sí muy pobres, resulta evidente la importancia de estudiar estos parásitos. La Tabla I (Molineux, 1997), muestra algunos ejemplos de estas enfermedades. Estos organismos parásitos son responsables de gran cantidad de muertes anualmente, y de afectar sensiblemente la calidad de vida de millones de seres humanos y otros animales en todo el mundo. Entre las enfermedades más importantes, se encuentran las trypanosomiasis africanas, como la enfermedad del sueño, producidas por el *Trypanosoma brucei*, y transmitida por la mosca tse-tse, la americana,

como la enfermedad de Chagas, producida por el *Trypanosoma cruzi* y transmitida por Triatomíneos hematófagos como el *Triatoma infestans*, y las Leishmaniasis, producidas por distintas especies del género *Leishmania*, transmitidas por distintas moscas.

A partir de los datos presentados en esta tabla se concluye que existen más de 130 millones de personas infectadas por Trypanosomátidos patógenos, para quienes no existe un tratamiento accesible sin efectos colaterales importantes. La población en riesgo de contraer alguna de estas enfermedades es cercana a los 500 millones de personas, para quienes no existe la posibilidad de inmunizarse. Observando la distribución geográfica de las áreas endémicas y considerando los modos de transmisión, se desprende que estas enfermedades afectan principalmente a los habitantes de áreas rurales o que viven en condiciones precarias características de los países en vías de desarrollo de la franja tropical-subtropical.

	Trypanosomiasis humanas africanas, enfermedad del sueño.	Enfermedad de Chagas.	Leishmaniasis.
Agente etiológico	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .	<i>Trypanosoma cruzi</i> .	<i>Leishmania sp.</i>
Vector (género)	Mosca tse-tse: <i>Glossina</i> .	Triatomíneos: <i>Triatoma</i> , <i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> .	Flebótomos: <i>Phlebotomus</i> , <i>Lutzomyia</i> .
Transmisión	Picadura de <i>Glossina</i> infectada.	Contaminación con heces infectadas. Transfusión de sangre.	Picadura de flebótomo infectado.
Area endémica	Países africanos de la región sub-sahariana.	América Central y América del Sur.	Todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo excepto el Sudeste Asiático y Oceanía.
Impacto sanitario	55 millones en riesgo. 36 países. 25-50.000 nuevos casos reportados en 1996.	90 millones en riesgo. 19 países. 16 millones de infectados.	350 millones en riesgo. 88 países. 119 millones infectados.
Estrategia de control	Vigilancia, tratamiento, control del vector.	Control del vector y bancos de sangre, tratamiento inmediato.	Vigilancia y tratamiento de las formas viscerales, control del vector.
Drogas terapéuticas	Pentamidina y suramina en casos tempranos. Todos los tratamientos requieren internación. Efectos colaterales para todas las drogas, excepto eflomitina..	Nifurtimox para los casos agudos, disponibilidad limitada y toxicidad alta. Benznidazol.	Antimoniales. Pentostam y Glucantim, muy tóxicas. Paromomicina (aminosidina) para los casos cutáneos. AmBisona (nueva).

Tabla I. Enfermedades producidas por Trypanosomátidos.

1.3 Los Trypanosomátidos: Descubrimiento.

Esta sección pretende mostrar que los descubrimientos importantes en Ciencia están basados en el trabajo de muchos investigadores que aportan pequeñas pero decisivas observaciones a través de los años. Asimismo, muchas veces perdemos la perspectiva de nuestro trabajo y olvidamos que éste es solo un nexo entre nosotros y futuras generaciones de investigadores que lo tomarán como base para sus investigaciones. Debemos recordar la historia del desarrollo de los acontecimientos para entender los móviles de generaciones pasadas y comprender en qué contexto estamos aportando nuestro esfuerzo.

Esta breve reseña histórica está basada en el trabajo de Hoare, 1972 "The trypanosomes of mammals", en el que se ha compilado el trabajo de varios autores como Laveran y Mesnil (1912), Wenyon (1926), Cole (1926) entre otros así como en el trabajo de Cox, 1996 "An illustrated history of natural diseases".

Fue al Padre de la Protozoología, Antony van Leeuwenhoek a quien se atribuye haber descrito por primera vez estadios del desarrollo de un verdadero trypanosoma, el *Trypanosoma theileri*, parásito de bovinos, hace ya mas de 300 años, en 1680 en el intestino de la mosca del caballo. Pero la primera descripción bien documentada de un trypanosoma fue realizada por el médico alemán G. Valentin, en 1841, que era profesor de Fisiología en la Universidad de Berna, y que pasaba muchas horas en el microscopio. En 1841, describió el descubrimiento en la sangre de una trucha, de organismos mótils elongados que podrían relacionarse a las amebas. Aunque en primer lugar se los describió como trypanosmas, luego se vió que era mas preciso clasificarlos como trypanoplasmas. No fue sino hasta 1843, cuando Gruby, un médico

húngaro recibido en Viena y radicado en París, describió la verdadera naturaleza de unos parásitos de batracios, describiéndolos como trypanosomas, por primera vez.

En los siguientes 35 años se registran pocos avances en los conocimientos sobre los trypanosomas, excepto por la ampliación del espectro de especies parasitadas por estos organismos. El primer gran impacto que estos parásitos produjeron en la comunidad científica se produjo cuando Griffith Evans, un veterinario británico trabajando en la India describió en 1880 los trypanosomas que infectaban a caballos y camellos, de gran importancia económica. Estos trabajos fueron los primeros en relacionar a los trypanosomas con enfermedades patógenas de gran importancia socio-económica. En ese sentido, la contribución mas importante fue realizada por David Bruce (el mismo que legara su nombre al género de bacterias patógenas *Brucella*), cuando servía a la Real Armada Británica como Cirujano Mayor (luego nombrado Sir) durante los años 1894 y 1897 en Ubombo, Zululandia. Bruce había sido enviado a investigar la enfermedad del ganado, conocida como Nagana. Inmediatamente, Bruce decidió analizar la sangre y otros preparados de sangre donde encontró formas flageladas que asoció en primera instancia a pequeñas filarias, pero luego corrigió esa postura y los clasificó como trypanosomas. Luego de inocular sangre infectada de bovinos a caballos y perros, Bruce descubrió que la enfermedad era producida por el trypanosoma (denominado luego *Trypanosoma brucei*). La conexión entre la enfermedad y la mosca *tse-tse*, fueron descubiertos por Bruce luego de leer los relatos de viajeros como Livingstone o Stanley, así como de los nativos, que sabían que la exposición del ganado a la mosca *Glossina* les producía una enfermedad mortal, presumiblemente mediante la inyección de un veneno. Luego de enviar animales sanos al sitio conocido como el "cinturón de la mosca", Bruce observó que en su sangre aparecían los mismos pequeños flagelados observados en los animales con Nagara. El experimento inverso, es decir permitir que moscas capturadas salvajes se alimentaran

de animales sanos producía el mismo resultado. Los estudios de Bruce, precedieron el anuncio de Patrick Manson, en 1898 que declaraba a la hembra del mosquito del género *Anopheles* como vector de la malaria.

Estos descubrimientos no eran triviales, ya que como se recordará, en aquel entonces, la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas desarrollada por Louis Pasteur y Robert Koch estaba en auge. En particular, el segundo de sus postulados sostenía que "...el organismo debe poder ser aislado y crecido en un cultivo puro" y luego este organismo "debe poder ser inoculado en un hospedador susceptible". Tales conceptos contradecían uno de los aspectos básicos de la biología de los Trypanosomátidos: estos organismos deben cumplir parte de su ciclo de vida en un vector artrópodo, y este vector no cumple funciones de inoculador simple del patógeno, sino que el parásito debe "capacitarse" en él.

Una historia inversa acompaña el descubrimiento del científico brasileño Carlos Chagas, en 1909. En 1907-08 Chagas, que trabajaba en Manguinhos bajo las órdenes del Director Dr. Oswaldo Cruz, formó parte de una expedición a Lassance, en el estado de Minas Gerais para instaurar una campaña contra la enfermedad de la malaria que permitiera la construcción del Ferrocarril en esa región. En tal oportunidad, Chagas encontró Trypanosomátidos flagelados en el tracto digestivo del insecto hematófago *Panstrongylus megistus*. Sabiendo que éstos se alimentaban de sangre de vertebrados, y habiendo visto estas formas flageladas en la sangre de un mono (*Callithrix penicillata*), decidió estudiar la posibilidad de que fuera este insecto hematófago el responsable de la transmisión de la enfermedad a los monos. Envío insectos infectados al laboratorio de Manguinhos, en Rio de Janeiro en donde probaron que éstos infectaban exitosamente roedores de laboratorio. Retornó así hacia las poblaciones nativas en busca de la enfermedad (Chagas, 1909). Chagas sabía que los ranchos en los que habitaban los nativos estaban infestados de estos insectos hematófagos, y que algunos de los chicos

que allí vivían sufrían de una extraña enfermedad manifestada con anemia, fiebre, edema, "chagoma" y problemas cardíacos. No tardó en demostrar que el nuevo trypanosoma que bautizara *Trypanosoma cruzi*, en homenaje al investigador brasilero Oswaldo Cruz, era el responsable de provocar la enfermedad en un niño indígena y un gato (Chagas, 1912).



Figura 2. Carlos Chagas (1879-1934). Descubrió y elucidó el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Foto tomada en la casa de Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, y extraída del libro "Illustrated History of Tropical Diseases". 1996, Cox, F.E.G., ed. Wellcome Trust.

Los posteriores descubrimientos sobre el modo de transmisión de las Leishmaniasis, nos permite mostrar modelos de ciclo de vida para los Trypanosomátidos como los que se muestran en la Figura 3. Los nombres de cada estadio y ciertas características, tal como la condición extra o intracelular de las distintas formas, varían según la especie. Nótese la típica alternancia entre las formas infectivas no replicativas y las formas replicativas no infectivas.

Tripanosomas africanos

Tripanosomas americanos

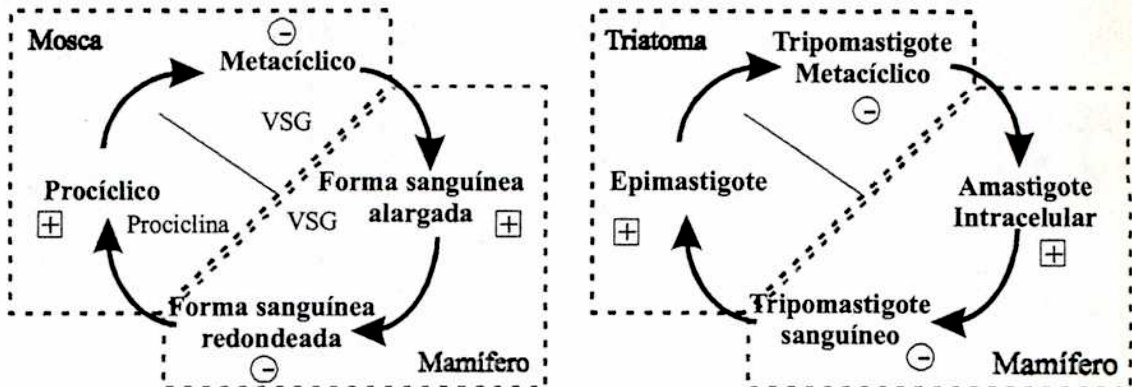


Figura 3. Esquemas modelos de los ciclos de vida de Trypanosomátidos africanos y Trypanosomátidos americanos. (-), forma infectiva no replicativa; (+), forma replicativa no infectiva; VSG, Variant Surface Glycoprotein.

2. El Trypanosoma cruzi.

En esta sección introduciremos algunos conceptos básicos sobre esta especie, sobre la cual hemos trabajado para la realización de esta tesis, principalmente sobre el ciclo de vida de este parásito y la enfermedad que produce, conocida como la enfermedad de Chagas. Luego, desarrollaremos algunos aspectos de la biología de los Trypanosomátidos en general, muchos de ellos no necesariamente descubiertos en *Trypanosoma cruzi* y en algunos casos ni siquiera descritos en *Trypanosoma cruzi*, pero que aportan al entendimiento básico de la familia.

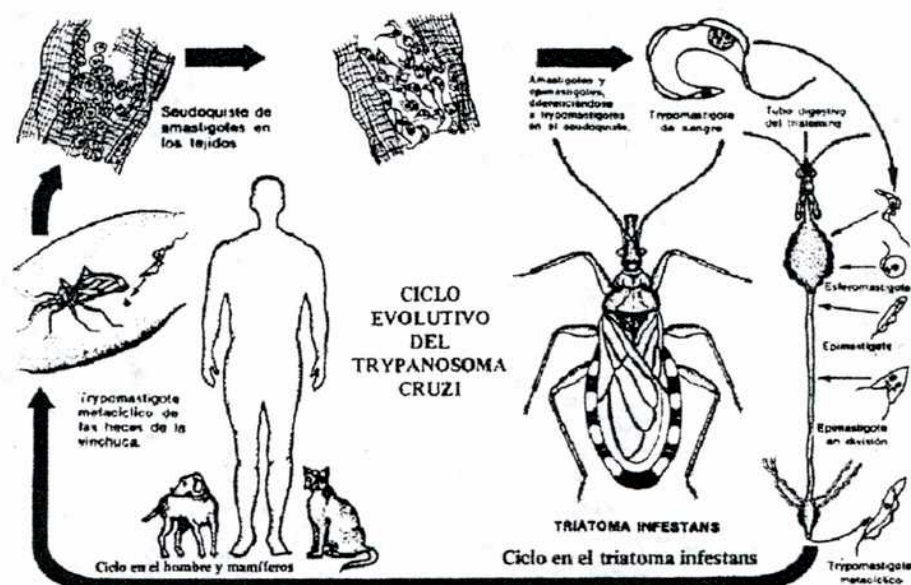
2.1 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Esquema tomado del libro "Enfermedad de Chagas" (Storino, 1994).

El *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, con tres formas de desarrollo principales: la forma amastigote no flagelada y las formas epimastigote y trypomastigote flageladas (figura 4).

El ciclo de vida del parásito involucra su desarrollo dentro de dos organismos: un hospedador mamífero y un insecto vector intermediario. El insecto vector, en este caso, es un triatomino hematófago, conocido vulgarmente en Argentina con el nombre "Vinchuca" (del quechua "Binchucca"), y cuyo nombre científico es *Triatoma infestans*. En el insecto vector se encuentran la forma epimastigote, replicativa y no infectiva, y el trypomastigote metacíclico que es la forma infectiva pero no replicativa. El amastigote, que tiene capacidad replicativa, y el trypomastigote sanguíneo, que no la tiene, son formas del hospedador mamífero, siendo el amastigote la forma intracelular. Los epimastigotes proliferan en el insecto vector y se diferencian en el intestino posterior del insecto, a la forma trypomastigote metacíclico. Cuando una vinchuca infectada pica a un

mamífero, ingiere la sangre y defeca, simultáneamente debido a que necesita todo el espacio posible para la sangre. Las heces que contienen los parásitos que se han diferenciado a la forma infectiva (trypomastigotes metacíclicos, en el intestino de la Vinchuca) son depositadas cerca del sitio de la picadura. Luego, el mamífero se rasca (existe evidencia de que no es necesario el rascado) permitiendo la penetración de los trypomastigotes metacíclicos al torrente sanguíneo del nuevo huésped. Los trypomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos y se diferencian rápidamente a la forma amastigote. Luego de varios ciclos de división determinados genéticamente, los amastigotes se diferencian a trypomastigotes sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo por ruptura de la célula huésped. Estos pueden infectar nuevas células o ser ingeridos por el insecto vector cuando éste se alimenta de la sangre del mamífero infectado. Dentro del insecto, los trypomastigotes sanguíneos provenientes del mamífero se diferencian a epimastigotes al llegar al intestino medio del insecto vector, completándose así el ciclo (figura 4).

2.2 Enfermedad de Chagas.

2.2.1 Consideraciones generales.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis, cuyo agente etiológico es el protozoario *Trypanosoma cruzi*. Este organismo parasita el tubo digestivo de más de 80 especies de triatomíneos y en nuestro país es transmitido principalmente por el *Triatoma infestans*. Otras posibles vías de transmisión de la enfermedad puede ser la congénita, que se produce por vía transplacentaria, o a través de transfusiones sanguíneas o trasplantes, las cuales constituyen las principales vías de infección en zonas no endémicas.

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

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

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

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

2.2.2 Fases de la enfermedad.

La enfermedad se manifiesta con un cuadro agudo, inmediatamente después de la infección inicial que luego evoluciona a un cuadro crónico, que puede tardar en manifestarse pero que es el de mayor importancia. El cuadro agudo pasa inadvertido en una gran mayoría de casos. Por lo general evoluciona favorablemente, aunque esto depende, entre otras cosas del estado de salud previo del individuo afectado. La inflamación pronunciada, localizada en la herida de entrada al parásito se llama chagoma. Si el sitio de inoculación de los parásitos fue alrededor del ojo, se forma una congestión local, conocida como "Signo de Romaña". Los síntomas generales de la etapa aguda son fiebre, hipertrofia del hígado y bazo, edema generalizado y adenomegalia. En el 30% de los casos se presentan anomalías electrocardiográficas o radiológicas debidas a miocarditis aguda de diferentes grados. La mortalidad por miocarditis aguda ocurre en el 2-3% de los casos. Una complicación grave en esta etapa es la meningoencefalitis, la cual aparece en niños menores de dos años, siendo la mortalidad del 50%. Durante esta etapa, los parásitos invaden varios tejidos y sistemas de órganos. La etapa aguda puede resultar fatal en niños, pero comúnmente el paciente sobrevive y entra en un período indeterminado hasta la aparición de la etapa crónica (Storino, 1994).

Luego, el paciente evoluciona hacia la fase crónica. Entre estas dos fases, existe una etapa indeterminada, que se caracteriza por la ausencia de síntomas y el enfermo parece carecer de todos síntomas de la enfermedad y sus electrocardiogramas y radiografías torácicas son normales. No obstante, las pruebas serológicas son positivas. Durante esta etapa, la mayoría de los pacientes no reconocen que están infectados con *T. cruzi*, constituyendo un importante reservorio y contribuyendo a mantener el ciclo vital del parásito (Storino, 1994).

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

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

2.2.3 Control de vectores.

Resulta claro en cualquier curso básico de Parasitología que la variable más significativa para interrumpir la transmisión de una enfermedad como la de Chagas, es la disminución del número de vectores. Por lo tanto, para poder controlar la enfermedad de Chagas se están implementando estrategias que apuntan a interrumpir el ciclo doméstico de la transmisión de *T. cruzi* atacando al vector. Erradicar el parásito parece una tarea demasiado compleja, ya que este posee un gran número de hospedadores, y por lo tanto de reservorios. La estrategia es entonces evitar que el parásito entre en contacto con los humanos, y para eso, se están utilizando técnicas que incluyen latas fumigadoras y pinturas que tienen una serie de compuestos insecticidas de liberación lenta. También se rocían las áreas peridomiciliarias con piretroides (OMS, 1991). Estos métodos, combinados con la educación preventiva y la vigilancia domiciliaria, han llevado a disminuir notablemente la prevalencia de la infección.

3 Aspectos generales de la biología de los Trypanosomátidos.

3.1 El kinetoplasto; una organela característica de estos organismos.



Figura 5. Micrografía electrónica de una parte de un network de DNA de un kinetoplasto de *C. Fasciculata*. Los pequeños círculos representan moléculas de aproximadamente 2.5 kb. Foto tomada del libro "Molecular Biology of Parasitic Protozoa". (1996, Smith D.F. y Parsons M., eds.).

La función del kinetoplasto fue desde el comienzo un misterio, sobre todo gracias al hecho de que en algunos casos la pérdida del mismo no producía una reducción en la viabilidad de los parásitos. En 1910, Werbitzki demostró que podía inducir tal "akinetoplastía" de manera irreversible en *T. brucei* con drogas como pironinas o acridinas (Werbitzki, 1910). En 1940, se observó que estas formas akinetoplásticas no tenían inconvenientes para multiplicarse en la sangre de los mamíferos tan bien como las formas salvajes, pero no podían iniciar el desarrollo cíclico en la mosca *tse-tse* (Reichenow, 1940).

Luego de muchos años y muchas investigaciones acerca del metabolismo energético en Trypanosomátidos se demostró que el kinetoplasto posee las funciones mitocondriales. Una característica interesante desde el punto de vista de la adaptación al tipo de vida parasitaria, es la que resulta de la comparación entre el metabolismo respiratorio de la forma presente en el insecto y de la forma sanguínea de *T. brucei*. Se encontró que esta

última no posee signos de un ciclo de Krebs funcional ni transporte de electrones mediado por citocromos y que posee en cambio un sistema de oxidación de glicerofosfatos. La forma procíclica, en el insecto, posee por el contrario el sistema de respiración aeróbica convencional (Grant, 1961). Estas variaciones en el metabolismo energético correlacionan con los cambios morfológicos observados durante el desarrollo de estos organismos: mientras que las formas sanguíneas poseen un kinetoplasto no ramificado y reducido, las formas procíclicas poseen un kinetoplasto muy ramificado y de mayor tamaño. La activación del kinetoplasto permite a estas células cambiar de un metabolismo basado en la ruptura incompleta de glucosa a piruvato por glicólisis en los mamíferos, a un metabolismo basado en la oxidación de aminoácidos (prolina principalmente para *T. brucei*) en el insecto (Vickerman, 1965).

Como era de esperar para una organela relacionada a las mitocondrias, el kinetoplasto tiene un genoma que está formado por una enorme red de moléculas circulares de DNA concatenadas (figura 5). Se distinguen dos tipos de estas moléculas: algunos miles de pequeños minicírculos (aproximadamente 2.5 Kb de tamaño) y unas decenas de maxicírculos (30-40 Kb aproximadamente). Los maxicírculos son similares a otras moléculas de DNA mitocondrial y portan los genes para la biogénesis mitocondrial, tal como los genes para RNAr y para algunas subunidades de proteínas involucradas en el transporte electrónico y la síntesis de ATP. La función de los minicírculos no fue conocida sino hasta la década de los '90 cuando se descubrió que portaban los genes para los RNA guías de la edición de mRNA mitocondriales (ver mas adelante). Aunque algo sabemos acerca de la función de estas moléculas y del modo en que esta red se replica, se desconoce el origen de tal particular organización.

3.2 Los glicosomas.

Mientras que diversos estudios profundizaban nuestro conocimiento sobre el metabolismo energético de los Trypanosomátidos y se descubrían las características particulares del kinetoplasto, se observó que la mayoría de las enzimas glicolíticas de *T. brucei* (luego confirmado para todos los kinetoplastidos flagelados) se localizaban en organelas especializadas unidas a la membrana a las cuales se las denominó glicosomas (Oppenheimer, 1977). Cada célula posee varias decenas de estas pequeñas estructuras membranosas carentes de ácidos nucleicos. Estudios sobre la biogénesis de los glicosomas y sobre la importación de proteínas dentro de los mismos, permitieron concluir que esta organela proviene de un microsoma ancestral relacionado con los peroxisomas (Sommer, 1996).

En cuanto a su funcionamiento, el glicosoma es la contraparte del kinetoplasto. Cuando el parásito entra al torrente sanguíneo del mamífero hospedador, encuentra un medio muy rico en glucosa, por lo que adapta su metabolismo hacia una glicólisis altamente eficiente y reprime por completo las funciones kinetoplásticas (mitocondriales). Mediante la compartimentalización de las siete primeras enzimas glicolíticas y dos enzimas del metabolismo de glicerol, las formas sanguíneas incrementan notablemente la tasa de glicólisis y pueden sobrevivir con la energía proveniente del pasaje de glucosa a piruvato.

3.3 Evasión del sistema inmune.

Se sabe desde hace muchos años que en el ganado infectado, en el caso de *Trypanosoma brucei*, existe gran variación en el número de parásitos. (Bruce, 1895), y que este número varía de manera cíclica. Con los años se vió que esto responde a una

estrategia de los parásitos en su forma sanguínea para evadir el sistema inmunológico del huésped. La estrategia consiste en modificar de manera periódica todas las glicoproteínas variables de superficie (VSGs) del parásito que son blanco del sistema inmunológico. Cada trypanosoma sanguíneo posee un tipo de VSG y esa VSG es reemplazada de manera espontánea por otra diferente con una frecuencia cercana a 10^{-2} por generación. La respuesta inmune contra estas VSGs es suficiente para matar a la gran mayoría de los parásitos en unos pocos días. Sin embargo, el surgimiento de nuevas variantes, permite la propagación de la infección. De esta manera, el número total de parásitos en la sangre se mantiene relativamente constante en el tiempo, mas allá de los altos y bajos. De esta forma, el parásito logra evadir el ataque y sobrevivir mientras permite que el huésped continúe vivo. No debemos dejar de aclarar que debemos entender esta estrategia desde un punto de vista poblacional y no individual. La supervivencia se mide a nivel poblacional, unos pocos parásitos que logren escapar alcanza para que se propague la infección y se recupere la parasitemia.

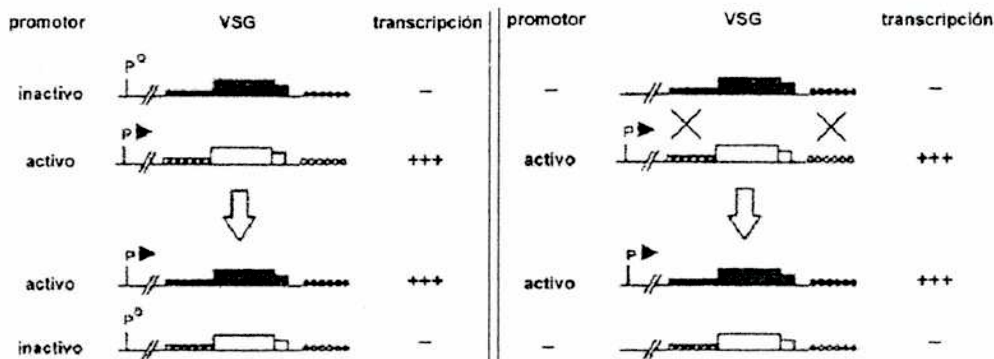


Figura 6. Mecanismos moleculares responsables de la variación antigénica de las VSGs. Panel izquierdo. Este modelo propone que la variación en la expresión se debe a la activación diferencial de distintos tipos de promotores. Por lo tanto, si en primer lugar se encuentra activo el promotor de la VSG blanca y la negra está inactiva (P^0), luego de producirse el cambio, la VSG activa es la negra y la inactiva la blanca. **Panel derecho.** Este modelo propone que el gen activo es recombinado dentro del locus activo, como el cambio de un cassette por otro. En este modelo, no hay activación/inactivación de un promotor ya que la VSG que no se expresa no tiene promotor. Figura tomada de "Molecular Biology of Parasitic Protozoa" (1996, Smith D.F. y Parsons M., eds.).

Esta variación se basa en dos mecanismos genéticos bien descritos: la activación de distintos sitios de expresión de VSGs y variación de la VSG que ocupa el sitio de expresión activa. No describiremos en detalle los mecanismos moleculares que permiten esta variación, pero el lector puede consultar la extensa bibliografía (Curotto de la Faille, 1992, Maslov, 1993, Aksoy, 1992). La figura 6 muestra estas dos hipótesis: la activación distintos sitios de expresión de VSGs (panel izquierdo) y el cambio de un gen de VSG por otro, en un sitio de transcripción activo.

3.4 Glicosil-fosfatidilinositoles.

Estas glicoproteínas variables de superficie (VSG, *Variant Surface Glycoproteins*) además de otras proteínas, están ancladas a la membrana plasmática mediante un residuo de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (McConville, 1993). Este tipo de anclaje, presente en algunos tipos celulares de eucariotas superiores pero muy abundante en los parásitos protozoarios, se ajusta perfectamente a las necesidades de estos organismos. Los anclajes GPI no poseen conexión alguna con elementos del citoesqueleto u otro elemento citoplasmático, convirtiendo a la cubierta de glicoproteínas en una región "libre" entre el citoplasma y el medio externo. Las características de este tipo de anclaje no solo permiten el empaquetamiento de aproximadamente 10 millones de moléculas de VSG por célula, sin alterar las propiedades de la membrana, sino que concederían también el medio para una rápida liberación de esta cubierta mediante la actividad de una fosfolipasa específica (Andrews, 1988). No se conoce con certeza el mecanismo de liberación de la cubierta de glicoproteínas, aunque ya han sido descritas y caracterizadas GPI-fosfolipasas C en estos organismos. Otra característica singular de los Trypanosomátidos es que poseen un alto porcentaje de glicolípidos GPI libres de proteínas como componentes

estructurales de sus membranas. Entre los más estudiados se encuentran los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) y los lipofosfoglicanos (LPGs). Ambos tipos de moléculas son muy abundantes en la superficie de las distintas formas de estos parásitos y cumplen funciones de defensa contra el sistema inmune del hospedador (Turco, 1992). Esta composición diferencial con respecto a las membranas de las células hospedadoras ha volcado a muchos investigadores a estudiar el metabolismo de los GPIs con el objetivo de desarrollar drogas terapéuticas.

3.5 Expresión génica en Trypanosomátidos.

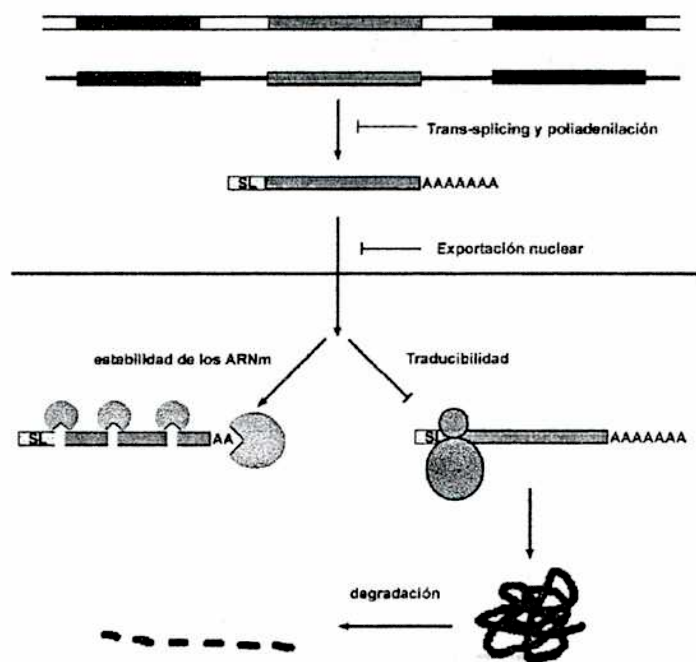


Figura 7. Esquemas de posibles puntos de control post-transcripcional de la expresión génica. Al no haber un fuerte control transcripcional de la expresión génica, la mayoría de los marcos abiertos de lectura llegan a expresarse como unidades policistrónicas. Entonces los tres genes (azul, rojo y negro) pasan de DNA (arriba, doble cadena) a pre-mRNA (simple cadena). El primer punto de control se ejerce a nivel del procesamiento del mensajero policistrónico, particularmente a nivel del trans-splicing y de la poliadenilación. Una vez procesado, el mensajero maduro puede ser retenido en el núcleo y nunca llegar a ser traducido (no se conoce este mecanismo en el parásito). Ya en el citoplasma, los mensajeros pueden ya sea ser degradados (estabilidad de los mensajeros) por una serie de exo y endonucleasas (en celeste) o bien ser traducidos por los ribosomas (verde). La traducibilidad de un mensajero es otro punto posible de control. Por último, la estabilidad de las proteínas (en negro) sintetizadas puede variar, acelerando la degradación de las mismas. Ver texto para detalles.

Entre las grandes diferencias que existen a todo nivel entre una célula eucariota superior y una de un Trypanosomátido, es a nivel de la expresión génica donde se dan el mayor número de discimilitudes. Entre ellas, se incluyen la organización genómica, el control de la transcripción, la transcripción policistrónica, la aparente falta de división de trabajo entre las RNA polimerasas, la carencia de promotores, el procesamiento de los mRNAs por trans-splicing, la edición de mensajeros y la estabilidad de las proteínas. Estas diferencias no habían sido notadas en muchos casos debido a que los mecanismos que gobiernan algunos de estos procesos no fueron estudiados en estos parásitos sino hasta hace relativamente poco. Quizás su modo de vida parasitaria haya presionado selectivamente para que algunos de estos mecanismos se hayan conservado en la evolución. Algunos de estos fenómenos, como el trans-splicing y la edición de RNA, han sido descritos posteriormente en otros taxones, permitiendo la generalización de estos mecanismos.

3.6 Organización genómica.

El avance de los Proyectos Genomas permitió un gran logro: la secuenciación completa y el armado de un continuo para el cromosoma 1 de *Leishmania major* (Myler, 1999). De esto surge de manera incuestionable lo que se sospechaba desde hacia mucho tiempo. Esto es, una organización general en donde las regiones codificantes se agrupaban en una porción pequeña del brazo cromosómico, compartiendo una misma orientación transcripcional, sobre la misma hebra de DNA (figura 8). Ninguno de los genes contiene intrones de clase II, es decir, un solo exón por gen y están arreglados en grandes grupos de repeticiones contiguas del mismo, o muy similar, marco abierto de lectura y separados por pequeñas regiones de secuencia no relacionada, o regiones

intergénicas. Los genes de copia única se encuentran en relativamente baja frecuencia en Trypanosomátidos y los genes multicopias, arreglados en repeticiones continuas, constituyen más del 50% de los genes estudiados hasta la fecha. Existen dos explicaciones para este fenómeno: primero, como mecanismo seleccionado para evitar pérdida de genes esenciales, dada la tendencia de estos organismos a translocar y amplificar secuencias génicas y segundo, como un mecanismo para regular la abundancia de un mRNA determinado, dada la aparente falta de regulación transcripcional en estos organismos (ver más adelante).

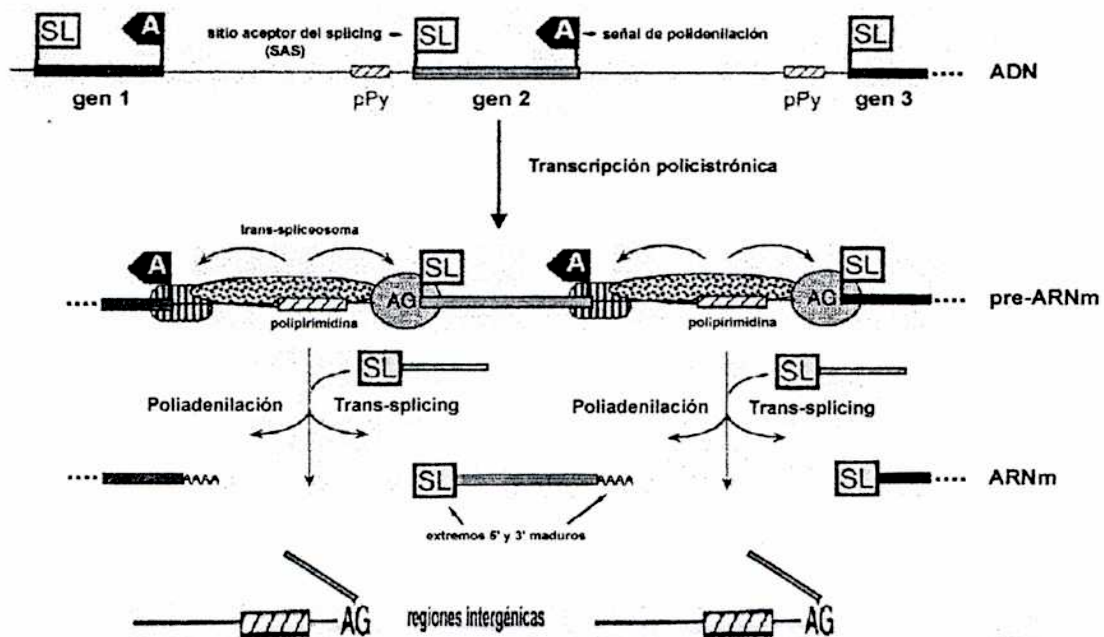


Figura 8. Esquema simplificado de los mecanismos de expresión génica y procesamiento de los RNA mensajeros en Trypanosomátidos. A nivel del DNA, los genes se encuentran como copias consecutivas del mismo o muy similar marco abierto de lectura (gen 1 azul, 2 rojo, 3 negro, etc, etc). Cada marco abierto de lectura posee todas las señales para su procesamiento posterior. En la figura se muestran el trecho rico en polipirimidinas (pPy), el sitio aceptor del splicing (SAS, bandera con la inscripción "SL") y la señal de poliadenilación (bandera negra con la inscripción "A"). La transcripción policistrónica da lugar a un transcrito primario largo (pre-mRNA). El trans-spliceosoma reconoce el trecho de polipirimidinas y procede a realizar las modificaciones (secuenciales o simultáneas) del marco abierto de lectura río arriba (poliadenilación) y río abajo (agregado del splice leader). Esto, arroja como resultado los mensajeros monocistrónicos maduros, con sus extremos "trans-spliceados" y "poliadenilados" (RNA). Ver texto para mayores detalles. Figura basada en "Molecular Biology of Parasitic Protozoa" (1996, Smith D.F. y Parsons M., eds.).

La secuenciación del cromosoma 1 de *L. major*, completó el panorama arrojado por la descripción aislada de distintos *loci* en diferentes Trypanosomátidos, descripciones que coincidían en dos puntos principales: en un gran número de casos los genes relacionados se agrupan en un mismo *locus* y comparten la misma dirección transcripcional. En este contexto, solo unos pocos promotores serían necesarios para transcribir un gran número de genes.

Por lo tanto, esta organización genómica permite explicar dos hechos distintivos de los Trypanosomátidos: la transcripción policistrónica de grandes unidades codificantes y la escasez de promotores identificados hasta el presente.

3.7 Transcripción policistrónica.

La transcripción policistrónica en Trypanosomátidos ha dejado de ser tema de debate hace mucho tiempo para ser considerado una "verdad" demostrada (ver las revisiones de Clayton, 1992 y Pays, 1993). Como vimos, la transcripción policistrónica resulta de la organización genómica de estos organismos. De este tipo de transcripción se desprenden algunas preguntas conceptuales que han desafiado a los investigadores por muchos años: como se obtienen los mRNAs maduros monocistrónicos que darán lugar a las proteínas a partir el transcripto inmaduro, y como se define una unidad transcripcional.

Existe un dato, obtenido a partir de secuenciación de clones genómicos así como de los distintos Proyectos Genoma que parecen ayudar a definir regiones genómicas con potencial para servir de inicio de la transcripción. Este es la composición de bases de las regiones codificantes y no codificantes, o intergénicas. Las primeras son muy ricas en guanidina y citocina (G y C) mientras que las segundas en adenina y timidina (A y T). Estas diferencias en la composición de bases implican diferencias en las temperaturas

de fusión de las hebras de DNA de las distintas regiones y permiten especular que las regiones intergénicas "respiran", permitiendo así que Polimerasas de RNA inicien la transcripción en esas regiones. Existe evidencia experimental que confirma esta hipótesis permitiendo postular que cualquier región intergénica es capaz de funcionar como inicio de la transcripción, al menos en ensayos de expresión transitoria. Aparentemente, la pregunta mas relevante es como se define el final de la transcripción, mas que lo opuesto.

De esta manera, un mismo marco abierto de lectura, es transcrito en unidades policistrónicas de distinta longitud incluyendo un número variable de copias de dicho gen. Sorprendentemente, el resultado final es siempre el mismo, un mRNA monocistrónico maduro.

3.8 Promotores génicos.

El tema del estudio de los promotores génicos en Trypanosomátidos es muy controversial y es objeto de numerosas investigaciones, a veces motivadas por el capricho de querer encontrar homologías con el dogma establecido para eucariotas superiores mas que por el deseo de entender el mecanismo fino que yace bajo el.

Experimentos de expresión transitoria han permitido identificar promotores de RNA polimerasas tipo I (pol I), como el caso de los promotores para VSG de *Trypanosoma brucei* (Clayton, 1990; Jefferies, 1991; Sherman, 1991; Gottesdiener, 1991; Janz, 1994), y promotores de polimerasas tipo II (pol II), como los promotores de los genes para el Splice Leader (ver mas adelante) (Saito, 1994). Sin embargo, la búsqueda de promotores pol II para genes codificantes para proteínas ha sido infructuosa con las posibles excepciones de los promotores de actina y *hsp70* de *Trypanosoma brucei*, aunque la evidencia sobre el carácter de pol II es elusiva (Ben Amar, 1991; Lee, 1996).

Posiblemente, la falla radique en que en los experimentos de expresión transitoria, no es necesaria la presencia de un promotor para lograr transcripción efectiva de algún gen. Para que un gen exógeno se exprese, basta con la presencia de una región intergénica hacia el 5' que aporte las secuencias necesarias para el trans-splicing más una región intergénica hacia el 3' que aporte los elementos necesarios para la poliadenilación (Swindle, 1996). Como se mencionó anteriormente, estas regiones sirven como sitios de iniciación de la transcripción aún cuando no podemos considerarlas promotores. Muchas de las mutaciones que bloqueaban la expresión del gen reportero, y que parecían finalmente definir elementos promotores, no eran más que mutaciones que afectaban el trans-splicing.

Se planteaba entonces una pregunta clara: ¿qué significa la falta de promotores para pol II y como afecta esto al funcionamiento y expresión de una unidad policistrónica?. Ya hemos sugerido algunas posibles explicaciones para este fenómeno: en primer lugar, dada la organización genómica de estos organismos, unos pocos promotores alcanzarían para transcribir grandes porciones de un Cromosoma, y segundo lugar, tal vez estos promotores no existan y en tal caso la transcripción se inicia aleatoriamente en cualquier región intergénica. Esta última explicación sería realmente novedosa en términos biológicos ya que es de suponer que en un organismo altamente especializado, en donde el aprovechamiento de la energía es crucial, la regulación de la expresión debería ser un punto estratégico de control. Sin embargo, la evidencia indica que, salvo contadas excepciones, los promotores para genes que codifican proteínas, no son precisamente la norma en Trypanosomátidos.

Entre los promotores que si se conocen, están los que dirigen la expresión de los antígenos VSG, prociclina, y de los genes ribosomales. A pesar de la presencia de secuencias importantes para la expresión de esos genes, esos promotores no conservan ninguna homología de secuencia con los descritos en eucariotas

superiores. En algunas regiones particulares, existe gran homología solo a nivel estructural, pero solo entre los promotores de Trypanosomátidos.

3.9 Polimerasas de RNA.

Como no podía ser de otra manera, las Polimerasas de RNA también presentan diferencias notables con sus contrapartes de eucariotas superiores.

En los Trypanosomátidos se han identificado tres polimerasas de RNA, clasificadas en función de su resistencia diferencial a la α -amanitina (Cornelissen, 1991). También han sido clonados los genes para las tres subunidades mayores de cada una de ellas, habiéndose encontrado dos genes levemente diferentes para la polimerasa tipo II (Köck, 1988; Evers, 1989; Jess, 1989). La polimerasa tipo II carece de la región de heptapéptidos repetidos en la porción C-terminal, conocida como cola CTD (Carboxi-Terminal Domain) característica de las polimerasas tipo II de otros eucariotes. De todos modos esta proteína mantiene la capacidad de ser fosforilada en la región C-terminal, lo cual, según se conoce, es de importancia para la regulación de la actividad polimerasa en otras especies (Evers, 1989).

La primera diferencia importante entre polimerasas de Trypanosomátidos y de eucariotas superiores fue el descubrimiento de que los genes de VSG y prociclina eran transcritos por una Polimerasa de RNA con características de RNA pol I o polimerasa ribosomal, que es resistente a α -amanitina (Kooter, 1984; Koenig, 1989; Rudenko, 1989). Tres datos independientes confirmaron esta observación inicial: en primer lugar, la transcripción no era afectada en presencia del detergente Sarkosyl, rasgo distintivo de las polimerasas tipo I (Rudenko, 1991), segundo, los ensayos de localización in situ mostraron que los mensajeros nacientes de prociclina se encontraban en el nucléolo

(Chung, 1992) y tercero, diferentes estudios mostraron gran similitud estructural entre los promotores de VSG, prociclina y el promotor ribosomal.

¿Cómo es posible entonces que ocurra la transcripción de RNA mensajeros por una polimerasa distinta a la del tipo II? La respuesta reside en que en los Trypanosomátidos la iniciación de la transcripción y la adición del *cap* en los mRNA no está acoplada, como sí ocurre en otros eucariotas. La razón por la cual una polimerasa de tipo I se encuentre transcribiendo genes codificantes para proteínas, puede hallarse en la abundancia necesaria de estos mensajeros dado que las proteínas de superficie constituyen un alto porcentaje de la proteína total de estas células y en la mayor eficiencia de transcripción de estas polimerasas.

Como era de esperarse, datos obtenidos posteriormente propusieron un escenario algo diferente ya que en primer lugar, en ensayos de "run-on" se vió una dependencia de cationes divalentes para la actividad que es característica de Pol II y en segundo lugar, los mensajeros nacientes de VSG no han sido localizados en el nucléolo sino en otra región discreta del nucleoplasma (Vanhamme, 1995). Por lo tanto la polimerasa de RNA que transcribe esos genes, parece tener características compartidas de las polimerasas de tipo I y II de organismos superiores.

En conclusión, las polimerasas de Trypanosomátidos no muestran la clásica distribución de trabajos propia de otros eucariotas ni tampoco resulta fácil clasificarlas siguiendo los criterios utilizados comúnmente.

3.10 Regulación transcripcional.

Un hecho importante hizo de los promotores de VSG y prociclina los mas estudiados: ambos genes tienen una regulación a lo largo del ciclo de vida del parásito, siendo las

VSGs el antígeno específico de la forma sanguínea y la prociclina el antígeno específico de la forma procíclica. Por lo tanto, estos genes se convirtieron en óptimos modelos para el estudio de la regulación transcripcional.

Etienne Pays demostró que los promotores de ambos genes eran activos durante todo el ciclo de vida del parásito, indicando que la regulación no se ejerce a ese nivel, contrariamente a lo esperado por nuestra experiencia en el estudio de promotores (Pays, 1990).

¿Cómo se producen entonces las enormes diferencias en los niveles de mensajeros de uno y otro gen?. Experimentos de "run-on" indican que aparentemente el control se ejerce a nivel de la elongación del RNA, ya que la frecuencia de aparición de mensajeros largos es mucho menor que la de mensajeros cortos (Pays, 1990; Rudenko, 1994). Esto ha sido demostrado para el promotor de VSG en la forma procíclica y para el promotor de prociclina en la forma sanguínea. Si bien no se puede descartar cierto efecto sobre la iniciación de la transcripción, la regulación entre estadios estaría dada por una terminación prematura o "transcripción abortiva". Estos resultados indican que ambos estadios poseen las proteínas necesarias para utilizar uno u otro promotor, pero la diferencia estaría dada por la presencia o ausencia de factores represores de la elongación de carácter no difusible.

Curiosamente, este modo de regulación transcripcional mostró una gran dependencia del contexto cromosómico. Cuando una unidad transcripcional de VSG se insertó en un *locus* sujeto a transcripción por una polimerasa tipo II, la transcripción es activa y completa en los dos estadios del parásito (Jefferies, 1993). Esto muestra que la capacidad del promotor de VSG para reclutar la polimerasa tipo I y para regular la terminación abortiva, esta sujeta a "efectos de posición". Como vemos, otra vez los Trypanosomátidos nos desafían a modificar nuestros dogmas. Resulta evidente que

resta mucho por investigar de este tipo de regulación y que nuestro conocimiento sobre la regulación transcripcional en estos organismos es muy pobre.

3.11 Regulación post-transcripcional.

Podría creerse erróneamente que, en vista de la organización genómica de los Trypanosomátidos y el hecho demostrado de una transcripción policistrónica, que todos los genes agrupados en una misma unidad transcripcional se expresan de la misma manera. Esto es definitivamente falso. Genes vecinos que son transcritos con una misma eficiencia, muchas veces presentan marcadas diferencias en su expresión. Existen muchos puntos potenciales de control de la expresión a nivel post-transcripcional. En principio, entre las más evidentes, encontramos la eficiencia en el procesamiento de los mRNA policistrónicos, la estabilidad de los mRNAs, el transporte de los mRNAs maduros al citoplasma, la estabilidad y la traducibilidad de tales mRNAs, y la estabilidad de las proteínas correspondientes. No existe evidencia de la existencia de un control de la exportación. A continuación presentaremos una breve reseña sobre algunos de estos puntos. (figura 7).

3.12 El "capping" por trans-splicing y la poliadenilación.

La transcripción policistrónica requiere que los transcriptos primarios inmaduros sean procesados a transcriptos maduros individuales mediante el clivado y la siguiente adición de un grupo 7-metil-guanosina (*cap*) en el extremo 5' y una cola de poliadeninas en el extremo 3', a efectos de proteger a los mRNAs de la degradación y de permitir una traducción adecuada de los mismos (figura 8). En los Trypanosomátidos el

agregado del *cap* ocurre mediante una reacción de trans-splicing (que también podríamos llamar *trans capping*) (Agabian, 1990) (figura 9).

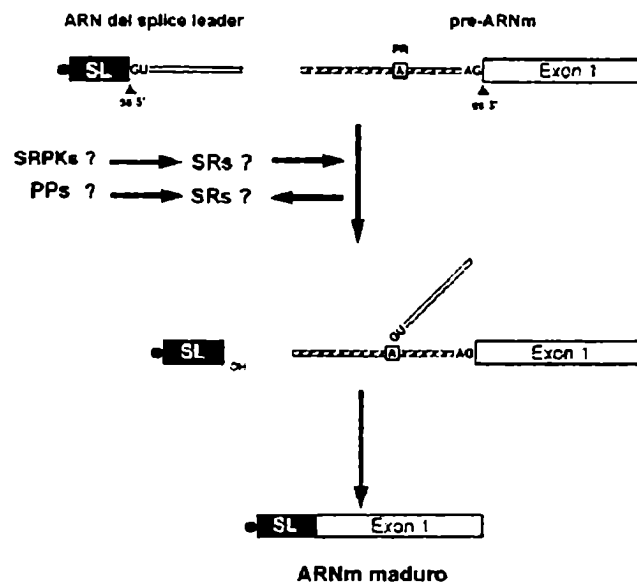


Figura 9. Esquema de la reacción de trans-splicing. La reacción bimolecular, una molécula de RNA transcripta independientemente, el SL RNA, y el RNA codificante (pre-mRNA), esquematizado como exón 1, en la figura. La formación de un intermediario con forma de "Y", gracias al ataque del grupo fosfato de la G del dinucleótido GU en el sitio de splicing 5' (ss 5') del SL RNA al nucleótido A en el punto de ramificación (PR) en el intrón del pre-mRNA, precede la segunda reacción de transesterificación en el sitio de splicing 3' (ss 3') o AG aceptor, que produce la ligación de las dos moléculas de RNA. El SL RNA, aporta el CAP (punto negro en el extremo 5'). No se conocen proteínas SR o sus quinetas asociadas en la regulación de esta reacción (ver texto).

El trans-splicing es, por definición una reacción de procesamiento de RNA intermolecular (trans-) que une, de manera absolutamente precisa y orquestada exones de RNAs transcriptos por separado (figura 9). Existen dos formas descritas de esta reacción, pero aquí nos ocuparemos solamente de la que se encuentra en protozoarios, entre otros. Basicamente, la reacción consiste en el agregado de un pequeño transcripto denominado SL ("*splice leader*") o mini-exón, a otro transcripto. La reacción fue descubierta en *Trypanosoma brucei*, en el laboratorio de George Cross (Boothroyd, 1982), en una serie de experimentos diseñados para caracterizar genes y mensajeros que codificasen para glicoproteínas variables de superficie (VSGs). En esos

experimentos, se vió que clones de DNA copia (cDNA) y genómicos eran idénticos, excepto por una secuencia invariable de 39 nucleótidos encontrada en los extremos 5' de los clones de cDNA. Los experimentos de mapeo con nucleasas posicionaron el sitio de divergencia en un posible sitio aceptor de splicing, sugiriendo que esos 39 nucleótidos habían sido "pegados" mediante un mecanismo de splicing. Los ensayos de Southern blot, mostraron que esa secuencia no se encontraba cerca de los genes de VSG, sino en repeticiones de mas de 100 veces en otro locus. Otros experimentos descubrieron que esa secuencia constituía el extremo 5' de un transcripto mayor, de aproximadamente 140 bases de longitud, llamado RNA del "*splice leader*" (SL-RNA). Además, en el SL-RNA, los 39 nucleótidos estaban inmediatamente río arriba de lo que parecía ser un sitio de splicing 5' convencional. Todos esos resultados sugerían que esa secuencia de 39 nt podía haberse agregado por un mecanismo de trans-splicing (ver review Agabian, 1990).

La evidencia definitiva de tal reacción se obtuvo cuando se demostró la existencia de los intermediarios de la reacción, in vivo (figura 9, Murphy, 1986, Sutton, 1986, Laird, 1987). Como se verá mas adelante (figura 12), la reacción de splicing ocurre mediante dos reacciones sucesivas de trans-esterificación. En el primer paso, se corta el sitio 5', acompañado por la formación de un enlace fosfodiéster 2'-5' entre la adenosina del sitio de ramificación y el 5' de la guanosina del intrón, produciendo el intermediario "lazo" ("*lariat*"). De manera análoga, la reacción de trans-splicing ocurre a través de los mismos pasos, sólo que el intermediario "lazo" es por obligación una "Y".

Rápidamente, se vió que todos los transcriptos mRNA de Trypanosomátidos poseían el SL en su extremo 5', generalizando la reacción a todos los mensajeros. Por años, se creyó que esta era la única manera en que estos organismos procesaban sus mensajeros, hasta que un trabajo de los Dres. E. Ullu y C. Tschudi (Mair, 2000), en el

que contribuyó Isabel Santori, del Ingebi, se describió el único caso de un intrón en una secuencia de *Trypanosoma brucei* y *cruzi* a nivel del gen de la PoliA Polimerasa (PAP). Esto obliga, por definición, a que exista la maquinaria capaz de procesarlo, sin recurrir al trans-splicing. Por ahora, este es solo un caso aislado pero nada impide que hayan muchos mas casos por descubrir y describir.

Finalmente, cabe decir que el trans-splicing no es exclusivo de Trypanosomátidos, sino que ya ha sido descrito en una variedad de organismos, como los nematodos (Krause, 1987), trematodos (Rajkovic, 1990, Davis, 1994) y euglenoides (Tessier, 1991). Esto abre la posibilidad de estudiar variaciones evolutivas entre las distintas formas que han sido seleccionadas.

Al descubrirse el trans-splicing en *Trypanosoma brucei*, dos preguntas importantes surgieron inmediatamente: ¿Cómo se reconocen el SL-RNA y el pre-mRNA? y ¿cómo se mantienen unidos durante la reacción de splicing? Debería existir un puente entre ambos. La primera respuesta a esta pregunta empezó a vislumbrarse cuando se descubrieron, en estos organismos, las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares, o snRNPs, conteniendo los homólogos de los RNA pequeños nucleares como U2, U4 y U6 y que además, que estas partículas eran necesarias para el trans-splicing (Tschudi, 1990). Esta demostrado que los cinco U-snRNPs (U1, U2, U4, U5 y U6) participantes del cis-splicing son esenciales para esta reacción, tanto para el reconocimiento de partes del templado así como para el reclutamiento de otros factores del spliceosoma (ver figura 10). Debido a la gran homología existente entre los U-snRNPs de vertebrados y los de Trypanosomátidos, se cree que podrían cumplir funciones similares en ambas reacciones. Durante el cis-splicing, estos snRNAs establecen complejas interacciones RNA-RNA, incluyendo snRNA-pre-mRNA y snRNA-snRNA (Nilsen, 1994). En el cis-splicing tanto U1 como U5 participan en el reconocimiento temprano del sitio 5'

de splicing. En trypanosomas, en cambio, no existe evidencia de la presencia de U1. Se cree que esta función la cumpliría el mismo SL-RNA (Bruzik, 1990, Steitz, 1992).

La secuencia del exón del SL está altamente conservada en todos los protozoos estudiados (24/39 nucleótidos idénticos), particularmente alrededor del sitio de splicing y en largo (39 nt), con la excepción de *Leptomonas collosoma* que tiene una inserción de 2 bases. Es importante destacar que la adición del SL-RNA provee a los mRNA de estos organismos la estructura cap, que en protozoos es del tipo 4. No se conocen señales consenso de poliadenilación en Trypanosomátidos y ciertos trabajos sugieren un mecanismo constitutivo mediante el cual la poliadenilación ocurre a una distancia conservada con respecto al sitio de trans-splicing del gen río abajo. La poliadenilación tiene lugar generalmente sobre secuencias con varias adenosinas (Hug, 1994, Matthews, 1994).

Tanto para el trans-splicing como para la poliadenilación se ha observado que el procesamiento puede ocurrir en distintos sitios dentro de una región acotada. De este modo existen varios casos de poliadenilación y trans-splicing alternativos, lo que genera mensajeros para un mismo gen con regiones 5' y 3' no codificantes (UTRs) de distinto tamaño. Hay un gran número de trabajos que muestran que estas UTRs, principalmente la 3' UTR, están involucradas en la regulación de la expresión génica entre estadios (Jefferies, 1991; Hug, 1993; Aly, 1994; Teixeira, 1995; Berberof, 1995). En experimentos de expresión transitoria o permanente (integración en el genoma), una región 3'UTR puede conferir especificidad de estadio a un gen reportero.

En conclusión, la elección de los sitios de procesamiento y la calidad de las 5' y 3' UTRs resultantes afectan el éxito de la maduración y la estabilidad de los mRNAs. Esta variabilidad podría ser importante para la regulación de la expresión génica (Layden, 1988, Revelard, 1993).

Es claro que el monto final de mRNA puede determinarse a este nivel. Primero, la abundancia relativa de pirimidinas hacia 5' del Sitio Aceptor del Trans-Splicing (SAS) determina la eficiencia del proceso y el nivel final de mRNA (Huang, 1991; Kapotas, 1993; Hug, 1994). Segundo, la elección del SAS puede regularse con el estadio del parásito y tal elección correlaciona con la cantidad de mensajero (Pays, 1989; Erondou, 1992; Revelard, 1993). Cuando se realiza una expresión transitoria con una construcción donde una simple mutación anula el SAS preferido para el estadio que se ha de transfectar, la expresión del reportero decae notablemente con respecto a la construcción no mutada. Tercero, la poliadenilación, que no puede separarse mecánicamente del trans-splicing, también puede ser regulada en sí misma dependiendo del estadio (Pellé, 1993). Es interesante destacar que, un incremento en la cola de poli(A) es observado en ciertos mensajeros durante la diferenciación de un estadio a otro, correlacionando este incremento con una abundancia mayor de los mismos (Pays, 1993).

La secuencia temporal de los eventos de maduración ha sido objeto de fuertes debates. En algunos casos se han detectado mensajeros que ya han sufrido trans-splicing pero que carecen de la cola de poli(A) y en otros pareciera que la poliadenilación fuera previa al trans-splicing (mensajeros con poli(A) y sin *cap*) (Huang, 1991, Ullu, 1992). El orden de los eventos parece variar según el gen estudiado pero en todo caso se observa que el procesamiento ocurre muy rápidamente después de la síntesis del RNA y muy probablemente sea de carácter cotranscripcional.

La elección del sitio de trans-splicing estaría influenciada por una secuencia rica en pirimidinas (trecho TC o trecho de polipirimidinas) presente a corta distancia río arriba del sitio aceptor del SL (SAS), siendo este sitio aceptor un dinucleótido ApG hacia 5' del ATG iniciador de la traducción (figura 9). Una serie de observaciones revelaron que ambos eventos estarían acoplados y que la elección del SAS para un gen dado

determinaría el sitio de poliadenilación para el gen río arriba. Primero, la distancia entre el sitio de poliadenilación para un gen y el SAS para el siguiente parece estar conservada y varía según la especie (100-150 pb para *T. brucei* por ejemplo). Al realizar deleciones entre estos dos sitios, sin involucrar el trecho de polipirimidinas, se observa que al mantenerse el SAS, el sitio de poliadenilación se desplaza hacia 5' (LeBowitz, 1993). De todos modos, la existencia de excepciones a estas observaciones mantiene el debate abierto (Matthews, 1994). Segundo, si se realizan deleciones o sustituciones en bloque en el trecho de polipirimidinas, se observa la utilización de sitios aberrantes, tanto para el trans-splicing como para la poliadenilación, con la consecuente disminución en los niveles de mensajeros (Schurch, 1994, LeBowitz, 1993, Matthews, 1994). Tercero, al construir plásmidos para expresión transitoria de genes reporteros, la ubicación de los trectos de polipirimidinas colocados a 5' y 3', determina el sitio de trans-splicing y de poliadenilación, respectivamente (Hug, 1994). Cuarto, en muchos casos la eficiencia del trans-splicing depende de la riqueza de pirimidinas en la región 5' del gen (Kapotas, 1993). Finalmente y en términos más generales, la existencia de trechos de polipirimidinas de RNA ha sido estudiada en varios tipos celulares como sitio de interacción con proteínas involucradas en modulación post-transcripcional de la expresión génica (Morris, 1993).

El conjunto de estos resultados sugiere que una maquinaria de procesamiento de RNA se une al transcripto inmaduro mediante un trecho de polipirimidinas de la región intergénica y rápidamente ocurre el clivado seguido de la poliadenilación del gen río arriba y el trans-splicing del gen río abajo.

Recientemente, Naïma Ismaili en el laboratorio de Etienne Pays, en Bruselas, describió el clonado y caracterización de una proteína de la familia SR (ver mas adelante la descripción de esta familia), TSR1 en *Trypanosoma brucei* (Ismaili, 1999). El trabajo y uno subsiguiente (Ismaili, 2000), exhaustivos y detallados indican que TSR1 interactúa

con U1 70K, una proteína del complejo U1 y con una determinada región del SL-RNA. El trabajo es importante en el sentido que describe por primera vez la existencia de una proteína de la familia, al menos en cuanto a estructura en un Trypanosomátido. Esto no es trivial, aunque tampoco es particularmente inesperado, debido al grado de conservación observado a todo nivel, entre miembros de ambos tipos de reacción, cis- y trans-splicing. Curiosamente, Ismaïli no pudo demostrar que su proteína era efectivamente una proteína SR, ya que todos los ensayos de splicing estudiados resultaron infructuosos. La demostración de la actividad de una proteína SR en un ensayo de splicing es crucial, ya que la homología de secuencia no determina necesariamente la pertenencia a una determinada familia.

3.13 Edición de RNA.

Quizás el descubrimiento del fenómeno de la edición del RNA sea el que mas ha revolucionado nuestros dogmas moleculares. Resulta fascinante el hecho que un mecanismo tan particular haya sido seleccionado en organismos primitivos y que luego se haya perdido en taxones superiores.

La generación de moléculas funcionales de mRNA en el kinetoplasto de los Trypanosomátidos requiere de la adición o inserción de residuos de uridina, mediante un novedoso proceso de modificación post-transcripcional: la edición de RNA. Una revisión detallada del proceso se puede encontrar en (Benne, 1994).

Cuando la edición de RNA fue descrita por primera vez en *T. brucei* por Benne (1986), se consideró como una violación a uno de los dogmas centrales de la biología molecular: la edición del mRNA de la subunidad II de la citocromo oxidasa producía cambios en la información genética que no estaban contemplados en la secuencia de

DNA del gen correspondiente. El descubrimiento de que estos cambios son dirigidos por pequeñas moléculas de RNA guías (RNAg) codificados por genes presentes en los minicírculos ofreció una explicación al fenómeno (Blum, 1990).

Los ejemplos se sucedieron abundantemente y varían desde la inserción o deleción de unos pocos hasta cientos de residuos U. Posteriormente, el fenómeno de edición fue reconocido en animales, plantas y otros organismos primitivos (Hajduk, 1996).

El mecanismo de edición de RNA ha sido extensivamente estudiado. El análisis de mRNAs parcialmente editados permitió determinar la direccionalidad 3'-5' del proceso. Cada RNAg es complementario a una pequeña porción del mRNA no editado hacia 3' del sitio de edición (secuencia de anclaje, unos 15 nt), pero también a una porción mayor del mRNA ya editado (unos 45 nt). Así entonces, el RNAg se coloca inmediatamente hacia 3' del sitio de edición mediante la secuencia de anclaje y cuando la edición ha terminado, la complementación entre ambas moléculas de RNA alcanza su máximo (Blum, 1990).

Aunque existen distintas hipótesis sobre el mecanismo de edición, se reconoce en todo caso la presencia de un complejo ribonucleoproteico con actividades de riboendonucleasa, U transferasa terminal (TUTasa), ligasa de RNA y helicasa de RNA, entre otras. Por último cabe destacar que el proceso de edición está sujeto a cambios durante el desarrollo del ciclo de vida de estos parásitos (Feagin, 1988).

3.14 Regulación traduccional.

Existen algunas evidencias que sugieren que la traducibilidad de los mRNAs podría estar implicada en la regulación génica. Algunas observaciones señalan a las regiones 3' UTR de varios genes como elementos importantes en la regulación de la

traducibilidad de los mensajeros. Particularmente, en las regiones 3' UTR de los distintos mRNAs de prociclina se ha encontrado un único elemento conservado que consiste de una secuencia de 16 nucleótidos que forma una estructura secundaria cuyo correcto plegado es requerido para una expresión óptima del gen. Se sabe que esta secuencia no afecta ningún parámetro como la cantidad, la poliadenilación, la estabilidad o la distribución nucleocitoplasmática del mRNA. Por lo tanto, es probable que el efecto ocurra sobre la traducción (Hehl, 1994). Otros ejemplos se encuentran en el estudio de la aldolasa y la quinasa de proteínas NrK (Clayton, 1985; Gale, 1994). Ambos genes son diferencialmente expresados entre estadios pero las diferencias en los niveles de mRNAs no alcanza para justificar los enormes cambios en la cantidad de estas proteínas. Estas observaciones sugieren que los mensajeros podrían ser traducidos diferencialmente.

3.15 Estabilidad de proteínas.

Existen dos casos en los que el índice de recambio de una proteína es afectado según el estadio. El citocromo C y la citocromo C reductasa desaparecen casi por completo en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*, aún cuando se detectan los mRNAs para ambas proteínas (Torri, 1993; Priest, 1994). Ha sido demostrado, además, un incremento en la degradación de estas proteínas que podría estar correlacionado con la represión en el uso de las funciones mitocondriales en la forma sanguínea del parásito.

4. Splicing.

El procesamiento de los pre-mRNA implica una serie de reacciones complejas realizada por complejos multiprotéicos y ribonucleoprotéicos en el seno del núcleo celular (figura

10). Como resultado de esto, los RNA transcriptos maduros estan listos para dejar el núcleo y ser traducidos en el citoplasma. Las tres reacciones principales que ocurren durante el procesamiento del pre-mRNA son: 5' capping, en donde se protege el extremo 5' de los mensajeros, poliadenilación (polyA) donde se agrega un número variable de adenosinas en el extremo 3', y el cis-splicing, en donde se eliminan secuencias definidas del transcripto primario, a nivel de los intrones. En este capítulo estudiaremos esta reacción en particular, analizando brevemente los actores principales de la reacción. Existen extensa bibliografía que puede consultarse sobre estos mecanismos (Burge, 1999; Reed, 1997; Will, 1997; Cáceres, 1997; Whale, 1997).

La eliminación de los intrones, ocurre básicamente en dos pasos de transesterificación. El primer paso genera un enlace 2'-5' en el punto de ramificación (ver figura 12), río arriba del sitio 3' de splicing y un grupo oxidrilo (OH) libre en el exón 5', produciendo un intermediario de reacción llamado de lazo o "*lariat*". El segundo paso, involucra el desplazamiento del oxhidrilo del enlace fosfodiéster del sitio 3', por el del sitio 5', dejando el intermediario lariat libre y los dos exones unidos. Estos pasos son esenciales para la vida celular y son realizados en el núcleo dentro de una partícula denominada spliceosoma. En ensamblado y funcionamiento del mismo, involucra mas de 100 polipéptidos y 5 RNAs pequeños nucleares (snRNAs), cuyas características serán analizadas mas adelante (ver figura 10).

El estudio del procesamiento de los mensajeros es un campo dinámico que ha crecido enormemente desde que Philip Sharp describiera el fenómeno por primera vez en la década del 70'. Actualmente, el campo evoluciona rápidamente y nuevas interacciones y miembros son descriptos continuamente. Esto indica claramente que nuestro conocimiento sobre la reacción evolucionará y por lo tanto las pequeñas verdades que asumimos hoy, probablemente variarán en el futuro

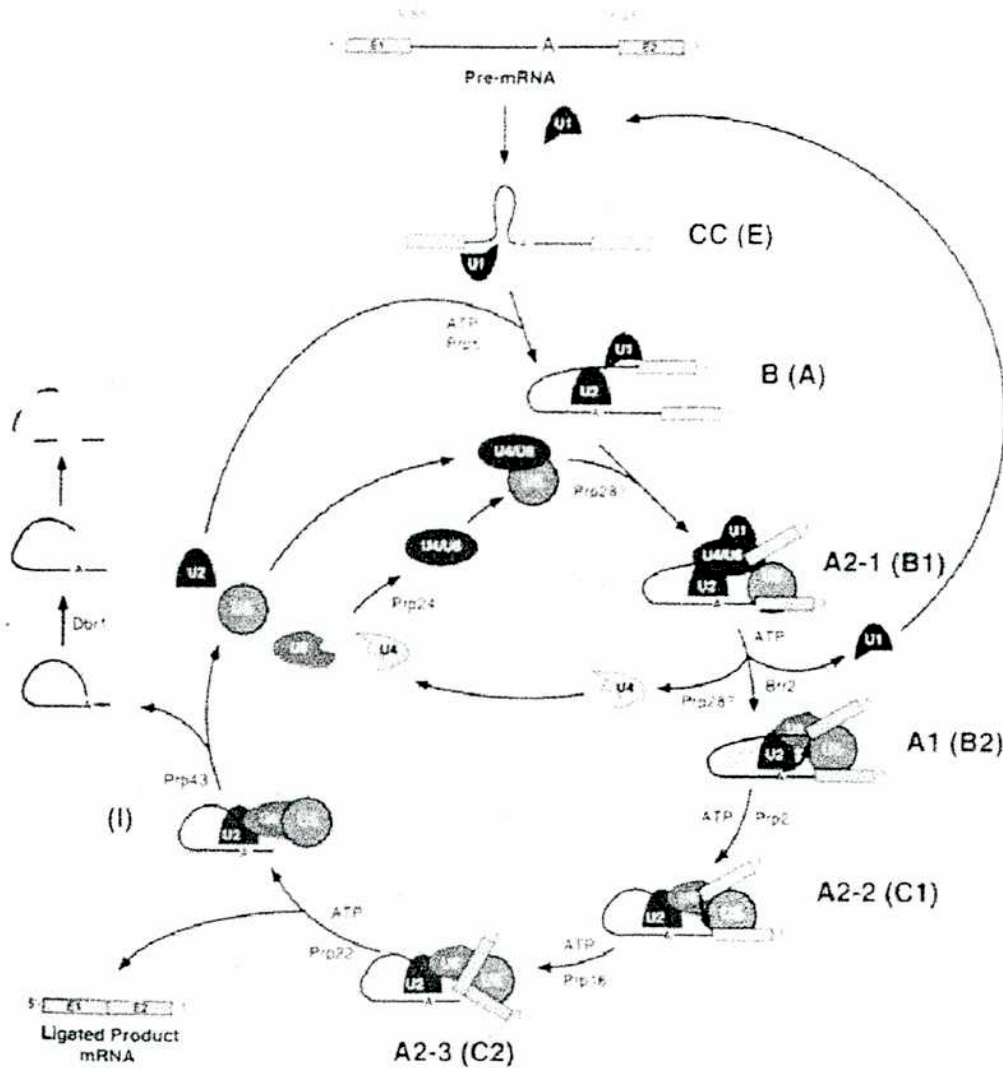
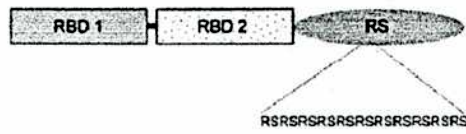


Figura 10. El ciclo del spliceosoma. Se muestra el procesamiento de un pre-RNA conteniendo dos exones y un intrón (ver figura 12 para detalles del pre-mRNA) a la forma de dos exones ligados (abajo a la izquierda) y un intrón con la forma "lazo" (izquierda, al medio). Se resaltan las funciones cumplidas por las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP, ver texto) a lo largo de las distintas etapas de la catálisis del pre-mRNA. Los complejos macromoleculares identificados y caracterizados genética y/o bioquímicamente se indican con la nomenclatura sugerida para levaduras, mientras que la sugerida para mamíferos, se indica entre paréntesis. Las flechas indican transiciones entre complejos y/o el reciclaje de los componentes de los snRNPs. Dbr1 es la enzima responsable de la desramificación del "lazo". Se muestran diferentes RNA helicasas dependientes de ATP (Brr2, Prp2, Prp5, Prp16, Prp22, Prp24 y Prp42). NO se incluyeron otros factores no-snRNPs, como las proteínas SR que serán presentados en detalle mas adelante, en el texto. Esquema tomado del libro "The RNA World" (1999, Gesteland, Cech, Atkins, autores). Existe evidencia (aunque controversial) de que el ATP no es necesario para algunos de los pasos (Perriman, 2000)

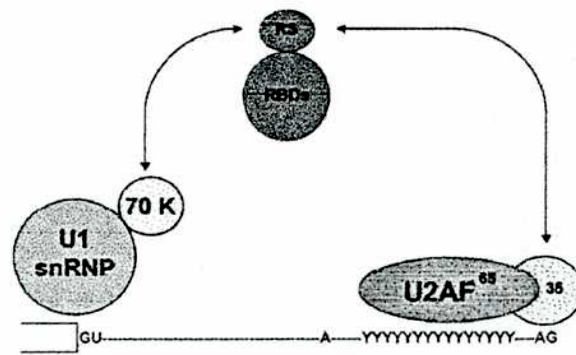
4.1 Factores de splicing: proteínas ricas en dipéptidos de serina-arginina (Proteínas SR).

4.1.1 Introducción.

A



B



C



D

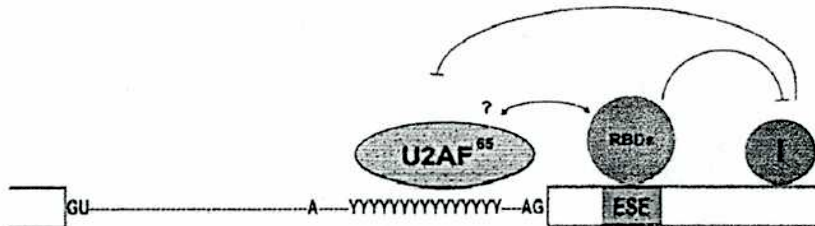


Figura 11. Esquema de una proteína SR genérica y mecanismos de acción de las proteínas SR.

Panel A. Las proteínas SR presentan una estructura primaria característica, con uno o dos dominios de unión a RNA, denominados RBD 1 y 2 (RNA Binding Domain o RRM, RNA Recognition Motif). El primero de estos dominios está muy conservado y está presente en todas las proteínas de la familia. El segundo dominio está mucho menos conservado y está presente en un subconjunto de proteínas de esta familia, llamadas proteínas SR de tipo II, mientras que las que tienen dos dominios son del tipo I. Entre ambos dominios se encuentra un dominio "G-rich", rico en el residuo glicina (aunque no en todos los miembros). Finalmente, hacia el extremo C-terminal se encuentra el dominio RS, de longitud variable. Este dominio es rico en el dipéptido serina (S) y arginina (R), que le da el nombre al dominio y a la familia. Este dominio está involucrado en interacciones proteína-proteína (ver texto). **Panel B. Definición intrónica, dependiente del dominio RS.** El dominio RS de las proteínas SR es necesario para el splicing constitutivo. El dominio RS de ASF/SF2 y TcSR es necesario para la interacción con U2AF³⁵ en amarillo unido a U. Asimismo, es necesario para la interacción con U1 70K, en el caso de ASF/SF2 y TSR1, de *Trypanosoma brucei*. Estas interacciones facilitan la unión de los sitios de splicing 5' y 3'. **Panel C. Sitio de splicing 3' débil, dependiente U2AF³⁵ y dominio RS.** El splicing de algunos intrones con trecho de polipirimidinas débil requieren la unión de U2AF³⁵ así como el dominio RS de proteínas SR. **Panel D. Sitio de splicing 3' fuerte, independiente U2AF³⁵ y dominio RS.** El dominio RS y U2AF³⁵ no son necesarios para el splicing en presencia de sitios de splicing 3' fuertes. El dominio RS puede no ser indispensable para la actividad de ciertos ESEs (ver texto). Existen dos mecanismos postulados para ello: primero, otros dominios, como los de unión a RNA u otros desconocidos hasta el momento, pueden pedir la/s interacción/es proteína-proteína; segundo, la unión de la proteína SR al pre-mRNA a través de los RBDs puede ser suficiente para promover el splicing por competencia con factores inhibitorios (I, violeta), como los hnRNPs que poseen actividades antagónicas en la selección del sitio de splicing.

La familia de proteínas SR es característica de la regulación del procesamiento del RNA. Desde el descubrimiento del splicing de los mensajeros en 1977, se ha avanzado considerablemente en la identificación de factores que actúan en *cis* o en *trans* en esta reacción. Se sabe que se requieren múltiples componentes protéicos y nucleoprotéicos para procesar un mensajero, dentro de una partícula conocida como spliceosoma.

Los componentes de la maquinaria de splicing o factores involucrados en el ensamblado del spliceosoma incluyen: los ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (small nuclear ribonucleoproteins, snRNP) U1, U2, U4/U6 y U5, (ver figura 9) un gran número de polipéptidos que se asocian con los RNA hetero nucleares (hnRNA) para formar las Ribonucleoproteínas heteronucleares o (hnRNP) y gran cantidad de factores de splicing esenciales, no-snRNP. (ver revisiones de Krainer, 1988; Green, 1991; Río, 1993; Krämer, 1993; Lamm, 1993).

Existen muchos enfoques utilizados para el estudio de los factores de splicing. Desde los ensayos realizados en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, con un enfoque mas

genético hasta los ensayos de splicing in vitro con extractos de células de mamíferos, puestos a punto en el año 1984, se han caracterizado una gran variedad de factores de splicing. Muchos de los factores caracterizados por diferentes métodos y enfoques, han probado ser los mismos, y a pesar de la distancia entre los organismos modelo, los mecanismos básicos del procesamiento de RNA han demostrado un altísimo grado de conservación en todos los organismos estudiados.

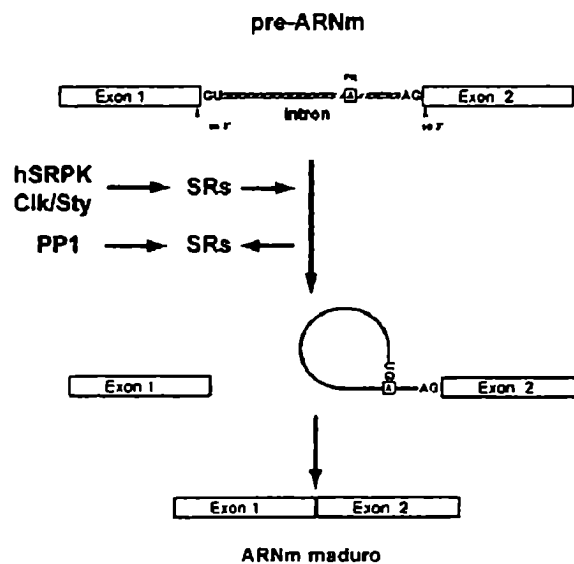


Figura 12. Esquema de la reacción de cis-splicing. La reacción unimolecular, une dos exones de un pre-mRNA separados por un intrón, esquematizados como exón 1 y 2, en la figura. La formación de un intermediario con forma de "lazo", gracias al ataque del grupo fosfato de la G del dinucleótido GU en el sitio de splicing 5' (ss 5') del exón 1, al nucleótido A en el punto de ramificación (PR) en el intrón del pre-mRNA, precede la segunda reacción de transesterificación en el sitio de splicing 3' (ss 3') o AG aceptor, que produce la ligación de los dos exones del pre-mRNA. Los pasos de reconocimiento temprano están orquestados (entre otros), por proteínas SR que definen los sitios 5' y 3' de splicing. Estas están reguladas entre otras cosas, por quinasas específicas asociadas, siendo SRPKs y Clk las más importantes (ver texto). Para que la reacción proceda, las proteínas SR deben ser defosforiladas y abandonar el templado.

En este capítulo se describirán los factores de splicing más estudiados y más representativos de la familia de proteínas SR. Cabe aclarar que la complejidad de la reacción de splicing y la rapidez con la que evoluciona el campo hacen que cualquier introducción al tema por exhaustiva que esta sea, pierda vigencia rápidamente.

Asimismo, no es la intención de este capítulo analizar en detalle la actividad de las proteínas SR, sino hacer una presentación general sobre estas proteínas.

La familia de proteínas SR es la familia de factores de splicing mas estudiada y esta conformada por proteínas muy relacionadas en cuanto a su estructura primaria que forman dominios característicos que analizaremos en detalle mas adelante y, todos los miembros poseen una actividad conservada a nivel bioquímico.

Podemos dividir a esta familia en dos grandes grupos, basados en la estructura general de las proteínas miembros dependiendo que posean uno o dos dominios de unión a RNA (ver figura 11). Los dos miembros prototípicos de cada uno de estos grupos son ASF/SF2 (Associated Splicing Factor/Splicing Factor 2) del subtipo I, y SC35 (Spliceosomal Component 35) del subtipo II. Los dos grupos de proteínas son ampliados frecuentemente ya que nuevos miembros son identificados y caracterizados día a día. Este punto se basará en la descripción de las proteínas ASF/SF2 y SC35 principalmente y en menor medida, de otras proteínas de la familia.

4.1.2 ASF/SF2.

Este factor de splicing fue identificado simultáneamente en los laboratorios del Dr. James Manley, quien lo nombró ASF (Ge, 1990) y el Dr. D. Kozak, quien nombró al factor identificado como SF2 (Krainer, 1990). La caracterización detallada de SF2 fue realizada posteriormente por el Dr. Adrián Krainer (primero en el laboratorio del Dr. Kozak, y luego en su propio laboratorio). Los laboratorios de Manley y Krainer están entre los laboratorios mas renombrados en el estudio y caracterización de estas proteínas.

Manley identificó a ASF como un factor de splicing y lo purificó de células 293. Para su caracterización se basó en la capacidad de este factor de provocar un cambio en la elección del sitio 5' de splicing del pre-mRNA de SV40, favoreciendo la elección del sitio 5' del antígeno pequeño t de SV40 (río abajo), en un ensayo de splicing alternativo (ver esquema figura 13), al ser agregado a extractos nucleares de células HeLa. Krainer, en cambio, purificó una actividad de splicing con capacidad de complementar un extracto de células HeLa S100, incompetente para realizar splicing. Este factor, además, pudo modular la actividad de splicing alternativo in vitro, de manera dependiente de la concentración. Concentraciones crecientes de SF2 producían un cambio en la elección del sitio 5' de splicing, hacia sitios más río abajo en el templado (sitios proximales) tanto en el pre-mRNA del gen de β -thalasemia como en el pre-mRNA de β -globina, eliminando paralelamente la competencia entre diferentes sitios.

Los siguientes trabajos en los que se presentaba el cDNA de ambos factores, demostraron que ASF y SF2 eran idénticos (Krainer, 1990; Ge, 1990). La proteína, de 248 aminoácidos y 28 KDa de peso molecular presentaba dos copias de un dominio de unión a RNA (RRM, RNA Recognition Motif o RBD, RNA Binding Domain) separados por una "visagra" rica en el aminoácido glicina y un dominio C-terminal rico en dipéptidos arginina-serina llamado SR o RS (ver figura 11).

El dominio RBD es una región conservada de aproximadamente 80 aminoácidos presente en una más copias en gran cantidad de proteínas con capacidad de unión a RNA, muchas de ellas involucradas en el procesamiento de pre-mRNA y pre-RNA, como las snRNPs, hnRNP y proteínas de unión a poliA (ver detalles en Bandziulis, 1989; Birney, 1993; Kenan, 1991). El trabajo de Birney (1993) determinó los aminoácidos conservados en estos dominios. Básicamente, estos aminoácidos conservados se concentran en dos subdominios pequeños llamados RNP-1 (octámero)

y un RNP-2 (hexámero). Cada uno de estos dominios, consiste en 4 láminas beta antiparalelas y 2 alfa hélices, en la secuencia $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$. Diversos estudios indican que en la estructura plegada, las dos alfa hélices están a un lado de la lámina beta, con los dos segmentos RNP-1 y RNP-2 adyacentes a las láminas beta 3 y 4. Se cree que un centro o "core" hidrofóbico conservado es responsable de asumir y mantener una estructura terciaria correcta, mientras que los aminoácidos aromáticos de RNP-1 y RNP-2 expuestos hacia el solvente están en contacto con el RNA. Estudios filogenéticos y de alineamientos de secuencias sugieren que el RRM o RDB es un región altamente conservada y cuya diversidad de secuencia se originó a partir de duplicaciones génicas, reteniendo una estructura terciaria común.

El segundo RBD de ASF/SF2 es atípico en el sentido que no se observa gran homología de secuencia entre distintas proteínas, pero su estructura terciaria parece estar conservada con los dominios RBD canónicos. De todas formas, se ha mostrado que en el caso de las proteínas SR con dos dominios RDB, estos se unen al RNA de manera sinérgica.

El último dominio de ASF/SF2 es el dominio que le da el nombre a la familia de proteínas: el dominio RS o SR. Existen varias proteínas de mamíferos y *Drosophila* que tienen un dominio de estas características, con repeticiones consecutivas de dipéptidos serina-arginina (SR). No todas las proteínas SR poseen largas repeticiones consecutivas de dicho dipéptido y existen especulaciones sobre las necesidades estructurales y eléctricas del dominio. Estudios exhaustivos realizados principalmente en el laboratorio de Adrián Krainer, por Javier Cáceres, mostraron que la actividad en ensayos de splicing constitutivo requieren que el dominio RBD N-terminal (canónico) y el dominio SR estén intactos, mientras que, sorprendentemente, el dominio SR parece no ser indispensable para la actividad de splicing alternativo, in vitro.

El requerimiento de un dominio SR intacto en el splicing constitutivo parece ser muy fuerte. Mutantes de ASF/SF2 en las cuales las serinas del dominio SR han sido mutadas con el aminoácido conservado treonina (T) cambiando el dominio RS a uno RT, o bien en lugar de mutar las serinas se mutan las argininas a lisinas (K) , cambiando dominio RS a uno KS, son inactivas en reacciones de splicing in vitro (Cáceres, 1993).

Finalmente, el descubrimiento de clones de cDNA (tanto en ratones como en humanos), con versiones del mRNA de ASF/SF2 que han sufrido splicing alternativo mediante la utilización de sitios 3' alternativos que eliminaron el dominio SR, indican que ASF/SF2 podría estar siendo regulado a nivel del procesamiento de su propio mensajero (Tacke, 1992). Alternativamente, estas versiones cortas de ASF/SF2 (ASF-2 y ASF-3) podrían codificar para proteínas mas cortas que la versión salvaje con diferente función, aunque no se sabe si estos clones son traducidos a proteínas estables.

4.1.3 SC35.

SC35 fue identificado como un marco abierto de lectura (llamado PR264) en la hebra complementaria a un exón de *c-myb* (Fu, 1990 y 1992; Vellard, 1992). SC35 esta altamente conservado en humanos y otros organismos. Se expresan 3 isoformas del gen, en diferentes momentos del desarrollo. A diferencia de ASF/SF2, SC35 posee sólo un dominio RBD, perteneciendo, por tanto, al subtipo II (ver figura 11) además del dominio SR. A pesar de tener una identidad de secuencia de solo un 31% con ASF/SF2, ambas proteínas tienen una actividad muy similar, in vitro. Además de promover la elección del sitio 5' en reacciones de splicing alternativo como ASF/SF2, ambas

proteínas pueden modular la elección de sitio de splicing alternativo 3', in vitro. Asimismo, extractos nucleares de células HeLa que han sido depletados de SC35 con anticuerpos monoclonales pueden ser complementados con el agregado de ASF/SF2 (Fu, 1992).

A medida que nuevas proteínas conservadas fueron identificadas en diferentes especies, como *Drosophila* (dSRp55 o B52) o ratón (X16), ambas con alta homología de secuencia y estructural con ASF/SF2 y SC35, se hizo evidente la amplitud de la familia de proteínas SR.

4.1.4 Rol de las proteínas SR en splicing constitutivo y alternativo.

Como dijimos, la familia de proteínas SR puede dividirse en dos subgrupos, de acuerdo a la presencia de uno o dos dominios de unión a RNA (RBD o RRM). El largo de los dominios RS, y por lo tanto el número de repeticiones RS, en el extremo C-terminal es variable en miembros de ambos subgrupos. Los miembros del subgrupo I, que incluye entre otros a SRp30a (ASF/SF2), SRp40, SRp55 y SRp75 tienen dos RBDs (el primero muy conservado y el segundo atípico) mientras que los miembros del subgrupo II, que incluye entre otros a SRp20 (X16, RBP1), 9G8, y SRp30b (SC35) solo tienen el primero y más convencional de los RBDs. En primer lugar, se había especulado que la presencia de uno o dos RBDs podía modular la especificidad de estos factores, aunque se vio que ASF/SF2 y SC35 se comportaban muy similarmente en reacciones de splicing alternativo y constitutivo in vitro. El alto grado de conservación filogenética de las proteínas SR de tamaño similar en todos los metazoarios, sugiere que cada proteína cumple una función específica en la regulación del splicing alternativo. Cada miembro de esta familia ha sido probado en reacciones de splicing alternativo y constitutivo.

Cuando SRp20, SRp30a, SRp30b (SC35), SRp40, SRp55 y SRp75 purificadas de células HeLa fueron incubadas con extractos de células HeLa que poseen todos los componentes requeridos para el splicing, excepto las proteínas SR, cada una de las proteínas SR pudo complementar la falta de las otras en reacciones de splicing con los pre-mRNA de β -globina y *fushi tarazu (ftz)* de *Drosophila* (Zahler, 1992). En cambio, cuando las mismas proteínas fueron ensayadas en reacciones de splicing alternativo varias diferencias pudieron observarse.

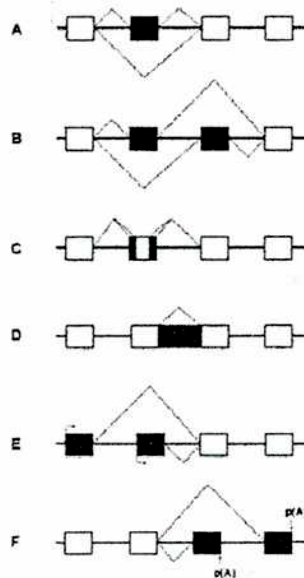


Figura 13. Diferentes tipos de splicing alternativo. Se muestran los diferentes tipos de splicing alternativo descriptos. Se muestran a modo ilustrativo de la complejidad que puede alcanzar el mecanismo. En esta Tesis, se utilizó un ensayo (ver Resultados) que se basa en el modelo A. Los distintos modelos son: A, Inclusión/Exclusión de un exón. B, Exones mutuamente excluyentes. C, Sitios 5' y/o 3' competidores. D, Inclusión/Exclusión de un intrón. E, Promotores alternativos. F, Sitios de poliadenilación alternativos. No se detallarán los casos aquí descriptos. Esquema tomado del libro "Eukaryotic mRNA Processing" (1997, Krainer, A.R. ed.).

Por ejemplo, SRp30b (SC35) promueve el uso exclusivo de sitio 5' proximal en el pre-mRNA de E1A in vitro, mientras que SRp40, 55 y 75 no mostraron preferencias entre sitios 5' distales y proximales en este mismo templado. En el templado de SV40, SC35 mostró la misma preferencia por el sitio proximal, mientras que SRp40, 55 y 75 lo hicieron por el distal. Por lo tanto, estos experimentos mostraron que diferentes

proteínas SR tenían actividades específicas diferentes en la regulación del splicing alternativo. Diferencias en la especificidad de sustrato pudieron observarse en experimentos *in vivo*, mediante la co-transfección de plásmidos de expresión de distintas proteínas SR y diferentes templados, para splicing alternativo.

Otros experimentos han mostrado que proteínas SR pueden comprometer individualmente y de manera diferencial un determinado templado de pre-mRNA a ser procesado. El complejo de compromiso (commitment complex, ver figuras 10 y 12), es el primer complejo que se forma en la reacción de splicing y que no puede ser competido con el agregado de templado frío. Los experimentos consistían en preincubar proteínas SR individuales con distintos templados y agregar extractos de splicing con concentraciones crecientes de RNA competidor. Al usar el pre-mRNA de β -globina, un RNA competidor conteniendo un sitio de splicing 5' inhibió el splicing de todas las proteínas SR probadas, excepto SC35 y en menor medida, ASF/SF2 y SRp55. SRp20 no mostró capacidad de comprometer el procesamiento del templado. En cambio, cuando se utilizó el pre-mRNA de HIV, *tat*, solo ASF/SF2 fue capaz de comprometer su procesamiento, al preincubarlos. Estos experimentos, mostraron que diferentes proteínas SR eran capaces de comprometer distintos templados con diferente capacidad. Esto, sugirió que en diferentes tejidos donde se expresan proteínas SR determinadas, la actividad de splicing alternativo podía jugar un rol crítico en la regulación de la expresión de diferentes pre-mRNA.

Además, estos experimentos sugieren que las proteínas SR están involucradas en los primeros pasos de la reacción de splicing. Además existe una importante evidencia sobre la asociación de de las proteínas SR entre sí para formar complejos protéicos en extractos de splicing. Esto surgió al comprobarse que en la inmunoprecipitación de SC35 o 9G8 co-precipitaba otras proteínas SR, aunque debido a la alta homología entre

miembros de la familia no podía descartarse una reactividad cruzada de los anticuerpos. Una hipótesis interesante que surge a partir de esta observación de la interacción entre proteínas SR, mediante el uso de los extractos S100. Estos extractos son incompetentes en splicing, debido a la falta de proteínas SR, o mejor dicho a la presencia limitante de estas, ya que pueden ser detectadas en mínimas cantidades. El agregado de una sola proteína SR en cantidades suficientes a la fracción S100, restituye la capacidad de formar un complejo activo.

4.1.5 Las proteínas hnRNP A/B antagonizan la actividad de las proteínas SR en el splicing alternativo.

La existencia de factores antagonistas a las proteínas SR ilustra uno de los posibles mecanismos de regulación de su actividad. En extractos de células HeLa existe una actividad que promueve la utilización de un sitio de splicing 5' distal cuando existen dos sitios competidores, mientras que ASF/SF2 promueve la utilización del sitio proximal. Este factor ha sido identificado como hnRNP A1 (Mayeda, 1992). La utilización del sitio distal no es dependiente de secuencias presentes en cada sitio, sino simplemente de su posición relativa. Por lo tanto, las actividades balanceadas de ASF/SF2 y hnRNP A1 parecen regular la actividad de splicing alternativo in vitro. hnRNP A1 posee dos RBDs y un dominio C-terminal rico en glicinas, y no es capaz de inhibir la actividad de ASF/SF2 en ensayos de splicing constitutivo in vitro.

4.1.6 Mecanismos de acción de las proteínas SR.

Estudios realizados in vitro con proteínas SR individuales, demostraron que estas proteínas son necesarias para el paso catalítico I del splicing y que cuando no hay

proteínas SR, el ensamblado del spliceosoma se bloquea en estadios tempranos (Zahler, 1992; Krainer, 1990; Fu, 1990). Además, como dijimos, las proteínas SR pueden modular la elección de los sitios de splicing alternativo en una variedad de templados (Zahler, 1992; Krainer, 1990bis; Fu, 1993; Cavaloc, 1994; Sreaton, 1995; Kim, 1993; Mayeda, 1992). Mas recientemente, y como se verá mas adelante, se ha mostrado que las proteínas SR están implicadas en el reconocimiento de elementos enhancer de splicing, ricos en purina.

No se sabe con certeza que tipo de interacciones entre distintos dominios están involucradas en cada una de estas funciones. Krainer ha planteado, inclusive, la posibilidad de que existan dominios crípticos (Zhu, 2000, Hastings, 2001), además de los de unión al RNA y el RS. De esta forma, ciertas proteínas SR podrían tener dominios adicionales que expliquen la especificidad de su función. Ningún dominio de este tipo ha sido descrito en ninguna proteína de la familia, hasta la fecha. La figura 11 muestra un resumen de las interacciones de las proteínas SR y diferentes tipos de templados y factores.

4.1.7 Interacciones proteína-proteína mediadas por los dominios RS.

Se ha demostrado que existen interacciones entre los sitios 5' y 3' de splicing en los primeras etapas de la reacción de splicing. Esto sugiere que los componentes unidos a ambos sitios interactúan ya sea directamente, o bien indirectamente. Esta interacción entre sitios se establece durante las primeras etapas (complejo pre-spliceosomal E), en las que se produce el compromiso del templado para ser procesado (figura 10). Debido a que las proteínas SR modulan la elección del sitio 5' de splicing y son requeridas para las primeras etapas de la reacción, se pensó que podían ser buenos candidatos para

mediar la interacción entre los sitios 5' y 3'. Luego se obtuvo evidencia de que realmente estas proteínas están involucradas en la interacción de los sitios. Particularmente, en ensayos de protección a la RNasa T1 e inmunoprecipitación, se vió que SC35 mediaba interacciones a nivel del complejo pre-spliceosomal con las partículas U1 y U2 snRNP, en el sitio 3' del splicing (Fu, 1992).

Existen muchas técnicas utilizadas para el estudio de los factores unidos a los sitios 5' y 3', como el far-western o la co-inmunoprecipitación. Por ejemplo, en ensayos de far-western, se vió que U1-70K, una proteína específica de U1 snRNP, interactuaba con un subconjunto de proteínas SR (Kohtz 1994; Wu, 1993; Amrein, 1994; Ismaili, 2000). Además, SC35 interactúa consigo mismo, con ASF/SF2, y con los reguladores de splicing de *Drosophila* Tra y Tra-2. Todas estas proteínas comparten una característica común: el dominio RS, y cuando el dominio RS se deletiona en cualquiera de ellas, se pierde la interacción. Una característica sobresaliente de este dominio, es el extenso nivel de fosforilación en las serinas (ver mas adelante) parece jugar un rol fundamental en esta interacción. En primer lugar, mutantes no fosforilables son inactivas en splicing y no interactúan con otras proteínas; en segundo lugar, la carga electrostática de los dominios RS no fosforilados impediría la interacción debido a la gran cantidad de residuos de arginina cargados positivamente. La fosforilación de serinas compensaría la carga positiva de las argininas. Finalmente, la gran homología a nivel de secuencia en los dominios RS de proteínas SR particulares (100% de homología entre ASF/SF2 de humanos y ratón, por ejemplo) sugiere que algunas de las interacciones deberían ser muy específicas.

4.1.8 Las proteínas SR y U1 snRNP se unen cooperativamente a los sitios 5' de splicing.

La unión de snRNP U1 al sitio 5' requiere la presencia de otros factores en el extracto. Cuando se analizó la formación de complejos en el sitio 5' y la estabilidad de estos, en presencia o ausencia de ASF/SF2 (Kohtz, 1994), se vió que la presencia de proteínas SR estabiliza y favorece la formación de los complejos. Además, el orden en el que se agregaron los diferentes factores a la reacción, influyó en la formación de los complejos. Cuando ASF/SF2 se pre-incubó con el templado y U1 se agregó posteriormente, la formación de los complejos fue mucho mas eficiente que cuando se hizo a la inversa. Esto sugiere que ASF/SF2 se une al templado y luego recluta a U1. Asimismo, otros experimentos muestran que ASF/SF2 puede unirse al sitio 5' y hasta puede prescindir a U1 snRNP.

4.1.9 Proteínas SR y enhancers de splicing exónicos (ESE).

Algunos pre-mRNAs de metazoos contienen secuencias específicas en determinados exones que influyen la inclusión de dicho exón, gracias a la unión de factores en trans (Reed, 1986; Furdon, 1988). Se han descrito también elementos inhibidores, pero estos elementos unen otros factores, como hnRNP A1.

Existen una variedad de pre-mRNAs descritos que contienen ESEs. No son muy numerosos, pero suficientes para que la información que se tiene permita definir un mecanismo de acción común. En esta breve reseña, no detallaremos cada uno de esos casos. Solo analizaremos un caso particular de interés para esta Tesis (ver Resultados). Es el caso del pre-mRNA de fibronectina, que contiene una secuencia de 81 nt en el

centro del exón alternativo EDI (también llamado EIIIA) (Mardon, 1987; Laviguer, 1993; ver figura 30, Parte I), necesaria para que el exón sea incluido. Una secuencia rica en purinas (GAAGAAGA) llamada "elemento A" resultó necesaria para la inclusión del exón EDI, ya que favorece el uso del sitio 3' en dicho exón. Interesantemente, cuando el ESE se mueve mas allá de 291 nucleótidos río abajo del sitio de splicing, deja de funcionar como tal (Laviguer, 1993). Se cree que las proteínas SR son las responsables del reconocimiento del ESE, ya que se unen directamente a estas secuencias en ensayos de retardo en gel. Asimismo, en ensayos de splicing in vivo, la eliminación del elemento A del ESE, impide la inclusión del exón, mediado por distintas proteínas SR (ver resultados Parte I).

4.1.10 Regulación de la expresión y actividad de las proteínas SR.

La regulación de la actividad de las proteínas SR resulta crucial para el correcto funcionamiento normal de un célula. Los efectos antagónicos de las proteínas SR y las proteínas hnRNP A/B regulan la actividad de splicing alternativo. Esto permite especular que la regulación de la actividad de las proteínas SR, la expresión de sus genes, o combinaciones de genes en momentos específicos del desarrollo, en respuesta a estados metabólicos particulares es crucial para regular la actividad de las proteínas SR. En este punto desarrollaremos algunos puntos particulares y potenciales de regulación de la actividad de las proteínas SR. No se descartan otras formas de regulación de la actividad de estas proteínas, que seguramente engrosarán futuros análisis de las proteínas SR.

4.1.11 Relación proteínas SR/hnRNP variable.

En animales multicelulares, la expresión de proteínas SR está regulada en el espacio y el tiempo. Diferentes tejidos expresan diferentes proteínas SR en diferentes momentos de su desarrollo. Lo mismo ocurre con factores antagónicos como hnRNP A1 o B. La resultante de esto es un delicado equilibrio entre factores activadores e inhibidores del splicing en diferentes tejidos, que regula la actividad de splicing. La primera evidencia experimental de que la cantidad de proteínas SR puede modular la capacidad de una célula de incluir o excluir un determinado exón surge de los trabajos de Javier Cáceres, (1994) en los que la transfección de ASF/SF2 en células HeLa cambia el patrón de splicing alternativo de genes reporteros. La expresión de factores antagónicos produce efectos contrarios. Estos resultados demuestran que diferentes relaciones entre proteínas SR y otros factores determinan el destino de distintos pre-mRNAs. Una alternativa muy interesante a la relación entre activadores e inhibidores, es la posibilidad de que las proteínas SR sean "secuestradas" de forma de que la relación entre activadores e inhibidores sea controlada espacialmente. Esta interesante posibilidad fue estudiada por Elliott (2000). Este autor, demuestra que los transcritos tardíos de adenovirus secuestran las proteínas SR en sitios de alta afinidad. Como resultado de esto, las proteínas SR se tornan limitantes y por lo tanto, en el cambio del ciclo de vida del virus de temprano a tardío, el splicing alternativo de los transcritos de E1A cambian hacia sitios 5' distales. Esto es, consistente con un exceso de los factores inhibitorios hnRNP A/B sobre las proteínas SR (Yang, 1994; Cáceres, 1994).

4.1.12 Regulación de la expresión de proteínas SR.

Una de las maneras más triviales de regular la concentración relativa de proteínas SR y hnRNPs es controlando la expresión de sus genes y/o procesamiento de sus respectivos pre-mRNA. En ese sentido, es interesante que los pre-mRNAs de ASF/SF2, 9G8, SC35 y SRp40 sean procesados por splicing alternativo, y que haya isoformas sin el dominio RS. Se desconoce si esos mRNAs dan lugar a proteínas estables o no, in vivo. En ensayos de splicing in vitro, las versiones "alternativas" de ASF/SF2, ASF-2 y ASF-3 recombinantes se comportaron como dominantes negativos en presencia de ASF/SF2 y fueron incapaces de activar el splicing en ausencia de otros factores (Zhuo, 1993).

Por otro lado, análisis de las secuencias promotoras del gen de SC35 revelaron la presencia de varios sitios de reconocimiento del proto-oncogen myb. c-myb reconoce estos sitios, in vitro y por lo tanto puede transactivar la transcripción de SC35. Este es el primer ejemplo de una regulación de la expresión de una proteína SR por un proto oncogen. c-myb es expresado preferentemente en células hematopoyéticas inmaduras, y luego de la diferenciación, deja de expresarse (Sureau, 1994). Asimismo, la expresión de SC35 disminuye luego de la diferenciación. Por otro lado, existen otros ejemplos de regulación de la expresión de proteínas SR en respuesta a señales extracelulares, como la expresión de SRp20 luego del agregado de suero (Ayane, 1991), o la de SRp40, regulada por insulina (Diamond, 1993).

4.1.13 Fosforilación de proteínas SR.

Todas las proteínas SR están fosforiladas in vivo (Colwill, 1996 y 1996bis; Gui, 1994 y 1994bis), como lo demuestra el hecho de que sean reconocidas por el anticuerpo monoclonal mAb104 (Roth, 1991), que reconoce un fosfoepitope común a todas las proteínas SR conocidas hasta la fecha, con una sola excepción (ver Resultados Parte II).

Se cree que la naturaleza extremadamente básica del dominio RS, debido a la gran cantidad de argininas, puede interactuar con el esqueleto de fosfatos del RNA, y que mediante la fosforilación de las serinas del dominio, se modula la carga total del mismo y por lo tanto su capacidad y/o la especificidad para interactuar con otras proteínas o con el RNA (Cáceres, 1993; Sanford, 1999; Xiao, 1998). Existen varias evidencias en este sentido. Estudios realizados por Jayendra Prasad en el laboratorio de James Manley mostraron que ASF/SF2 posee tres estados de fosforilación, y que las versiones hipo e hiperfosforiladas son inactivas en splicing (Prasad, 1999). Esto sugiere un mecanismo de regulación de la actividad por modulación del estado de fosforilación de las serinas del dominio RS. La idea de este tipo de regulación se basa en ciclos de fosforilación-defosforilación.

Otros estudios mostraron que la fosforilación es crítica para el ensamblado del spliceosoma mientras que fosfatasa de serina y treonina son necesarias para ambos pasos catalíticos de la reacción de splicing pero no para el ensamblado del spliceosoma (Cao, 1997; Mermoud, 1994).

Hasta la fecha solo han sido descritas cuatro familias de quinasas de proteínas con capacidad de fosforilar específicamente las proteínas SR, tanto in vivo como in vitro (Colwill, 1996 y 1996bis; Gui, 1994 y 1994bis; Papoutsopoulou, 1999; Rossi, 1996;

Wang, 1998; Woppmann, 1993). Estas familias de proteínas están integradas por: las quinasas específicas de proteínas SR, o SRPKs, las quinasas Cdc28/Cdc-2-like, o Clk/Sty, el receptor de lámina B, o LBRK y la DNA Topoisomerasa I. Las dos primeras familias son las más estudiadas hasta la fecha.

Las SRPKs constituyen una familia de quinasas de proteínas altamente conservadas tanto a nivel de secuencia como de función. Estas quinasas regulan el estatus de fosforilación de las proteínas SR a lo largo del ciclo celular y, al ser agregadas a ensayos de splicing in vitro, inhiben la formación de mRNA maduros, presumiblemente a causa de la hiperfosforilación de las proteínas SR (Gui, 1994 y 1994bis). También provocan la redistribución de las proteínas SR desde sus reservorios subnucleares, llamados "*speckles*", alterando el patrón punteado o de "pecas" a uno más difuso cuando son introducidas en células permeabilizadas (Gui, 1994; Mermoud, 1992 y 1994; Misteli, 1996 y 1997). Estas proteínas están localizadas mayormente en el citoplasma y en menores cantidades en el núcleo (Fukuda, 1997; Takeuchi, 1993; Siebel, 1999). Esta localización podría reflejar un mecanismo de control de la actividad de estas quinasas, regulando la concentración nuclear de la misma, por ejemplo, o alternativamente puede indicar otra función, como la de refosforilar las proteínas SR que han migrado al citoplasma. Esta última característica parece ser común a muchas de ellas, ya que se las ha relacionado con el transporte de RNA y como un mecanismo de auto-regulación. Esta hipótesis está reforzada por el descubrimiento de un receptor para proteínas SR fosforiladas involucrado en la importación o reimportación nuclear de las proteínas SR (Kataoka, 1999; Lai, 2000 y 2001).

Las Clk/Sty constituyen otra familia de proteínas quinasa que interactúan directamente y modulan la actividad de proteínas SR (Duncan 1997; Prasad, 1999). También, las

Introducción

proteínas de esta familia tienen la capacidad de modular la actividad de splicing alternativo al ser co-transfectadas con genes reporteros.

RESULTADOS

PARTE I: TcSR

1. Introducción.

Los trabajos de nuestro laboratorio previos a esta tesis, describieron una proteína en *Trypanosoma cruzi*, llamada PZFP (Poly Zinc Finger Protein), con la capacidad de unirse a RNA o DNA simple cadena, de manera específica (Espinosa, Tesis Doctoral). Utilizando a PZFP como señuelo, se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras. Se obtuvieron 35 clones positivos que fueron separados en grupos de homología. Uno de los grupos, el de mayor número de clones independientes, correspondía a un marco abierto de lectura de aproximadamente 657 pares de bases. Al estudiar ese putativo gen, se vió que a pesar de contener un posible codón de iniciación, no contenía ningún codón STOP. Además, los únicos dominios reconocidos al traducir teóricamente dicho marco abierto de lectura (ORF), eran dos dominios de unión a RNA, del tipo RNP (Bimey, 1993). Este resultado era lógico en alguna medida, teniendo en cuenta las características del experimento realizado con una proteína de unión a ácidos nucleicos, como PZFP. La tesis del Dr. Joaquín Espinosa, concluyó en este punto, sin identificar el gen correspondiente a este ORF.

Por lo tanto, la primera parte de esta tesis, se basará en resultados obtenidos en el estudio de dicho gen. En primer lugar, se analizará la secuencia del gen, seguido de los ensayos bioquímicos y biológicos diseñados para la caracterización de la proteína. En Materiales y Métodos se encuentra una versión detallada de la estrategia de clonado del gen *tcsr*.

2. Clonado de *tcsr*.

La figura 14 muestra la secuencia completa del gen *tcsr* con parte de las regiones 5' y 3' no traducidas o UTRs (Untranslated Regions). La traducción teórica del marco abierto de lectura, sugería que se estaba en presencia de una proteína de aproximadamente 29 KDa, de la familia de las proteínas SR, que cuentan entre sus principales características, uno o dos, en nuestro caso dos, dominios de unión a RNA, llamados RBD 1 y 2 (RNA Binding Domain) o RRM (RNA Recognition Motif) del tipo RPN (Birney, 1993), y un dominio carboxi-terminal llamado RS, rico en dipéptidos arginina (R) y serina (S), que le da el nombre a la familia.

```

ATTGATACTCATTTTTTTTGGGGAAGTGAACAACGACGTACGCACATCAGAAACAGGGATGCTGAGTCCAGAAGTGGTGACA
GCGTCGAGGAGCCACCCCGCACCAACAGCCATGAGAAGAACAATAACAATAATAACAACAACACTGCTAGCACCGCTACG
001 atg aaa aca acg tcc gtt ttt att gga ctc ggc cct gcg gcc tcc agc att tcc gac gat
001 M K T T S V F I G L G P A A S S I S D D

061 gca cta cgt cag cgc ctt gaa gag gtg gcg cct gtg ctt ggc gtg cgc atc cgt ggt cgt
021 A L R Q R L E E V A P V L G V R I R G R

121 tgc gcc ttt aac gac gtg cct gac ccg gag act agc gaa aga ctt gtg gcg gag ttg gac
041 C A F A D V P D P E T A E R L V A E L D

181 ggt aaa cct att ggt gat gca cgc atg gcg gtg cag atc agc cgc aat aaa gat aag cag
061 G K L I G D A R M A V Q I S R N K D K Q

241 cgt ccc ccc ggt aat caa aat cat aac aac aat ttg aat aac tct ggg agg acg tog ctt
081 R P P G N Q N H N N N L N N S G R T S L

301 ttt gtc ggt ttg ggt cca gcc ggc ggt gcc atc tcc gac aga gag ctt cgc agc aaa ctg
101 F V G L G P A G G A I S D R E L R S K L

361 gag gag att gca ccg gtt acc gga ttt cgg cga cgc ggg caa tgc gcg ttt atc gac gtg
121 E E I A P V T G F R R R G Q C A F I D V

421 gcg gat atg gcg cac gca tcg aga atg att cat gaa ctt aat aat cag tac att ggt gat
141 A D M A H A S R M I H E L N N Q Y I G D

481 tgc cgt ctt tct gtt cag tac agt cgt gat aac aag agt tct cgc ttt ggt ggc cgt atg
161 C R L S V Q Y S R D N K S S R F G G R M

541 gag aag cgt agc cgc agc ccg gtc cgt cgt cgt cgt cgg caa cgt agt cgt agg agt gat
181 E K R S R S P V R R R R R Q R S R R S D

601 agc ctt gat cgc cgc cgt tat cgt cga cgc aga agt tac agt tac agc agt cgc tct agc
201 S L D R R R Y R R R R S Y S Y S S R S S

661 tcc agc cgc aga agc agt gtg gac tcc gat gac agc cgt gaa tac cgt cga cgg gac aga
221 S S R R S S V D S D D S R E Y R R R D R

721 cgg gac aaa cga cgc cgg gag cgc agc cgc agt tat agt agt cga tcg tga 771
241 R D K R R R E R S R S Y S S R S * 256
TCGAGCAGTCCATCTTATCGCAGGCGTCTGATTAAACGGTAAACACGCACAAACACAAAATGAAAAAAGGGGGTAAAA
TGGCAGGCGATGAACAACGGGCATGCGAAGATTTAAGAGGACTTGACAGCGGCACGATGGTGTGTTTGTGTGTATGTGTG
GGTGAATTTAACAGATTAACCAAGAAGAAGAAGAACAACACCNCTATGTGGCACTCGTCCCA

```

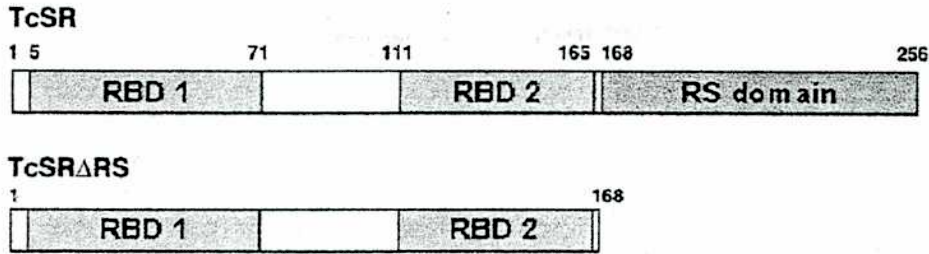


Figura 14. Secuencia nucleotídica de *tcsr* (panel superior). La secuencia de nucleótidos de *tcsr* con su traducción teórica indican que TcSR contiene dos dominios de unión a RNA y un dominio rico en dipéptidos RS. Estructura de TcSR salvaje y la mutante TcSRΔRS sin el dominio RS (panel inferior). El panel inferior muestra un esquema de la estructura de la proteína y una mutante utilizada en ensayos de splicing.

Las búsquedas en bases de datos no arrojaron homologías demasiado fuertes con otras proteínas SR en un principio, pero luego de un año, apareció un trabajo publicado por el laboratorio de Etienne Pays (Ismaili, 1999) en el cual se caracterizaba una proteína SR de *Trypanosoma brucei*, llamada TSR1. Si bien la evidencia experimental no favorece la hipótesis de que ambas proteínas SR sean homólogas funcionales (ver Discusión), la homología a nivel de secuencia primaria era mas fuerte entre TSR1 y TcSR, que entre TcSR y cualquier otra proteínas SR de metazoarios y por esta razón se la muestra en la figura 15.

		* * *		* * * *		* * *
TcSR	1	MKTTSVFIGLGPAASSISDDALRQRLEEVAPVLGVRIRGRCAFADVPDPETAERLVAELDG				61
TSR1	1	MDSRDGSGSDNPEVVSLYIGLGPAASTISKEQLWERLEQVAPVSDVVRIRGRCAFVDVAGPEADRLLITEMDG				72
		RBD1				
TcSR	62	KLIGDARMAVQISR-----NKDKQRPP-----GNQNHNNNLNNS--GRTSLFVGLGP			* * *	106
TSR1	73	KYIGEARMVVQHRSRGSNREGERDRDRERERERERGRHRERGRGAPFDGRGADYGGYNNSAGGGTALFVGLGP				144
		RBD2				
TcSR	107	AGGAIISDRELRSKLEETAPVTGFRRRGQCAFIDVADMAHASRMIHELNNQYIGDCRLSVQYSRD-----				170
TSR1	145	SGRSISDRELRSKLEEAAPVIGFRRRGECFVDVPSPAHARRMIEMMHNQYMDCRLSVQYSREGTRGLDDV				216
		Dominio SR				
TcSR	171	-----NKSSRFGGRMKRSRSPVRRRRRQRSSRSDSLDRRRYRRR-RSYS-YSSRSSSSRRSSVD				228
TSR1	217	DRPRRRRRSRGRRRRSRNRNRNRSSRSRSRSHRSNSRGRRRTRNRSRSGSPVSSRSSYSRRSSEA				288
		Dominio SR				
TcSR	229	SDDSRVRRDRDRDKRRRERSRSYSRS.				256
TSR1	289	SAGSRGYKKRDR---RRRERSRSASSGSRSGSENYRKRDR.				325

Figura 15. Comparación de la secuencia aminoacídica de TcSR y TSR1 de *Trypanosoma brucei*. No consideramos que ambas proteínas sean homólogas (ver texto), aunque la similitud de secuencia sea relativamente alta (61.2% de identidad). Números de acceso de las proteínas: TcSR, AF204399; TSR1, CAB52245.

3. Expresión de TcSR.

Los primers utilizados para clonar el gen completo de *tcsr*, llevaban los adaptadores para la inserción del producto de la PCR en el vector de expresión pET19b (ver Materiales y Métodos). Se transformaron bacterias BL21Lys(DE3), se indujo la expresión de TcSR con el agregado de iso-propil-tio-galactósido (IPTG) y se comprobó que se inducía una proteína en la fracción insoluble o cuerpos de inclusión, ver figura 16. Luego de purificar estos cuerpos de inclusión, se procedió a unir la proteína recombinante a la resina de nickel-agarosa para purificar la proteína expresada con un "Tag" de histidinas. Como se ve en la figura 17 (panel izquierdo), una proteína del peso esperado se eluye a pH 4, sugiriendo que se trataba efectivamente de TcSR. Para confirmar que esta proteína fuera la proteína recombinante, se la transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hizo un Western blot, utilizando un anticuerpo anti el "tag" de histidinas. La figura 17 (panel derecho) muestra el resultado de este ensayo, confirmando que la proteína expresada y purificada era la recombinante.

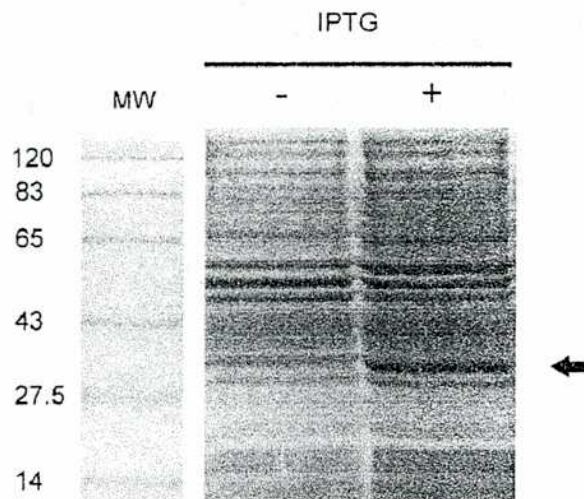


Figura 16. La cepa de *E. coli* BL21Lys(DE3) induce un polipéptido de tamaño esperado para TcSR. Se muestra un SDS-PAGE 12% de un extracto total de células inducidas o no (+ o -) con IPTG por 3 hs. La flecha muestra la banda inducida. A la izquierda se indican los tamaños de los marcadores de pesos molecular.

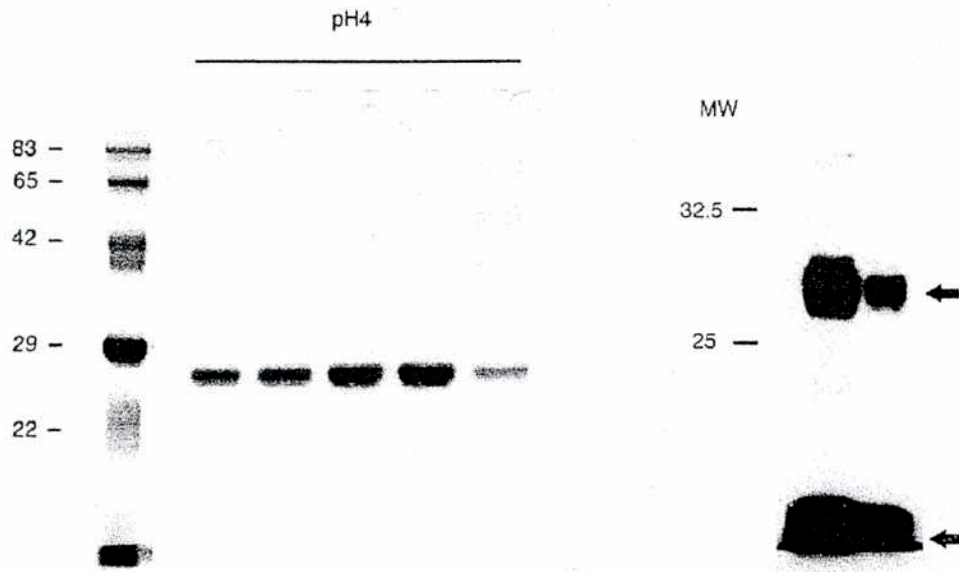


Figura 17. Confirmación de la expresión de TcSR. El panel de la izquierda muestra un gel SDS-PAGE 12% con distintas fracciones de la columna de purificación de TcSR en condiciones desnaturalizantes. El panel de la derecha, muestra un ensayo de Western blot (Ab anti Tag His6x) realizado con la proteína recombinante (expresada con el Tag). Se ve claramente que existe degradación de TcSR (parte inferior del gel).

4. Ensayos de fosforilación in vitro.

Luego de renaturalizar la proteína, mediante diálisis para eliminar el isotiocianato de guanidina que sirvió para purificar la proteína recombinante, se intentó utilizarla como sustrato en un ensayo de fosforilación. Las proteínas SR son intensamente fosforiladas in vivo, como se indicó en Introducción, y por esta razón era crucial analizar su capacidad para ser fosforilada. Como proteína quinasa, se utilizaron: la proteína quinasa específica de proteínas SR humana de tipo 1 (hSRPK1) (gentilmente donada por el Dr. Giannakouros, de la Universidad Aristotélica de Thessaloniki, en Grecia), la proteína quinasa específica de proteínas SR de *Trypanosoma cruzi* (TcSRPK) y la de *Trypanosoma brucei* (TbSRPK), que serán el eje central de la Parte II de esta Tesis, y que cronológicamente habíamos terminando de clonar en aquel momento.

Como puede verse claramente en la figura 18, las tres proteínas quinasa pudieron fosforilar eficientemente a TcSR. Nótese la diferencia en el grado de fosforilación. La proteína quinasa de humanos (hSRPK1) y de *T. cruzi* (TcSRPK) fosforilaron mas eficientemente a TcSR, que TbSRPK. Si bien la homología entre TcSRPK y TbSRPK es muy alta, por razones que no pudimos determinar TbSRPK se expresa en mucho menor medida en *E. coli*, y resultó menos activa in vitro y en algunos ensayos in vivo (ver Parte II).

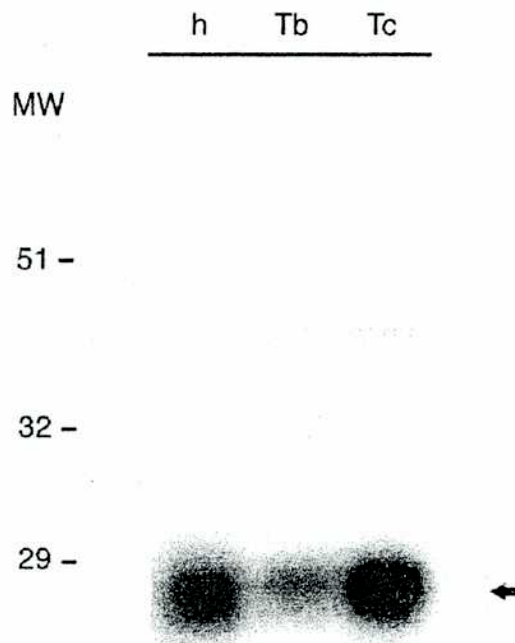


Figura 18. TcSR recombinante expresada en *E coli* y purificada por afinidad, es sustrato de proteínas quinasa específicas in vitro. Las tres proteínas quinasa (dos de Trypanosomátidos) pudieron fosforilar a TcSR in vitro. Las condiciones del ensayo se detallan en Materiales y Métodos. h, proteína quinasa de SR (SRPK) de humanos, del tipo 1 (hSRPK1); Tb SRPK de *Trypanosoma brucei* (TbSRPK); Tc, TcSRPK de *Trypanosoma cruzi* (TcSRPK). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular

Interesantemente, existe un trabajo publicado por el laboratorio de Hagiwara (Okamoto, 1998) en el que se muestra que las proteínas SR, en particular ASF/SF2 pueden ser fosforiladas por quinasas dependientes de ciclinas del tipo cdc2. No queda clara la implicancia fisiológica de dicha interacción, aunque la regulación de la fosforilación

dependiente del ciclo celular de las proteínas SR (Gui, 1994) parece involucrar definitivamente a las quinasas de proteínas SR y regular su actividad. El hecho de que las proteínas SR sean reguladas por fosforilación de las serinas en el dominio RS, deja abierta la posibilidad de que la proteína homóloga existente en *Trypanosoma cruzi* pueda fosforilar a TcSR. Afortunadamente para nuestros intereses, Eliana Gómez y María Isabel Santori, del laboratorio de la Dra. Téllez-Iñón clonaron y caracterizaron varias proteínas quinasas dependientes de ciclinas, en *Trypanosoma cruzi*. (Gómez, 2001; Santori, 2002). Pudimos contar con TcCRK una quinasa dependiente de ciclinas (cdc2-like) recombinante, para ensayar con TcSR como sustrato.

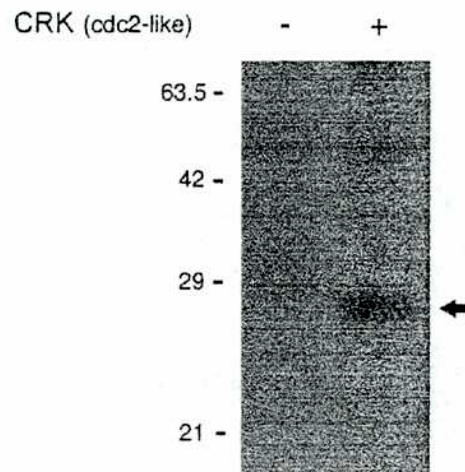


Figura 19. TcSR es fosforilada por TcCRK, una cdc2-like quinasa de *Trypanosoma cruzi*. Ensayo quinasa con TcSR como sustrato (1 µg) y cdc2-like quinasa (50 ng) de *Trypanosoma cruzi* (CRK).

Como muestra la figura 19, TcSR pudo ser fosforilada por esta quinasa de *Trypanosoma cruzi*. Cabe aclarar que en un ensayo quinasa utilizando otras quinasas, como proteína quinasa A (PKA) o caseína quinasa, estas no fosforilaron a TcSR (resultados no mostrados), indicando que la fosforilación de TcSR es bastante específica.

En un intento por caracterizar aún mas la fosforilación de TcSR, deseamos saber si los

fosfatos eran agregados en todo el dominio RS de TcSR. Gracias a una colaboración con Tito Baralle, en el ICGEB, Trieste, sintetizamos péptidos correspondientes a distintas regiones del dominio RS de TcSR. Cabe aclarar, que el dominio RS de TcSR tiene varios motivos que concuerdan con el motivo óptimo de fosforilación por parte de las SRPKs. Según Wang (1998), el motivo ideal para la fosforilación, es: RSR. En la figura 20, se muestran las secuencias de los péptidos utilizados, y las regiones correspondientes dentro del dominio RS. Como control, utilizamos un quinto péptido, en el que en lugar de argininas (R), colocamos alaninas (A). Este control intenta demostrar que la fosforilación de TcSR es realizada por quinasas específicas de RS (ver Parte II). Se ve en la figura 20, que todos los péptidos derivados del dominio RS de TcSR fueron fosforilados indicando que todo el dominio es potencialmente fosforilable, in vivo. Resulta interesante el hecho de que el péptido control, con gran cantidad de serinas blanco, no fuera fosforilado, indicando que las serinas en el dominio RS necesitan el entorno de argininas, ya que la fosforilación es "arginina-dependientes" (ver Parte II).

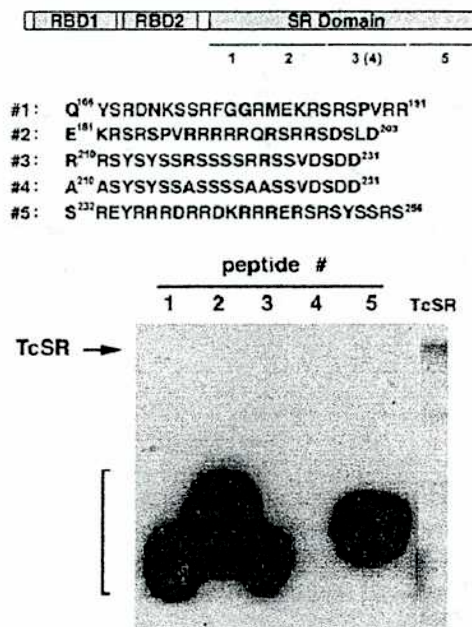


Figura 20. Fosforilación de las distintas regiones del dominio RS de TcSR. Los distintos péptidos sintéticos correspondientes al dominio RS de TcSR se incubaron con TcSRPK in vitro y pudieron ser fosforilados, indicando que potencialmente, todo el dominio puede ser fosforilado.

5. Caracterización genómica del gen *tcsr* y localización celular.

Como se expresó en la Introducción, en el *Trypanosoma cruzi*, la mayoría de los genes descritos hasta el momento, se encuentran como copias múltiples. Sin embargo, existen genes que se encuentran como copias únicas en el genoma, y la idea más aceptada de esta estructura es que permitiría un control más preciso de los niveles de expresión de tal proteína. En un intento por caracterizar la estructura génica de *tcsr*, se realizó un ensayo de Southern blot, con DNA total de parásitos.

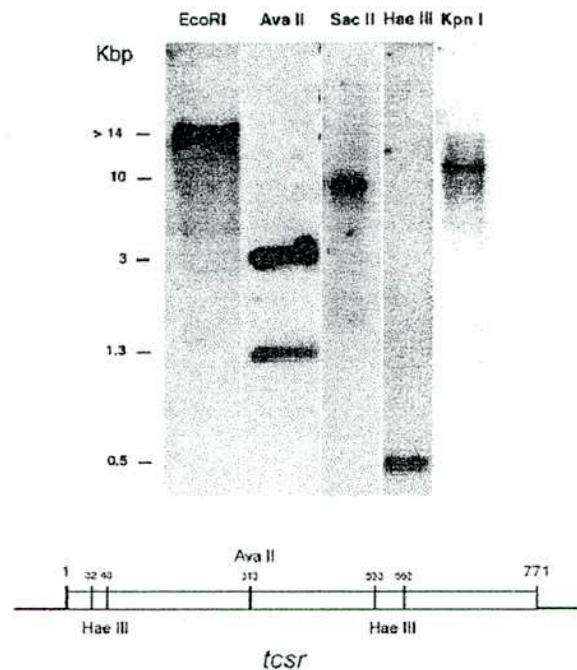


Figura 21. Southern blot. Ensayo de Southern blot con 5 µg de DNA total del parásito y con *tcsr* full length como sonda. Las condiciones del ensayo se indican en Materiales y Métodos. Los sitios de corte de las enzimas se indican en el esquema de la parte inferior.

Los resultados obtenidos en la figura 21, indican que el gen *tcsr* se encuentra como copia única en el genoma de *Trypanosoma cruzi*. La digestión con Hae III arroja una sola banda (0.5 Kbp, calle 4), a pesar de que no se encuentra un sitio Hae III (ggcc) hacia el extremo 3' del gen, al menos hasta 231 pb en la región 3' UTR (no mostrado). Quizás haya habido una digestión parcial del DNA genómico, y en ello resida el hecho

de no poder ver una banda de mayor tamaño, aunque en ese caso, esperaríamos también bandas mas grandes producto de digestiones parciales dentro de la región codificante. La hipótesis mas sencilla es que exista un sitio Hae III río debajo de la región 3' UTR que conocemos, dando en ese caso una banda de aproximadamente 500 pb, ya que la banda presente en el gel es muy clara, indicando que hubo digestión completa dentro del gen *tcsr*. De todas formas, el hecho de que *tcsr* sea un gen de copia única abre la posibilidad de que *tcsr* juegue un rol importante en el metabolismo del parásito. En un intento por estudiar la expresión del gen *tcsr*, realizamos un ensayo de Northern blot, con RNA del estadio epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. Luego de repetir el experimento tres veces, utilizando como sonda el gen completo *tcsr*, no se pudo detectar un RNA mensajero en dicho estadio. Sin embargo, en ensayos de Western blot, con anticuerpos policlonales hechos en ratón contra TcSR recombinante expresada en *E. coli* (figura 22), se detectó una banda del peso molecular esperado para TcSR, en extractos de *Trypanosoma cruzi*.

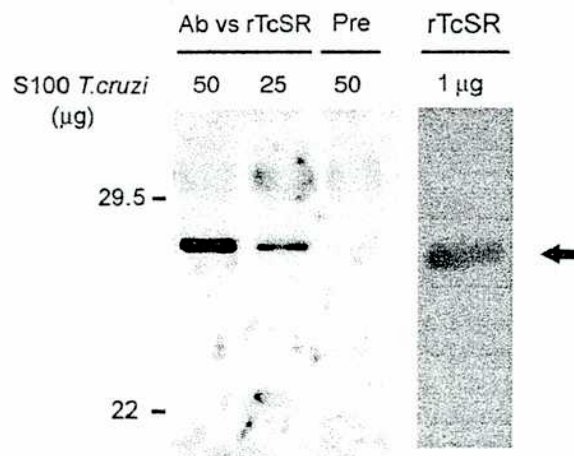


Figura 22. Ensayo de Western blot con anticuerpo policlonales contra TcSR recombinante, en extractos totales clarificados (S100) de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se sembraron los µg indicados de extracto o proteína recombinante purificada. El antisuero reconoce una banda específica de aproximadamente 28 KDa, coincidente con el peso molecular teórico de TcSR, en el extracto de *T. cruzi*, que coincide con la banda correspondiente a la proteína recombinante (rTcSR). El suero preinmune, tomado de los ratones antes de la inoculación de TcSR recombinante para la producción del anticuerpo no reconoce ninguna banda en el extracto de *T. cruzi*. Ver condiciones en Materiales y Métodos.

Esto indica que TcSR está presente en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. No

podemos asegurar la causa de que el Northern blot haya dado negativo, quizás la expresión de TcSR sea muy baja. Posiblemente ensayos de RT-PCR puedan terminar con esta duda.

La siguiente pregunta que nos propusimos investigar fue: ¿acaso TcSR se localiza en el núcleo de la célula? Estudiar la localización subcelular de TcSR no es trivial ni superficial, ya que la localización de las proteínas SR es de vital importancia para su actividad. Como se indicó en la Introducción, existen reservorios intranucleares de proteínas SR, llamados "*speckles*" (pecas) por el patrón parecido a pecas que se observa en inmunofluorescencias. Es de destacar, que otras proteínas SR, como Npl3 (Gilbert, 2001), son transportadas activamente dentro y fuera del núcleo en lo que se sospecha es un rol en el transporte de mRNA o quizás una forma de regulación de su actividad.

En función de estas diferencias, investigamos la localización de TcSR, en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. La figura 23 muestra que TcSR se expresa muy mayoritariamente en el citoplasma de epimastigotes. Si bien sería poco prudente afirmar con certeza, que existe expresión en el núcleo, la calidad de la fotografía no permite una conclusión con respecto a este punto.

En un intento por dilucidar el tema de la supuesta localización nuclear de TcSR, realizamos una microscopía confocal. Aclaramos que la calidad de las fotografías no es óptima, ya que dificultades operativas así lo determinaron. Además, el fluoróforo utilizado, isotiocianato de fluoresceína (FITC), no permite realizar fotografías de alta calidad, debido a que el láser lo destruye rápidamente. De todas formas, la secuencia de fotos tomadas a planos consecutivos de 1 μm de profundidad uno del otro (figura 24), permiten sostener la hipótesis de una localización citoplasmática con una mas débil localización nuclear.

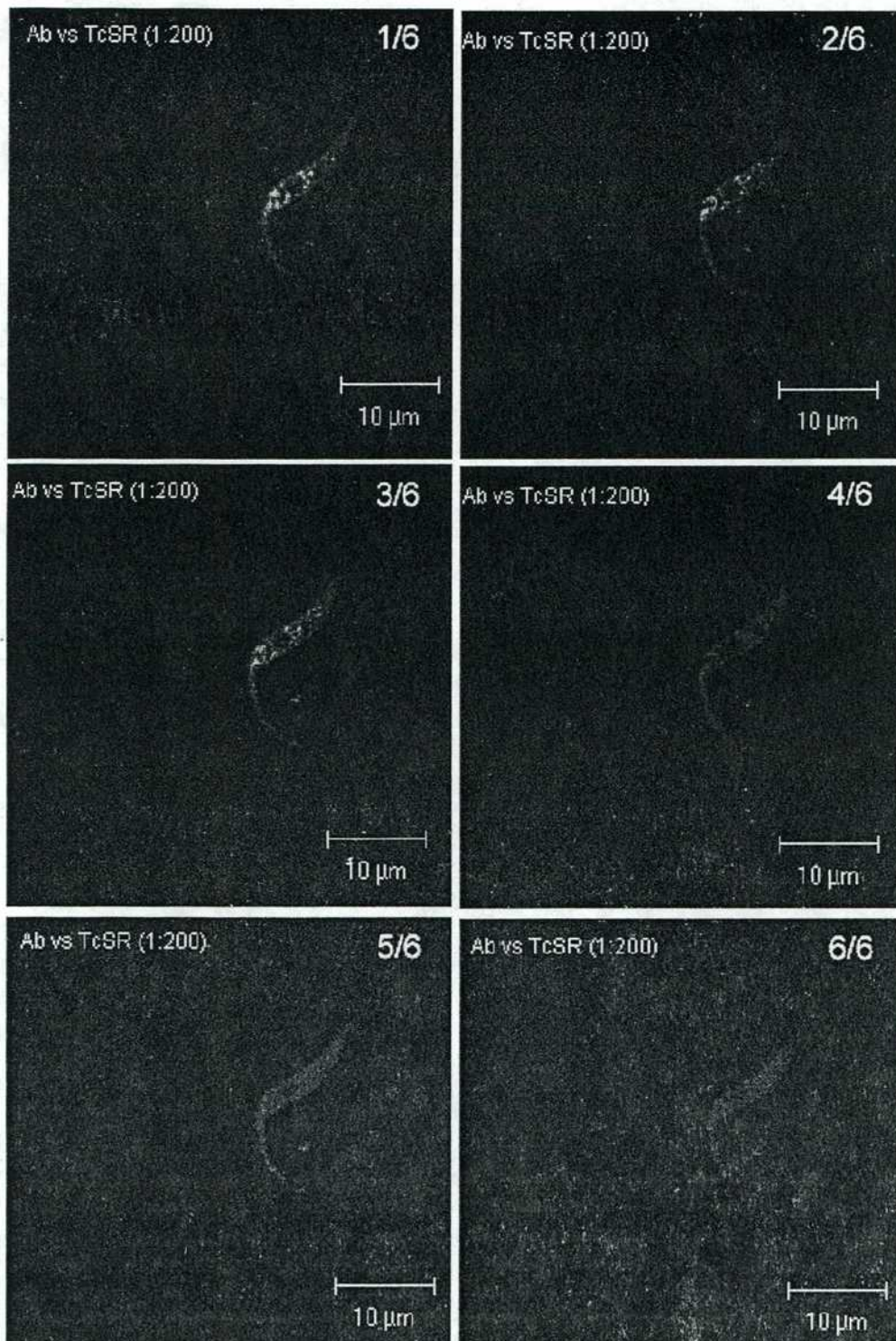


Figura 24. Cortes longitudinales realizados con el microscopio confocal. La figura muestra seis cortes de 1 µm de profundidad realizados sobre un epimastigote de *Trypanosoma cruzi* incubado con Ab contra TcSR. Las condiciones del ensayo se detallan en Materiales y Métodos. En los paneles 1/6, 2/6 y 3/6 se distingue un patrón de fluorescencia en el núcleo.

6. Ensayos funcionales de TcSR.

6.1. Splicing in vitro.

La manera mas sencilla y directa de demostrar que una proteína SR es efectivamente una proteína de esa familia, es mediante un experimento de splicing, ya sea in vivo o in vitro. Existen diversos ensayos posibles de los que se puede optar. El mas utilizado, debido a la claridad de los resultados es el denominado "Ensayo de complementación de extractos S100 de HeLa". En este ensayo, los extractos de HeLa no pueden realizar la reacción de splicing a no ser que una proteína SR, expresada exógenamente, en baculovirus, generalmente, sea agregada al ensayo. Por lo tanto, esta reacción de splicing depende de las proteínas SR. La figura 25 muestra la expresión de TcSR en baculovirus en células Sf9 de insecto. Desafortunadamente, TcSR no se expresó como proteína soluble, por lo que hubo que renaturalizarla antes de ensayarla en experimentos de splicing in vitro. Cabe aclarar que la necesidad de expresar TcSR en baculovirus está basada en que las proteínas SR requieren estar fosforiladas para ser activas, y la expresión en bacterias no produce proteínas modificadas. Nótese que bvTcSR (TcSR baculovirus) tiene un peso molecular aparente, superior a ecTcSR, a la proteína expresada en *Escherichia coli*, debido al alto número de fosfatos de que es portador TcSR en células de mamífero.

Expresión de TcSR en baculovirus

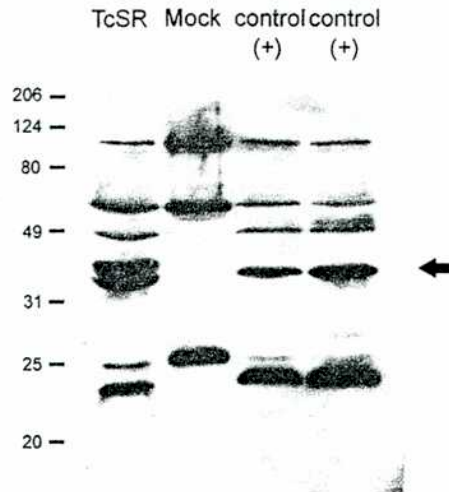


Figura 25. Expresión de TcSR en baculovirus. Se clonó el gen correspondiente a *tcsr* en el vector de expresión de baculovirus pFASTBAC (Gibco BRL) y se expresó la proteína como indica el fabricante, en células Sf9 de insecto. La figura muestra un Western blot con un anticuerpo anti Tag (6xHis). Las calles son: TcSR (virus recombinante que expresa TcSR). Mock y controles (+) son controles de infección mock (sin virus), y diferentes virus no recombinantes. El anticuerpo anti Tag 6xHis reconoce una banda específica en la calle TcSR, de tamaño posible para TcSR. Todas las calles corresponden a la fracción insoluble del extracto de células. Cada calle contiene 30 µg de proteínas medidas por el método de Bradford.

En este punto, hay que aclarar una dificultad técnica que encontramos a la hora de renaturalizar a TcSR. La proteína SR permaneció soluble en 4 M isotiocianato de guanidinio, hasta 250 mM isotiocianato de guanidinio, mientras que si era dializada por debajo de esa concentración, TcSR precipitaba. Por ello, nos vimos obligados a ensayar a TcSR en el ensayo de complementación de extracto de HeLa, con esta concentración residual de isotiocianato de guanidinio. Lamentablemente, como puede verse en la figura 26, no se pudo ver un efecto de TcSR en ensayos de splicing in vitro. Los controles con isotiocianato de guanidino solo a la misma concentración que en el ensayo, mostraron una inhibición de la reacción de splicing per se.

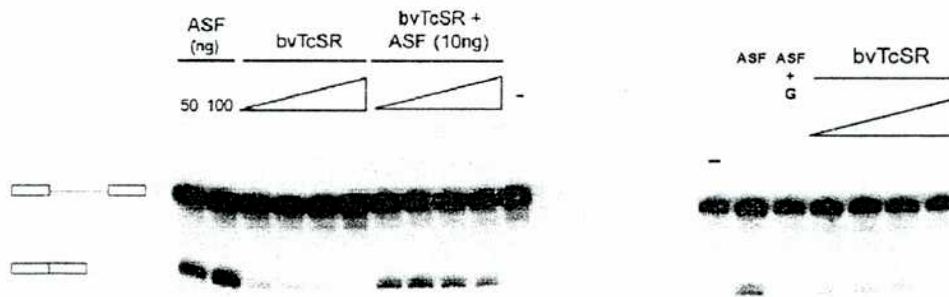


Figura 26. Ensayo de splicing in vitro con extractos S100 de células HeLa (Ensayo de complementación S100). Los ensayos de splicing se realizaron como se detalla en Materiales y Métodos. **Panel izquierdo.** En las dos primeras calles se utilizó la proteína SR ASF/SF2 como control positivo. A la izquierda se indican las distintas formas de procesamiento del minigen de β -globina esperados. Las calles "bvTcSR" contienen concentraciones crecientes de TcSR expresada en baculovirus y renaturalizada hasta una concentración de 250 mM Guanidina (ver texto). Las concentraciones ensayadas fueron: 10, 50, 100, 200 ng de proteína recombinante. Las calles denominadas "bvTcSR + ASF (10ng)" contienen las mismas concentraciones de TcSR que las calles "bvTcSR" pero con el agregado de 10 ng de ASF/SF2 recombinante. Nótese la inhibición del splicing del minigen a altas concentraciones de TcSR. La última calle contiene el control negativo (-), sin agregado de ninguna proteína SR de ningún tipo. **Panel Derecho.** Controles confirmando que el Isotiocianato de Guanidinio inhibe la reacción de splicing. (-) reacción control sin agregado de proteína SR. ASF: control positivo: extracto S100 con ASF/SF2 agregada (5 ng). ASF + G: Control de Isotiocianato de Guanidinio: Se incubó en idénticas condiciones que para "ASF" pero se agregó Isotiocianato de Guanidinio (concentración final: 30 mM, igual que en las calles de máxima concentración de TcSR). Las siguientes calles son una curva de concentración de TcSR (es también una curva de concentración de Isotiocianato de Guanidinio).

Cabe decir que ante esta contrariedad, TcSR fue expresada en otro tipo de baculovirus, pero con idénticos resultados (datos no mostrados).

6.2 Ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa.

Otro tipo de ensayo que decidimos encarar para intentar demostrar que TcSR es una proteína SR funcional, y no simplemente un polipéptido con homología con proteínas de la familia SR, es el llamado "Ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa". El ensayo se basa en el estudio de la capacidad de una determinada proteína SR transfectada en células de mamífero de inducir la inclusión de un exón alternativo codificado en un minigen que es co-transfectado simultáneamente. El ensayo está altamente probado y ha sido utilizado en numerosos trabajos (ver Cramer, 1999 o Kadener, 2001). Basándonos en la promiscuidad funcional de las proteínas SR, es decir la capacidad para inducir el splicing de gran variedad de sustratos al ser agregadas en concentración suficiente, decidimos estudiar si TcSR era capaz de inducir la inclusión del exón alternativo en el ensayo descrito. La figura 27 muestra un esquema del ensayo realizado, explicado en detalle en Materiales y Métodos según Cramer (1999) y Caputi (1994). Los resultados de este experimento mostrados en la figura 28 resultaron muy claros: TcSR se comporta como una proteína SR en un ensayo funcional. Al transfectar células HeLa con el plásmido que expresa TcSR, se nota un claro incremento en la forma "exón incluido", o de mayor tamaño, al compararse con la calle control, en la que las células HeLa fueron transfectadas con un plásmido control (sin inserto). Interesantemente, un plásmido que expresa una forma mutante de proteína SR sin el dominio RS, llamada TcSR Δ RS (figura 14), no produjo un incremento de la forma "EDI+" o de exón alternativo incluido. Este es un resultado alentador y esperado, ya que nos indica que TcSR induce la inclusión del exón de fibronectina EDI como una proteína SR funcional, en el sentido que ese dominio RS es necesario para la actividad. Resulta igualmente llamativo, el hecho de que TcSR pueda actuar en un ensayo de cis-splicing alternativo y en un sistema evolutivamente tan distante como una célula de mamífero.

Estos resultados favorecen la hipótesis de que la actividad de estas proteínas está muy conservada a través de la evolución.

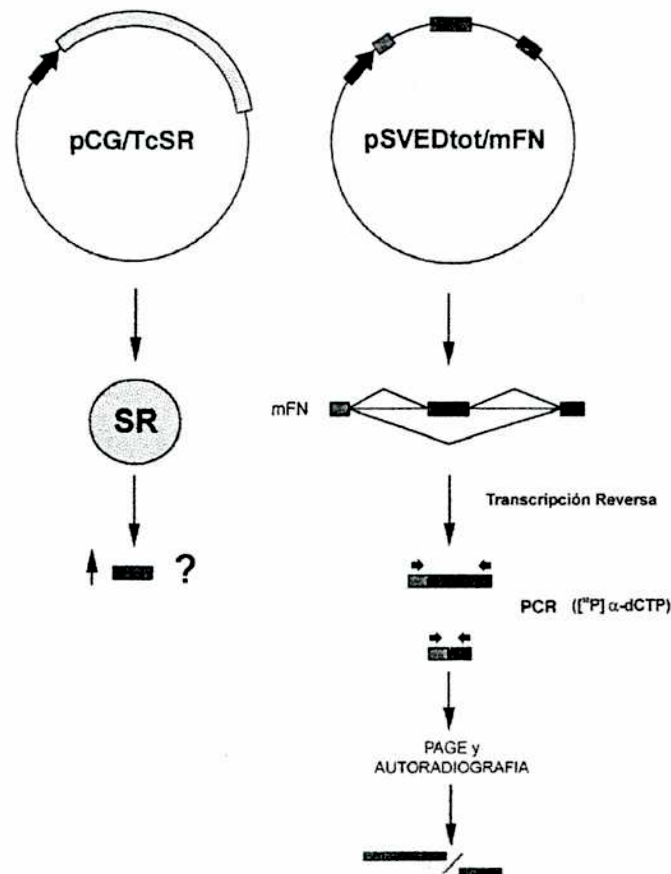


Figura 27. Esquema del ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa. Como se indica en Materiales y Métodos, se transfectaron células HeLa con estas dos construcciones. pCG/TcSR producirá la proteína (círculo amarillo) en esas células. Paralelamente, la transcripción desde pSVEDtot/mFN producirá el transcrito inmaduro con los tres exones (rojo, verde y azul, en la figura). La maquinaria de cis-splicing procesará el transcrito a las dos formas maduras (incluyendo o no el exón alternativo EDI verde). Luego de purificar el RNA, y realizar una Transcripción Reversa (RT) con oligodT, se realizó la PCR sobre ese cDNA, con los primers indicados que hibridan sobre los exones constantes (rojo y azul). Los productos se separan en un gel de poliacrilamida nativo al 6% y se cuantifican los productos de amplificación. Se calcula la relación entre exón EDI incluido (transcrito grande) y excluido (transcrito chico). Ese valor se compara con los controles (transfectando células con vector vacío).

En el panel B, se muestra que la inclusión de EDI es dependiente de la dosis de plásmido transfectado, y saturable. Esto provee una evidencia mas de que es la actividad de TcSR la responsable de la inclusión.

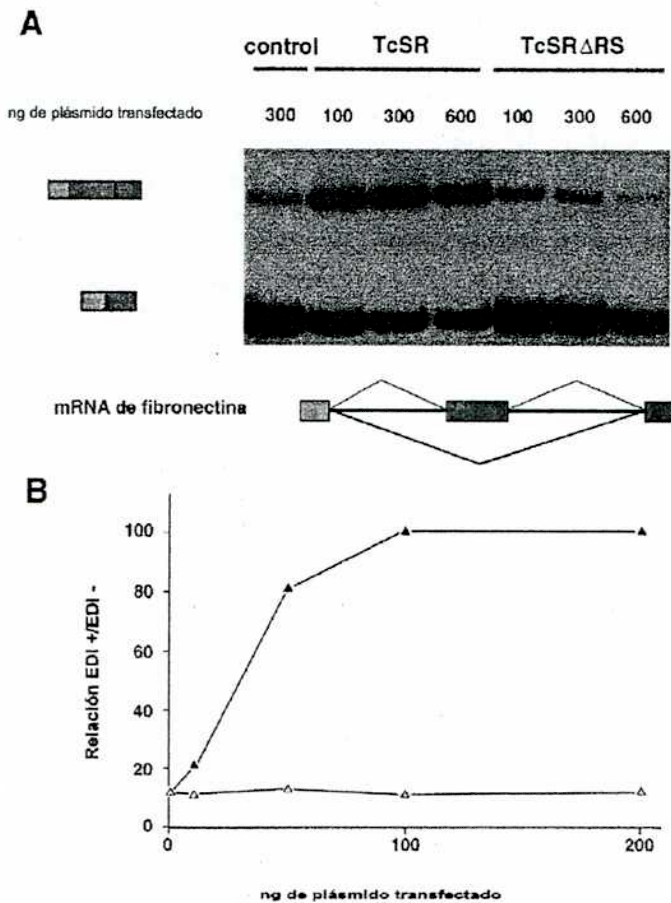


Figura 28. TcSR es activa en el ensayo de cis-splicing alternativo funcional en células HeLa. **Panel A.** Autoradiografía de las reacciones de splicing alternativo. A la izquierda se indican las diferentes formas de los RNAs procesados. Calle "control", las células fueron transfectadas con 300 ng de vector vacío. Calles "TcSR" curva de concentración de TcSR transfectada. Calles "TcSR Δ RS" curva de concentración de TcSR Δ RS transfectada (ver Materiales y Métodos). **Panel B.** Cálculo de la relación EDI incluido/excluido en la curva de concentración de TcSR y TcSR Δ RS. La transfección de TcSR produce un claro incremento de la forma que incluye el exón EDI, de manera dependiente de la dosis. Triángulos negros, células transfectadas con pCG/TcSR. Triángulos blancos, células transfectadas con pCG/TcSR Δ RS.

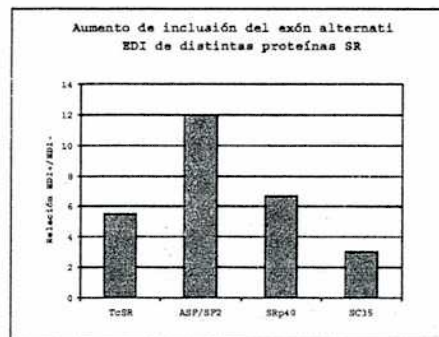


Figura 29. Los valores de inclusión del exón alternativo por parte de TcSR están dentro de los valores obtenidos con otras SR de mamíferos. Valores de inclusión de EDI con 100 ng de proteína SR transfectados a células HeLa. Se indican las relaciones de las proteínas SR: ASF/SF2, SRp40 y SC35.

La inclusión de EDI, por parte de TcSR, es del orden de las 5 a 6 veces respecto del control. Como puede verse en la figura 29, este orden de inclusión producido por TcSR está dentro de los valores publicados para otras proteínas SR de mamíferos, como ASF/SF2, SRp40 o SC35 (Cramer, 1999). Si bien esta comparación es solo representativa, y no puede tomarse como un grado general de actividad de las proteínas SR, ya que distintas proteínas de esta familia funcionan de manera diferente con distintos templados consideramos que es indicativa de que TcSR funciona como una proteína SR en esas condiciones.

El ensayo de Splicing alternativo funcional en células HeLa, utiliza el exón alternativo EDI del gen de la fibronectina. Este exón, contiene dos secuencias que, dependiendo de la concentración relativa de factores específicos que las reconocen, determinan la inclusión o no del exón (figura 30).

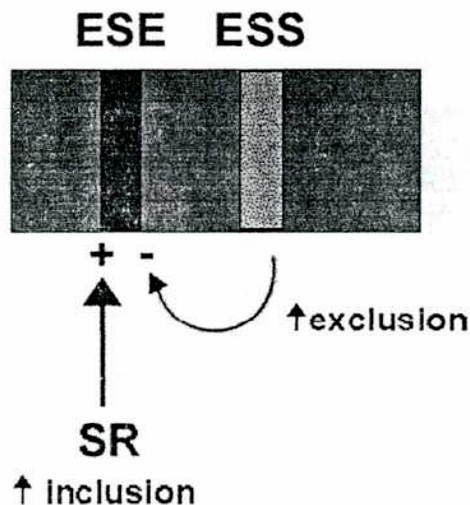


Figura 30. Esquema del exón alternativo EDI, con sus elementos en cis, reguladores de la inclusión o exclusión del mismo. La secuencia del exón muestra dos elementos que manejan la inclusión o no del exón alternativo. Los elementos ESE (Exonic Splicing Enhancer) y ESS (Exonic Splicing Silencer) unen factores en trans (ver texto). Como se indica, la unión de los factores al ESS inhiben la inclusión del exón, mientras que la unión de proteínas SR al ESE, particularmente al elemento A, del mismo, favorece la inclusión del exón.

Una de estas secuencias, Exonic Splicing Silencer (ESS) une el factor hnRNP A1 (ver Introducción). Este factor, funciona de manera antagónica a las proteínas SR, y en

condiciones normales de una célula eucariota superior, inducen la exclusión del exón, como se puede ver en la calle Control de la figura 28. La otra secuencia de relevancia, presente en el exón, es la Exonic Splicing Enhancer (ESE). Dentro de esta secuencia de 81 nucleótidos (nt), está presente una más corta, de solo 8 nt llamada elemento A y cuya secuencia es 5'-GAAGAAGA-3' (figuras 30, 31). Este elemento A es necesario para la unión de las proteínas SR, definición del exón, sitio de splicing y consiguiente inclusión del mismo, como lo muestra la figura 28. Como dijimos anteriormente, en células HeLa la inclusión basal del exón es baja (calle Control, figura 28), pero al transfectar células con una proteína SR, la alta expresión desplaza el equilibrio hacia la situación en que la proteína SR está en mayor concentración que hnRNP A1, induciendo la inclusión de EDI.

La capacidad de las proteínas SR de incluir el exón alternativo, depende de la unión de estas proteínas al elemento A del ESE. Por lo tanto, y en función de los resultados obtenidos en la figura 28, resultaba indispensable determinar si la actividad de TcSR era dependiente del elemento A. Repetimos entonces el experimento de transfección de células HeLa pero en lugar del templado "wild type" utilizamos uno en el cual el elemento A ha sido mutado, no permitiendo así la unión de proteínas SR. Como puede verse claramente en las figuras 32 y 33, la inclusión de EDI por parte de TcSR es extremadamente dependiente del elemento A.

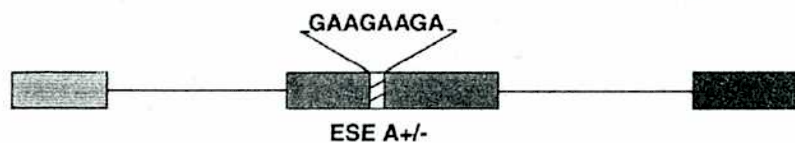


Figura 31. Esquema del transcripto primario del minigén de fibronectina con detalle del elemento A del ESE del exón alternativo EDI (verde). Se muestra el esquema del exón EDI. La secuencia del elemento A del ESE, 5'-GAAGAAGA-3' se destruyó en la versión ESE A -, de manera de impedir la unión de proteínas SR.

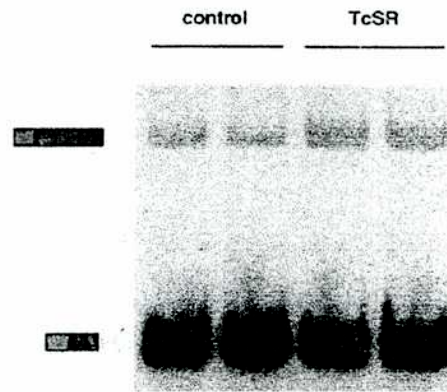


Figura 32. TcSR no puede aumentar la inclusión del exón alternativo EDI, al utilizarse un minigén con el elemento A del ESE mutado. Autoradiografía de las reacciones de splicing (realizadas como se describió anteriormente) pero con el elemento A del ESE mutado (A -). La inclusión basal de este exón mutado ya es muy baja en los controles, (ver figura 33), debido a que las proteínas SR endógenas tampoco pueden reconocerlo.

Esta dependencia queda mucho más evidenciada al cuantificar las veces de inclusión de EDI con y sin en elemento A:

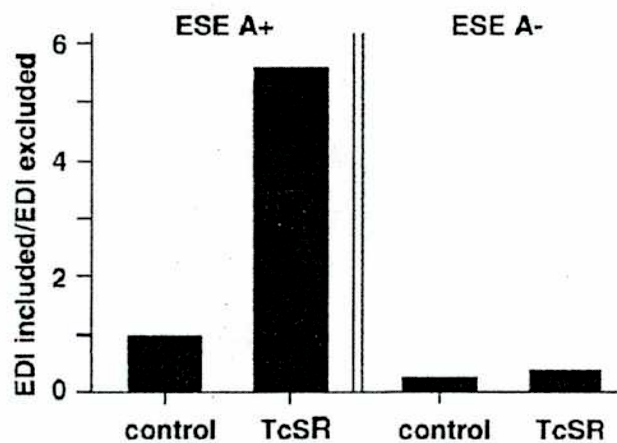


Figura 33. Cuantificación de la relación inclusión/exclusión del exón alternativo EDI con el elemento A intacto (+) o mutado (-). Esta figura muestra la cuantificación de la inclusión de EDI en células HeLa transfectadas con un plásmido de expresión de TcSR (pCG/TcSR) y co-transfectadas con el plásmido de expresión del minigén de fibronectina, con el elemento A "salvaje" o "mutado". Nótese que la inclusión basal es menor con el elemento A -, ya que las proteínas SR endógenas tampoco pueden actuar. La sobre-expresión de TcSR produce un aumento de 5.5 veces del exón EDI con el elemento A +, pero sólo del 20% con el elemento A - (este aumento no es significativo y está en el orden de los obtenidos con otras proteínas SR y este mismo elemento (Sebastián Kadener, observaciones personales, no mostradas).

Los resultados obtenidos en células HeLa demuestran que TcSR es efectivamente una proteína de la familia SR. Además, la actividad de TcSR con el minigén de fibronectina

está dentro del rango obtenido para otras proteínas SR, y es dependiente de la presencia de un Exonic Splicing Enhancer o ESE, funcional. Cabe aclarar que TcSR no pudo modular la actividad de inclusión del exón alternativo dependiente de otras proteínas SR, como SRp40 o Srp55, (datos no mostrados), lo que sugiere que no está actuando como una proteína SR genérica, sin ningún tipo de especificidad, sino que aparentemente, su actividad parece, en cierta forma mas relacionada con la de ASF/SF2, a pesar de no tener particular homología a nivel de su estructura primaria.

7. Estudio de la actividad de TcSR en *Schizosacharomyces pombe*.

Quisimos estudiar aún mas la actividad de TcSR, y para esto decidimos utilizar otro sistema in vivo, en el que pudieramos evaluar rápida y sencillamente fenotipos que nos permitan comparar la actividad de distintas proteínas SR. Por esto, utilizamos la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, en la que existen varios fenotipos asociados a problemas en el procesamiento de mRNA (Potashkin, 1998; Fantes, 1989) y en la que el procesamiento de los pre-RNA_m se realiza de manera similiar a la de eucariotas superiores, razón por la cual ha sido utilizada como modelo para el estudio del procesamiento del RNA.

La idea de esta serie de experimentos es comprobar de manera totalmente independiente a los experimentos en células HeLa. que TcSR es funcional y que su actividad está enmarcada en lo que se conoce como "*SR-network*". La levadura nos permite utilizar cepas mutantes y con este "*background*" genético, analizar los distintos fenotipos producidos por la expresión de TcSR. Los experimentos que siguen han sido realizados en paralelo con la proteína SR mas característica de eucariotas superiores: ASF/SF2. Aclaremos que no pretendemos establecer una homología funcional entre

ASF/SF2 y TcSR, sino que, al menos en principio, la proteína SR de mamífero ha sido incluida principalmente a modo de control positivo. Esto es justificable dado que suponer a priori que TcSR es una homóloga funcional de ASF/SF2 sería una afirmación totalmente arbitraria.

7.1. Sobre-expresión de TcSR en la cepa salvaje 1913, de *S. pombe*.

La levadura de fisión *S. pombe*, tiene un ciclo de vida relativamente sencillo. La figura 34 muestra un esquema del ciclo de vida de la levadura.

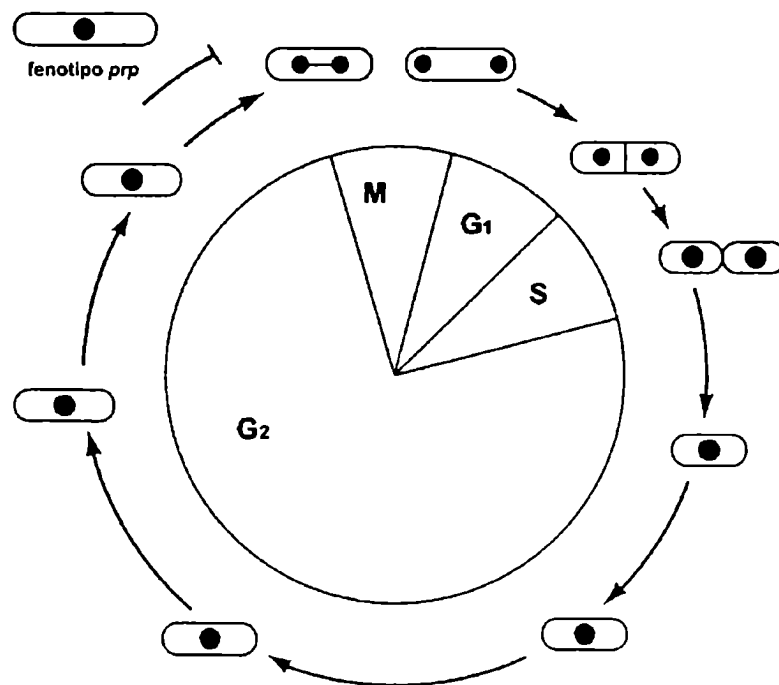


Figura 34. Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*. Se muestra un esquema del ciclo de vida de la levadura, en el ciclo haploide. La levadura crece elongándose en el eje longitudinal. Al entrar en la fase G₁, comienza la citoquinesis, que dará lugar a las dos células hijas. Interrupciones del ciclo celular por problemas en el procesamiento de los pre-mRNAs, detienen el ciclo en el "checkpoint" de G₂ a M, produciendo el clásico fenotipo "prp" (pre-RNA processing). Tomado de "Experiments with fission yeast" (CSH Press, 1999).

Se observa que al salir de la fase S, las dos células hijas empiezan un proceso de

elongación durante la fase G₂, hasta llegar al máximo tamaño justo antes de entrar a la fase M. Existen una serie de trabajos publicados en los que la interrupción del ciclo celular en el paso o "check point" de G₂ a M (ver figura 34), produce un fenotipo característico, elongado (Takeuchi 1993; Tang, 2000). Varias son las especulaciones que atribuyen dicho fenotipo a un defecto en el procesamiento del RNA (Potashkin, 1998). El argumento utilizado para explicarlo es que en este organismo, muchos de los genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular, contienen intrones en sus secuencias y por ende, alteraciones en el procesamiento de esos pre-mRNA, ya sean genéticas o por desbalances bioquímicos, como la sobre-expresión de proteínas regulatorias, producirán proteínas defectuosas o no producirán proteínas directamente. El resultado es un ciclo celular interrumpido. El fenotipo elongado es debido a que se interrumpe la división celular, pero no el crecimiento de la célula, resultando en el fenotipo *pre-RNA processing* o "prp" (figura 34).

Es sabido que las proteínas SR se encuentran en un delicado equilibrio con otras proteínas regulatorias, por lo que la sobre-expresión de las primeras altera el procesamiento del RNA. Siguiendo esta lógica, transformamos levaduras salvajes con el plásmido pREP1 (Maundrell, 1993), en el que se subclonaron los genes que codifican para *tcsr*, *tcsrΔrs*, *asf/sf2* o *asf/sf2Δrs*. En presencia de bajas concentraciones de tiamina (2μM), el promotor de *nmt1** está reprimido, y al lavar las células, con medio EMM2 sin tiamina, se desreprime el promotor, permitiendo la expresión del gen subclonado (ver Materiales y Métodos, Maundrell, 1993). La tabla II muestra los resultados obtenidos con distintas cepas. Las primeras 5 líneas muestran los resultados obtenidos al sobre-expresar un control negativo, hecho con el vector sin inserto. TcSR, ASF/SF2 y sus mutantes en la cepa salvaje 1913. Puede verse que el largo celular aumentó al expresar TcSR, ASF/SF2 y ASF/SF2ΔRS, mientras que TcSRΔRS no produjo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$, ANOVA).

Los resultados de TcSR Δ RS eran esperados, basados en el principio que el dominio RS es necesario para interacciones proteína-proteína y proteína-RNA.

Transformante	Cepa	Largo celular	
		promedio (μm) \pm SEM	n
pREP1/-	1913 (wt)	7.19 \pm 0.19	109
pREP1/TcSR	1913 (wt)	9.01 \pm 0.31 (*)	117
pREP1/TcSR Δ RS	1913 (wt)	8.47 \pm 0.22	115
pREP1/ASF/SF2	1913 (wt)	9.14 \pm 0.35 (*)	120
pREP1/ASF/SF2 Δ RS	1913 (wt)	9.27 \pm 0.46 (*)	78
pREP1/-	B8 (Δ kic1)	5.26 \pm 0.24	70
pREP1/TcSR	B8 (Δ kic1)	6.12 \pm 0.21	130
pREP1/ASF/SF2	B8 (Δ kic1)	5.28 \pm 0.20	77
pREP1/-	2A5 (Δ dsk1)	4.67 \pm 0.13	112
pREP1/TcSR	2A5 (Δ dsk1)	5.86 \pm 0.14 (*)	77
pREP1/ASF/SF2	2A5 (Δ dsk1)	7.66 \pm 0.26 (*)	69

Tabla II. Efecto en el largo celular al sobre-expresar TcSR (y otras proteínas SR y mutantes) en diferentes cepas de *Schizosaccharomyces pombe*. Se transfectoron TcSR o ASF/SF2 en diferentes cepas de *S. pombe* (TcSR Δ RS, or ASF/SF2 Δ RS se transfectoron exclusivamente en la cepa salvaje 1913), como se describe en Materiales y Métodos. Luego de 20-25 hs en condiciones desreprimidas, se cosecharon y fijaron las células y se midieron los largos celulares. Las significancias estadísticas se calcularon para cada cepa, de manera independiente. El n, es el número total de células medidas en 4 experimentos independientes. Los largos se indican en $\mu\text{m} \pm$ la media del error estándar (SEM). (*) ANOVA $p < 0.05$.

Sin embargo, resultaron algo inesperados los resultados de ASF/SF2 Δ RS, por la misma razón. Al estudiar la bibliografía, encontramos que ASF/SF2 Δ RS es capaz de inducir la inclusión de un exón in vitro (Hastings, 2001; Zhu, 2000). Los autores atribuyen esta capacidad al hecho que los dominios de unión a RNA pueden tener otros dominios

críticos o simplemente las interacciones dependientes del dominio RS no ser necesarias en todos los casos, cuando el resto de la proteína está presente en concentraciones suficientes o bien cuando los sitios de splicing son suficientemente fuertes. De cualquier forma, no parece ser el caso para TcSR, aunque puede verse una leve tendencia, sin llegar a ser significativa, estadísticamente (ver Tabla II).

Cuando se grafica el porcentaje de células en función del largo celular, se observa que TcSR y ASF/SF2 tienen una distribución similar, sugiriendo que ambas están actuando de la misma manera.

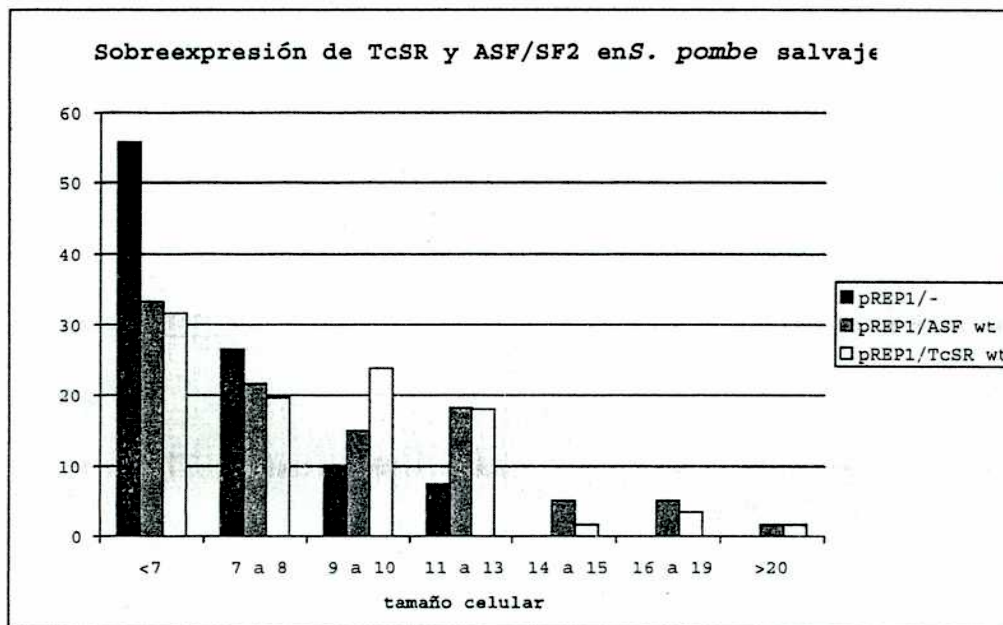


Figura 35. Distribución de frecuencias del tamaño celular de células de *S pombe* (cepa 1913) sobre-expresando TcSR o ASF/SF2. La sobre-expresión de TcSR muestra un patrón prácticamente idéntico al de la sobre-expresión de la proteína SR ASF/SF2 de mamíferos. Se observa claramente un corrimiento hacia células de gran tamaño, comparado con el control de vector solo, vacío. A la derecha se indican las construcciones utilizadas.

En cambio, al graficar la distribución de frecuencias para las proteínas mutantes, se observa una clara diferencia entre ambas proteínas SR:

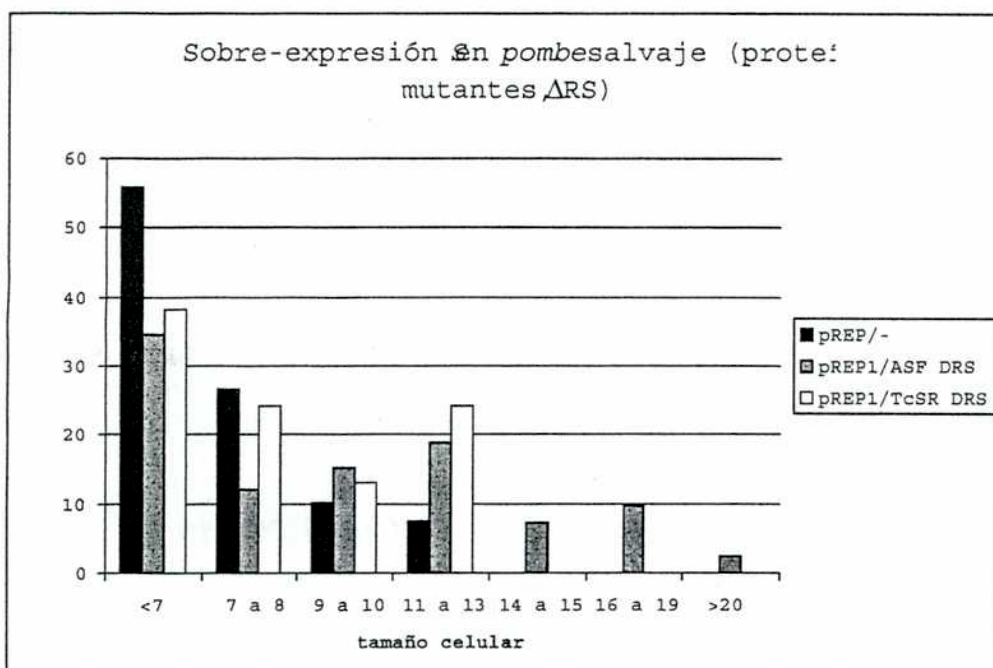


Figura 36. Distribución de frecuencias del tamaño celular de levaduras *S pombe* (cepa 1913) que sobre-expresan TcSR Δ RS o ASF/SF2 Δ RS. La sobre-expresión de TcSR Δ RS produce un patrón de distribución de frecuencias diferente del que produce la sobre-expresión de ASF/SF2 Δ RS. La mutante de TcSR sin dominio RS elonga levemente las células, aunque no significativamente. No se observaron células de un largo superior a 13 μ m. En cambio, las células que sobre-expresaron ASF/SF2 Δ RS produjeron un fenotipo similar al de la sobre-expresión de ASF/SF2 o TcSR salvajes (ver texto). A la derecha se indican las construcciones utilizadas.

Aquí se observa que TcSR Δ RS elonga las células, aunque no se observan células superiores a los 13 μ m. Esto sugiere que el dominio RS de TcSR es más necesario para la actividad, que el de ASF/SF2. Esto puede deberse al hecho de que ambos dominios tienen diferencias muy marcadas. Mientras que ASF/SF2 tiene un dominio canónico, con largos trechos de dipéptidos arginina y serina (RSRSRSRS...), TcSR posee dipéptidos RS o SR más aislados, y en menor número. Además, el dominio RS de TcSR es rico en largos trechos de arginina, haciéndolo más básico, en general. No sabemos si estas características influyen o no en la dependencia del dominio o la funcionalidad del mismo, pero los resultados sugieren que es necesario, al menos para la actividad de TcSR. Alternativamente, la diferencia en la elongación de *S. pombe* puede residir en los dominios de unión a RNA, siendo los de ASF/SF2 más eficientes que los de TcSR.

7.2 Sobre-expresión de TcSR en las cepas 2A5 y B8, de *S. pombe*.

Para demostrar que la actividad "elongadora" de TcSR y ASF/SF2 es producto de una interacción entre dichas proteínas y las SRPKs, repetimos el mismo ensayo pero en lugar de utilizar la cepa salvaje, utilizamos dos cepas mutantes diferentes. La sobre-expresión en la cepa B8 ($\Delta kic1$) (Tang, 2000) en la que se ha delecionado el gen que codifica para la quinasa de proteínas SR de la familia Clk/Sty1 en *S. pombe* (ver Introducción), no produce el fenotipo elongado, mientras que la sobre-expresión de TcSR y ASF/SF2 en la cepa 2A5 ($\Delta dsk1$) (Tang, 2000), en la que ha sido delecionado el gen de la quinasa de proteínas SR de la familia SRPK (ver Introducción), si produce elongación (Tabla II). Estos resultados sugieren que las proteínas SR (incluida TcSR) actúan a través de quinasas de proteínas específicas, en particular las de la familia SRPK. Este resultado era esperado en el caso de ASF/SF2 ya que existen quinasas de proteínas SR que interactúan específicamente con estas proteínas y que han sido objeto de numerosos estudios, pero en el caso de TcSR resulta muy interesante, ya que hasta ahora no hay ningún tipo de información sobre la existencia de tales quinasas en el parásito, (ver Parte II).

7.3 Sobre-expresión de TcSR en la cepa mutante doble 2D4, de *S. pombe*.

Para confirmar que TcSR actúa en el marco de un "*SR-network*" decidimos ver si las proteínas SR y sus mutantes podían complementar la deficiencia de genes que codifican para las quinasas específicas de proteínas SR, en *S. pombe*.

Sabemos que ASF/SF2 funciona en el marco de dicho *network*. Varios trabajos han demostrado que esta proteína es fosforilada por quinasas de proteínas específicas,

como por ejemplo las SRPKs y las Clk/Sty, y que dicha modificación es necesaria para la actividad de ASF/SF2. Utilizamos la cepa mutante 2D4 ($\Delta dsk1$, $\Delta kic1$, Tang, 2000), que tiene la particularidad de prácticamente no crecer en medio mínimo. El experimento planteado, entonces, es el rescate del crecimiento de esta cepa, mediante la transformación de dicha cepa con las proteínas SR salvajes y mutantes.

Como se ve en la figura 37, la expresión de todas las proteínas SR y sus mutantes permitieron el crecimiento en medio mínimo EMM2, indicando que han podido complementar la falta de las quinasas. Una vez más, las dos proteínas salvajes (TcSR y ASF/SF2) y la mutante sin el dominio RS (ASF/SF2 Δ RS) complementaron más eficientemente a 2D4 que la mutante de TcSR (TcSR Δ RS). Estos resultados sugieren que la expresión en la cepa mutante 2D4 es "funcional", mientras que la sobre-expresión en las cepas salvaje y simples mutantes parece bloquear el ciclo celular.

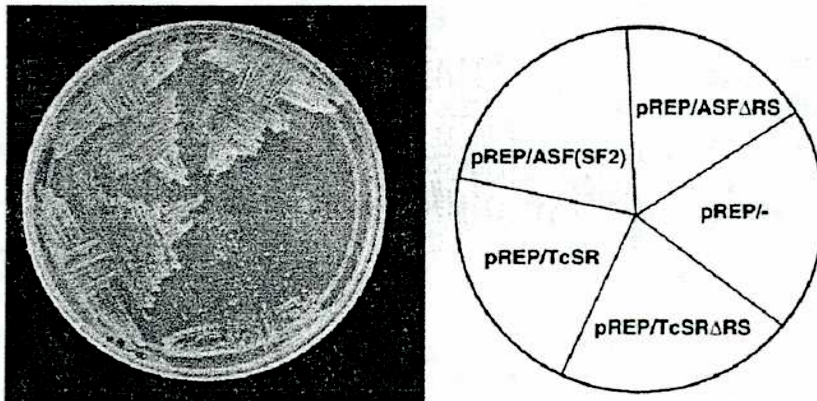


Figura 37. TcSR rescata el fenotipo mutante de la cepa mutante 2D4 de *Schizosaccharomyces pombe*. La expresión (no sobre-expresión) de las proteínas SR en la cepa mutante doble 2D4 rescata el fenotipo mutante (formación de microcolonias en medio mínimo EMM2). El panel de la derecha es un esquema de las estrias realizadas en la placa del panel de la izquierda. Nótese que TcSR Δ RS produjo un rescate (aunque menor) de la cepa mutante. Quizás esto sea coincidente con la sobre-expresión de esta mutante en la cepa salvaje 1913 y los resultados en células HeLa, ya que sugiere que la mutante es prácticamente inactiva.

PARTE II:
TcSRPK Y TbSRPK

1. Introducción

Cuando nos encontrábamos intentando clonar el gen que codifica para TcSR, empezamos a interiorizarnos sobre estas proteínas, y entre las primeras cosas que aprendimos sobre el funcionamiento de las proteínas SR, se encontraban los mecanismos de regulación de su actividad. Como se dijo en la Introducción de esta Tesis, las proteínas SR son extensivamente fosforiladas en su dominio RS. Esta fosforilación, que potencialmente afecta a todas las serinas del dominio, es necesaria en el primer paso de catálisis en la reacción de splicing, mientras que la desfosforilación resulta esencial para que la reacción prosiga mas allá de dicho punto. Además, la fosforilación afecta la carga neta del dominio RS permitiendo interacciones proteína-proteína y proteína-RNA. En base a estas características, nos pareció posible que existiendo en al menos una proteína SR (TcSR), existieran también los factores que regulan su actividad. Decidimos investigar entonces, la presencia o no en *Trypanosoma cruzi*, de una proteína con actividad quinasa de proteínas SR. Seguimos diversas estrategias en paralelo. A continuación se describe el método utilizado para la identificación y clonado de las quinasas específicas de proteínas SR (SRPK), en dos Trypanosomátidos: *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Presentaremos luego la caracterización bioquímica y funcional de las proteínas en distintos ensayos in vitro e in vivo.

2. Clonado y análisis de la secuencia de los genes de *tcsrpk* y *tbsrpk*.

Aprovechándonos de la alta conservación que existe entre las distintas SRPKs de metazoos, se hizo una búsqueda en bases de datos de Trypanosomátidos (ver Materiales y Métodos), utilizando la secuencia de la SRPK de humanos (hSRPK1) como señuelo. Esta búsqueda, arrojó dos resultados positivos con buen puntaje: un EST (Expressed Sequence Tag), producto del proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi*, y una región de un brazo del Cromosoma 6 de *Trypanosoma brucei*. Luego de alinear ambas secuencias, se determinó que el EST presentaba homología con un dominio de hSRPK1 llamado "Activation loop" (ver figura 38). En cambio, la región del Cromosoma 6 de *Trypanosoma brucei*, presentaba un marco abierto de lectura completo, con muy alta homología con hSRPK1 y extremadamente alta, con el EST de *Trypanosoma cruzi*. Clonar el gen completo de *Trypanosoma brucei*, que llamamos *tbsrpk* resultó una tarea trivial, ya que solo debimos sintetizar primers específicos para los extremos 5' y 3', con los adaptadores para posterior subclonado en distintos vectores de expresión (ver Materiales y Métodos). El clonado del gen completo de *Trypanosoma cruzi*, que llamamos *tcsrpk*, requirió un poco más de elaboración, principalmente reacciones de RT-PCR. La estrategia se describe en detalle en Materiales y Métodos. La figura 38 muestra la traducción teórica de la secuencia completa de los genes *tcsrpk* y *tbsrpk* alineados con las SRPKs de humanos (hSRPK1 y hSRPK2), la de la levadura de fisión *Schizosacharomyces pombe* (SpDsk1) y la de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sky1p).

TbSRPK	-MPRDRRAKYGRRRAQNKITTTGGGAKRKRKSKPIAPHVKEKGDIDINALLEEIERNDSPAEKVKPKETTKSRRRRKAERKVEGLAVKPGTTVAQARMLASKMOORHSASTNGSPQAHQRSEEDF 122
TcSRPK	---MPKFNKKTGGCAKNGKAPTKKKTKYIDPCQTNVEDASINTATEEVESHPLGQPHFSKIKRKNKDLQLOEIGRLTILKPGMTVAOAHKANKVYQOKPLO---NIPDPSFEFEEF 116
SpSk1	-----MGSDGSSLSPKVSPQGHTEIVDHSVSEKVTIN-----GKNVKNKNS 041
ScSk1p	MGSSINYFGVTKSAHLADTSDASISCEAAT'SSOPAKNFQFDYNNMKKAPAPT'KSKLSLALQTSKSSSANGT'VEDTSSKTFSTKSIKKKPDSDGVSHEVSI-----QSDSDGSPQSDS 117
hSRPK1	-----MERKVLALQARKKRTKAKKDKAQRKSETQ-----HRGSAPHSES 029
hSRPK2	-----MSVNSEKSSSERPEQOKAPLVPDPDPDP-----PPPPPLPDP 030
TbSRPK	DEDDDEQDGG--EDYSIDIANRPSERKGGHIVVVEVRY--NCRVVRKLGWYESTVWVYVYVYKVFQAVKQSAKHVDAAY--KLEGEIMTA---PEKVR---CARINHEEQ 236
TcSRPK	GYEEGEGDHGSDSDYSDTANRSEVYRKGXHPVAVZBY--HRRVVRKLGWYESTVWVYVYVYKRYQAKVQSAKHVDAAY--KLEGEIMSS---PDKT---CCCARMINVTEHT 232
SpSk1	EV--DKSVAEKV-----KTHEENACDHYGGHIVVIEEERHRRVYVVRKLGWGHVSTVWVYAYRAAKRVAIVVRSAEHRTVTSIDVRI--OKIREG---EKHLGKHHIISLLE 235
ScSk1p	DL--DSSTISSCD---ERNESLKPFRFGGHPKZEPYKDAKYLIVRKLWGHVSTVWVYAKVWVNTPHVAKIVRGGKRVYAAEDKLRVNDNATKEDSMGANHILKLI 235
hSRPK1	DLPDDEEELIGSD---DDEQDQDNYCKGGHILVAKIDLE--NGRHHVIRKLGWGHVSTVWVYKLGKRVNIVVYKSAEHVTTALDRLIKSYRNS---PNDENREMVVQII 144
hSRPK2	TPPEPEEELIGSD---DEEQDQDNYCKGGHIVVAKIDLE--NGRHHVIRKLGWGHVSTVWVYKGGKRVNIVVYKSAEHVTTALDRLIKVRES---PSDPNKDMVVQII 145
TbSRPK	CGNGIVCVRVYVYEDTASIRYKYHVEVPIVAKSRGIIIGEHVYS--LDLHTKPRNVISAPK--HAIVSQMKRF-----KPPPLHDRPS 326
TcSRPK	CGNGIVCVRVYVYEDTASIRYKYHVEVPIVAKSRGIIIGEHVYS--LDLHTKPRNVISAPK--HAITSLMKRY-----HPPPLHQR 322
SpSk1	CGNGIVCVRVYVYEDTASIRYKYHVEVPIVAKSRGIIIGEHVYS--LDLHTKPRNVISAPK--HAITSLMKRY-----PATTSPTSN 245
ScSk1p	CGNGIVCVRVYVYEDTASIRYKYHVEVPIVAKSRGIIIGEHVYS--LDLHTKPRNVISAPK--HAITSLMKRY-----PATTSPTSN 245
hSRPK1	CGNGIVCVRVYVYEDTASIRYKYHVEVPIVAKSRGIIIGEHVYS--LDLHTKPRNVISAPK--HAITSLMKRY-----PATTSPTSN 245
hSRPK2	CGNGIVCVRVYVYEDTASIRYKYHVEVPIVAKSRGIIIGEHVYS--LDLHTKPRNVISAPK--HAITSLMKRY-----PATTSPTSN 245
TbSRPK	LVKRDPKTMTKSQR---RYYKKLRAAGK-----GKD----- 355
TcSRPK	LVERDPKMTKSQR---RYYKKLKALEQ-----NGK----- 351
SpSk1	TSSKTRNNTGYTAK--A-----PIIKRGQVDN-----SAQERKTF-----AKNPTKNSKPAQGOVIFSSPFTSTL-----SR-- 306
ScSk1p	MSKNKKKLKKQKQKQAELELLEKRMQIEEMEKESG-----PGQKRPNKQEESESPERPLKENPNKMTQEKLEESSTIGQDOTLIMERDEFGGAELINCNGVIEVINYTQN 358
hSRPK1	ISKNNKKLKKQKQKQAELELLELREAEERKIIIEENITSAAPSNDQDGEYCEPVKLTGTGLEAAEAETAKDNGEAEDQEEKEDAEKENIEKEDDDVQDELANI 375
hSRPK2	ISKNNKKLKKQKQKQAELELLELREAEERKIIIEENITSAAPSNDQDGEYCEPVKLTGTGTGLEAAEAETAKDNGEAEDQEEKEDAEKENIEKEDDDVQDELANI 375
TbSRPK	---SAEGNEQNDDEDIAREVHVDNFAAPO--QSEK-----EPLSETDSE-----W-----E----- 398
TcSRPK	---KNEINSEKDNOCATYAKTHKNSLEQNREQDQAE-----ISESETDSD-----W-----E----- 395
SpSk1	---PFGAVSESTRSOKHNSHPNSPFSGDNSL-----NNDNEDIMNTPLHEPOLADSLSTFDISNTISQSDTNGPYVINSMTDSNSVSTDI----- 350
ScSk1p	FINSVPHSVTRMFI NEDSDNNNDNNKNNNNNNNSN-----STSQETDSCPTITSEVSDTWVQSSSTVGQSFSECHI SOLQESI NAEI PCDEQEQEHNGPLD----- 537
hSRPK1	SNNETLRHKEDLHINANDCVQNLNQESSFLSLPNGDS-----STSQETDSCPTITSEVSDTWVQSSSTVGQSFSECHI SOLQESI NAEI PCDEQEQEHNGPLD----- 466
hSRPK2	IENGPFSLEQQLDDEDDDEEDCPNPEEYNLDEPNAESDYTYSSSYEQFNGLEPNRHKHIFESQFPFESTSLFSGSLEPVACGSVISEGSPLTEQESSPHDRSKRVSASSTGDLPKAKTRAA 498

G-rich pocket

Phosphate anchor

Linker loop

Catalytic loop

TbSRPK	-----VERLHVIVLALPNSGTYRQI [⊗] DEYVTRVYRSPVAVILGYPYSTPI [*] LSACVIFELIIGEFIDPDRKESDYSRDEIIL [*] ISVIVSMRILGDEGRVRAQYNSR [*] ET [*] R	511
TcSRPK	-----IERLHVIVLADENSGTYRQI [⊗] DEYVTRVYRSPVAVILGYPYSTPI [*] LSACVIFELIIGEFIDPDRKESDYSRDEIIL [*] ISVIVSMRILGDEGRVRAQYNSR [*] ET [*] R	508
SpDsk1	-----PVPKITVKNLNDGNAWTRKHFNDYVTRVYRSPVAVILGYPYSTPI [*] LSACVIFELIIGEFIDPDRKESDYSRDEIIL [*] ISVIVSMRILGDEGRVRAQYNSR [*] ET [*] R	462
ScSkylp	-----NSPENLIQIKALDENAGYDEHYVNSVYRSPVAVILGYPYSTPI [*] LSACVIFELIIGEFIDPDRKESDYSRDEIIL [*] ISVIVSMRILGDEGRVRAQYNSR [*] ET [*] R	651
hSRPK1	NELVNLPEKNAEKLVKADENAGYDEHYVNSVYRSPVAVILGYPYSTPI [*] LSACVIFELIIGEFIDPDRKESDYSRDEIIL [*] ISVIVSMRILGDEGRVRAQYNSR [*] ET [*] R	588
hSRPK2	DLLVNLDFPRNRDKIRVKNADENAGYDEHYVNSVYRSPVAVILGYPYSTPI [*] LSACVIFELIIGEFIDPDRKESDYSRDEIIL [*] ISVIVSMRILGDEGRVRAQYNSR [*] ET [*] R	620
	Activation and P+1 loops	
TbSRPK	SRKDLNFGLELIVRKHETRKKKEIAE [←] PMLELEHINRAT [←] MDLNNFQHFVEVQDDYV [←] LCFVPSDDHRRGERSNGNMESESEFSDTTEETDDYDRSRRLDRYDAMEDSLSRQDE	634
TcSRPK	NKADNFGLELIVRKHETRKKKEIAE [←] PMLELEHINRAT [←] MDLNNFQHFVEVQDDYV [←] LCFVPSDDHRRGERSNGNMESESEFSDTTEETDDYDRSRRLDRYDAMEDSLSRQDE	627
SpDsk1	NKDKNFGLELIVRKHETRKKKEIAE [←] PMLELEHINRAT [←] MDLNNFQHFVEVQDDYV [←] LCFVPSDDHRRGERSNGNMESESEFSDTTEETDDYDRSRRLDRYDAMEDSLSRQDE	545
ScSkylp	NKSKNFGLELIVRKHETRKKKEIAE [←] PMLELEHINRAT [←] MDLNNFQHFVEVQDDYV [←] LCFVPSDDHRRGERSNGNMESESEFSDTTEETDDYDRSRRLDRYDAMEDSLSRQDE	742
hSRPK1	HITKLRKPS [←] FVIVVYVNSQBEAAGFTD [←] PMLELEHINRAT [←] MDLNNFQHFVEVQDDYV [←] LCFVPSDDHRRGERSNGNMESESEFSDTTEETDDYDRSRRLDRYDAMEDSLSRQDE	645
hSRPK2	HITKLRKPS [←] FVIVVYVNSQBEAAGFTD [←] PMLELEHINRAT [←] MDLNNFQHFVEVQDDYV [←] LCFVPSDDHRRGERSNGNMESESEFSDTTEETDDYDRSRRLDRYDAMEDSLSRQDE	676
TbSRPK	ETARYLAGHSLLEASLAKRGLTILDIAVLGQQLEDEERQAAATEIIRLLSEADSSDGHCADREDDGSDNSVDFSDSSCTND	720
TcSRPK	DSAQFLGTFFPLPGSLEKRRGLSLLDIHDLLAGKLELDPAAHKSAL [←] EVIIHLLSEEAADTRGEGHADRDGDATSRVEELNNSIGDAGSD	715
SpDsk1	-----	
ScSkylp	-----	
hSRPK1	-----	
hSRPK2	-----	

Figura 38. Comparación de secuencias aminoacídicas de distintas SRPKs de metazoos con las SRPKs de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Las secuencias aminoacídicas de SRPKs de humanos: hSRPK1 y hSRPK2, *S. pombe*: Dsk1, *S. cerevisiae*: Sky1p se alinearon con TcSRPK y TbSRPK mediante el programa CLUSTALW. Los aminoácidos conservados se indican con un sombreado gris, mientras que los idénticos están en sombreados con negro. Los distintos dominios están indicados por sus nombres por debajo. Los asteriscos indican aminoácidos importantes para la actividad (ver texto), que forman parte de estructuras terciarias de la proteína, como se indica en Nolen, 2000. ⊗ indica el residuo ácido Glutámico (Q) altamente conservado en proteínas de la familia. Las flechas → y ← indican el fragmento correspondiente al EST TENS 2583 obtenido de las bases de datos y amplificado por PCR. Resaltado en amarillo, se observa la putativa señal de exportación nuclear (NES). En rojo, se indica la señal de exportación nuclear (NES) de Dsk1. Números de acceso de las proteínas comparadas: hSRPK1, NP 003128; hSRPK2, NP 003129; Sky1p, NP 013943; Dsk1, NP 595327; TcSRPK AY101382 y TbSRPK no tiene número de acceso aún.

Resulta evidente al ver las figuras 38 y 39, que la estructura general de TcSRPK y TbSRPK están altamente conservada desde las levaduras y trypanosomátidos hasta los mamíferos.

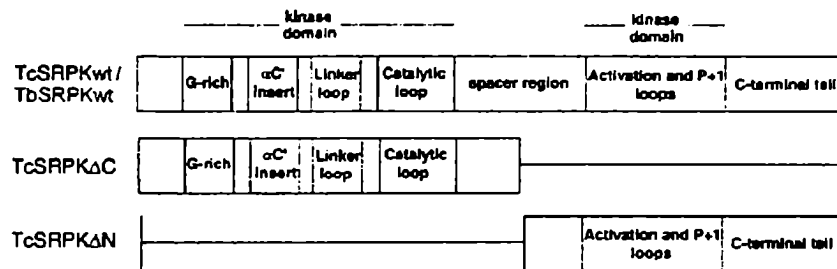


Figura 39. Esquema de la estructura de TcSRPK, TbSRPK. La estructura de las quinasas de proteínas de Trypanosomátidos está conservada. En esta figura se muestran solo los dominios importantes reconocidos en todas las quinasas de la familia. La figura no está en escala. Además, se muestra la estructura de dos mutantes, TcSRPKΔC y TcSRPKΔN, utilizadas en ensayos relevantes de esta Tesis (ver texto).

La parte N-terminal de la proteína contiene el dominio de anclaje del fosfato o "phosphate anchor", rico en residuos de glicina. Este dominio, junto a los aminoácidos perfectamente conservados lisina 194 y 292, glutamina 204, aspártico 290 y 406 forman el bolsillo de unión de ATP ("ATP-binding pocket", Nolen, 2000; figura 38). Una de las características más sobresalientes de esta familia de proteínas, es el hecho de que son constitutivamente activas, es decir que no requieren modificaciones post-traduccionales, factores o co-factores de ningún tipo para estar activas, in vitro. Este parece ser el caso de TcSRPK y TbSRPK, ver más abajo. Nolen (2000) postuló que la conformación constitutivamente activa de estas proteínas, puede atribuirse a una inserción que permite la formación de una hélice alfa, llamada "α hélice C'" de aproximadamente 11 aminoácidos en Sky1p, entre αC y β4. Esta inserción interactúa con αC de una forma que permite la interacción de dos residuos altamente conservados Lis 187 en β3 y Glu 202 en αC. La Lis 187 es esencial, ya que contacta a los fosfatos α- y β- del ATP. Tanto TcSRPK como TbSRPK poseen una pequeña inserción que puede formar una alfa

hélice extra en esa posición (aminoácidos 214 a 219; figura 38), así como los residuos lisina y glutámicos conservados (en las posiciones 194 y 204, respectivamente, en TcSRPK y TbSRPK, con quienes interactúan. La estructura cristalográfica de Sky1p predice que para mantener la conformación activa, el residuo tirosina 283 en αE interactúa con los residuos Asparagina 210 y aspártico 213 en las alfa hélices C y C' respectivamente. No encontramos un residuo aromático en una posición análoga a la tirosina 283, ni un residuo con un grupo carbonilo en la posición 210, pero el residuo aspártico 213, parece estar altamente conservado, en todas las SRPKs. Esta diferencia, puede resultar importante en la regulación de la actividad de TcSRPK y TbSRPK. Otro dominio característico de esta familia, es el llamado "linker loop" (Wang, 1998). Este "loop" se encuentra conservado en las proteínas clonadas, y su función no ha sido identificada aún. Un dominio muy particular que presenta diferencias entre las proteínas de *T. cruzi* y *T. brucei*, es el llamado "dominio espaciador" o "spacer domain", ya que delimita a la proteína en dos brazos, separando los dominios de unión del fosfato, "linker loop" y "loop catalítico", en la parte N-terminal, de los dominios de Activación y P+1, en la parte C-terminal. Además, el nombre de este dominio espaciador, indica que en un principio, no se lo consideraba importante en la actividad de la proteína, pensando que tenía solo una función estructural, en el mejor de los casos. Trabajos realizados por Takeuchi (1993) y Fukuda (1997), mostraron que la región espaciadora, contiene una secuencia rica en leucinas o aminoácidos hidrofóbicos, que permitiría la localización nuclear de Dsk1. Dsk1 es la única SRPK en la que se ha demostrado la existencia de una señal de exportación nuclear. Fukuda y colaboradores demostraron elegantemente que Dsk1 entra y sale del núcleo, al inhibir con leptomicina B, la exportación nuclear. En esos experimentos, Dsk1 se acumula en el núcleo. La señal de exportación nuclear en Dsk1 que, al ser mutada la acumula en el núcleo, es: 308-SLEGAVSEISLRD-320. La exportación, en el caso de Dsk1 es mediada por CRM1. Buscando en la secuencia

protéica de TcSRPK y TbSRPK, encontramos una posible señal de exportación. Desde ya, este análisis es teórico y requerirá un soporte experimental, que está siendo realizado en esos momentos. Las posibles secuencias de exportación nuclear de las quinasas de Trypanosomátidos están en la región espaciadora y son, para TcSRPK: 315-PPPLHQRLRLVERD-328 y para TbSRPK: 321- PPPLHDRPSLVKRD-334.

Cualquiera sea el resultado experimental de esta hipótesis, se considera que la región espaciadora cumple funciones regulatorias, pero, amén de la señal de exportación nuclear NES, nuclear export signal, no se han encontrado otros dominios funcionales (ver Discusión).

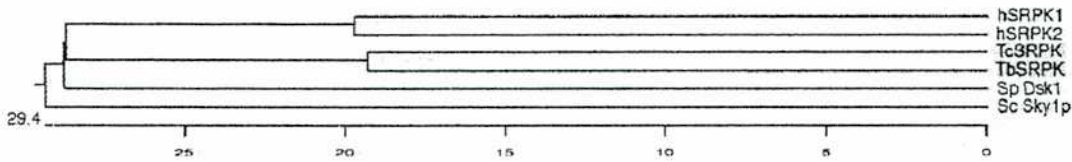
Como dijimos, las SRPKs no requieren ser fosforiladas para su actividad, in vitro. Para aquellas proteínas que si lo requieren, el "*Activation loop*" es fosforilado. Esto promueve un cambio conformacional que permite la unión al sustrato y/o la catálisis (Johnson, 1996 y 1998). Estas quinasas "no-SRPK" tienen un aminoácido cargado positivamente, muy conservado, inmediatamente antes del residuo aspártico catalítico. Las SRPK no necesitan este tipo de mecanismo de activación. Tienen, en cambio, un residuo treonina característico inmediatamente antes del aspártico catalítico. Este residuo, se encuentra altamente conservado entre las SRPK incluidas TcSRPK y TbSRPK. Nolen mostró que el "*activation loop*" está constitutivamente activado, en las SRPKs, posiblemente debido a interacciones con regiones no conservadas en el extremo C-terminal. Esta característica es muy interesante particularmente en nuestro caso, considerando el hecho que este extremo no está conservado y es particularmente largo en las quinasas de Trypanosomas. Esto podría tener alguna implicancia en la regulación de la actividad de TcSRPK y TbSRPK.

El último dominio que analizaremos, es el "*loop P+1*". Este loop contacta la posición o residuo +1, a continuación del residuo señal blanco. Como ocurrió con los otros dominios, este loop contiene aminoácidos altamente conservados entre las SRPKs,

incluyendo un residuo único en esta familia, la glutamina 566 en Sky1p, 424 en TcSRPK y 421 en TbSRPK. Este aminoácido, junto a otros residuos conservados en el dominio P+1, parecen jugar un rol importante en el reconocimiento del sustrato y unión a proteínas SR. Este análisis de homologías sugiere la posibilidad de que las SRPK de Trypanosomas posean una actividad conservada, aunque también abre la posibilidad de que existan diferencias sutiles en la regulación de dicha actividad.

	P-3		P-2		P+1			
	596	570	568	571	563	565	566	615
TbSRPK	E	Y	R	R	D	V	Q	D
TcSRPK	E	Y	R	R	D	V	Q	D
Dsk1	E	Y	R	R	N	V	Q	D
Sky1p	E	Y	R	R	N	I	Q	D
hSRPK1	E	Y	R	R	E	I	Q	D
hSRPK2	E	Y	R	R	E	I	Q	D

Tabla III. Alineamiento de los residuos de diferentes quinasas de la familia, que están en contacto con la serina blanco. P-3, P-2 y P+1 son posiciones aminoacídicas relativas a la serina blanco, siendo P-3, P-2 y P+1 la posición -3, -2 y +1 respecto de dicha serina, respectivamente. Nótese el alto grado de homología entre todas las quinasas de la familia. En la posición +1 se observan las únicas diferencias (posiciones 563 y 565), aunque todas son conservativas, manteniendo la naturaleza de la posición.



Porcentajes de Similitud								
	1	2	3	4	5	6		
1		55.9	32.0	35.1	27.3	27.3	1	hSRPK1
2	39.4		30.5	37.3	26.1	25.8	2	hSRPK2
3	61.7	65.9		42.1	26.5	25.4	3	ScSky1p
4	58.3	56.3	53.7		32.5	31.6	4	SpDsk1
5	57.1	57.1	64.1	56.6		57.7	5	TcSRPK
6	57.9	57.4	63.9	58.7	38.5		6	TbSRPK
	1	2	3	4	5	6		

Figura 40. Panel superior. Árbol filogenético de proteínas quinasa de la familia SRPK. Árbol filogenético de las distintas SRPKs realizado en base al alineamiento de la figura 38 con el programa MegAlign (versión para MacIntosh). Se observa que las quinasas de Trypanosomátidos están agrupadas. **Panel inferior. Tabla mostrando los porcentajes de Similitud entre las distintas quinasas.** Los porcentajes de Similitud indican que ambas quinasas de Trypanosomátidos están altamente relacionadas. Luego, siguen en orden de relación de mayor a menor SpDsk1, hSRPK1, hSRPK2 y ScSky1p para TbSRPK y SpDsk1, hSRPK1, ScSky1p y hSRPK2 para TcSRPK. Calculado con el programa MegAlign (versión para MacIntosh).

3. Análisis de la expresión de TcSRPK en *Trypanosoma cruzi*.

Una característica particular en el control de la expresión génica en Trypanosomatidos es, como dijimos en la Introducción, que es ejercida principalmente a nivel del procesamiento de mRNA, y no a nivel de la transcripción. Quisimos estudiar, en primer lugar, si *tcsrpk* se expresaba en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Para ello, purificamos RNA del parásito y realizamos un ensayo de Northern blot, con el gen completo de *tcsrpk* como sonda. La figura 41 muestra que *tcsrpk* se expresa en este estadio del parásito, y que el mensajero posee un tamaño de 3 kilobases aproximadamente.



Figura 41. Northern blot de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se utilizaron 15 µg de RNA del estadio epimastigote de *Trypanosoma cruzi* en un ensayo de Northern blot como se detalla en Materiales y Métodos y se hibridizaron con una sonda correspondiente al gen completo de *tcsrpk*. Se indican los tamaños de los RNA ribosomales del parásito.

En ensayos de Western blot (figura 42), detectamos una banda única de aproximadamente 83 KDa coincidente con el tamaño molecular predicho en función de la secuencia primaria de la proteína (81738 Da).

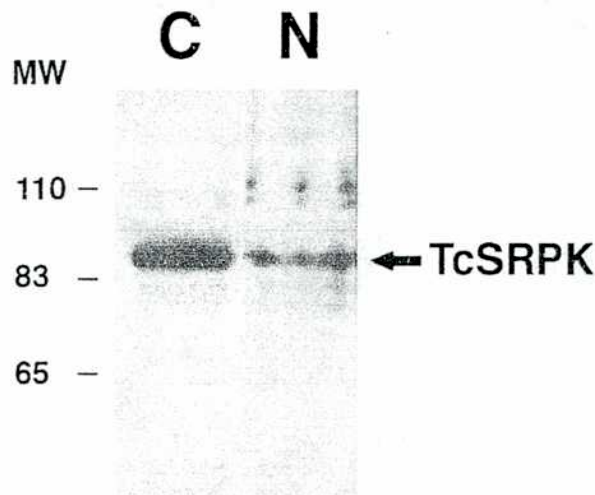
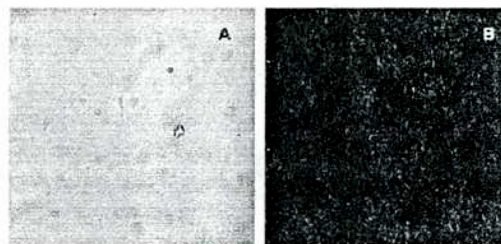


Figura 42. Ensayo de Western blot con extractos totales de *Trypanosoma cruzi*. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos, con entre 30 y 50 µg de proteína total por ensayo. La fracción citoplasmática "C" o nuclear "N" se hibridizó por igual, con el anticuerpo policlonal contra TcSRPK recombinante. Se indican los marcadores de peso molecular.

Resulta interesante, el hecho que la banda reconocida por el anticuerpo policlonal hecho en ratón, contra la proteína expresada en *Escherichia coli*, esté tanto en la fracción citoplasmática como nuclear. Este resultado, respalda la hipótesis del tránsito de TcSRPK inferida en base a la secuencia primaria. Además, se postula Wang (1998) que estas proteínas entran y salen del núcleo, cosa que es consistente con funciones en la modulación/regulación del splicing y/o ciclo celular.

Quisimos estudiar la localización subcelular de TcSRPK con un poco mas de detalle y de manera independiente al ensayo de Western blot. Para ello realizamos inmunofluorescencias (IFI) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (figura 43), con anticuerpos policlonales contra TcSRPK.



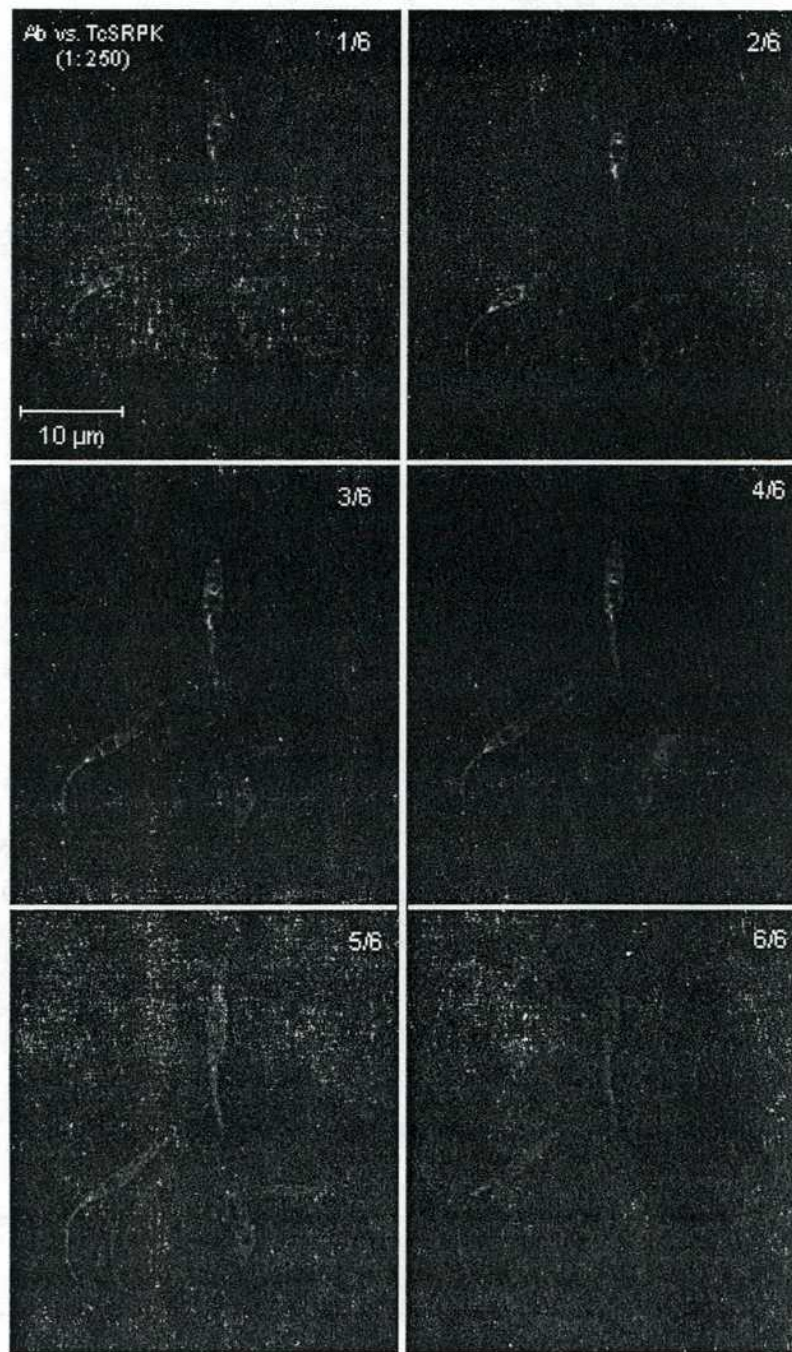


Figura 43. Localización subcelular de TcSRPK. Panel superior. Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, se fijaron, permeabilizaron y se sometieron al protocolo de Inmunofluorescencia (IFI) como se indica en Materiales y Métodos. El panel A es una fotografía tomada a 400 aumentos de un parásito incubado con el suero preinmune, y la fotografía del panel B es del mismo parásito con el filtro de fluorescencia. Un segundo control negativo realizando la incubación solo con el anticuerpo secundario (acoplado al fluoróforo) tampoco arrojó ninguna señal. **Panel inferior. Cortes longitudinales realizados con el microscopio confocal.** La figura muestra seis cortes de 1 µm de profundidad realizados sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubado con Ab contra TcSRPK. Las condiciones del ensayo se detallan en Materiales y Métodos. En los paneles 3/6, 4/6 y 5/6 se distingue un patrón de fluorescencia en el núcleo.

Se ve claramente que la proteína es mayormente citoplasmática y en mucho menor medida, nuclear. Estos resultados concuerdan con el Western blot y con la posible señal de exportación nuclear que se describió en la primera parte. La localización nuclear de las SRPKs ha sido motivo de controversias muy interesantes en distintos trabajos. El eje de la discusión, está en que las SRPKs de humanos no parecen encontrarse en el núcleo, aunque algunos autores (Jamar Tazi, por ejemplo, en trabajos inéditos) opinan lo contrario, al menos en parte del ciclo celular. Asimismo, el hecho de que hSRPK1 haya sido descrita como una quinasa activa en mitosis (Gui, 1994), es decir, que fosforila proteínas SR, en esa etapa del ciclo celular, y dado que la membrana celular desaparece en ese momento, se cree que esa es la razón principal del por qué las SRPKs pueden fosforilar proteínas SR. En tales circunstancias, no es necesario postular una migración al núcleo o que cumplan una función de "devolver al núcleo" las proteínas SR desfosforiladas (ver Discusión). De todas formas, nuestra evidencia, tanto como la de otros investigadores indica que nuestra SRPK, TcSRPK, se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo.

4. Estudio de la especificidad de sustrato de TcSRPK.

Además de ser altamente específicas para proteínas SR, las SRPKs pueden fosforilar *in vitro*, la "proteína básica de mielina" (MBP), pero no Histona H1 (H1) o β -Caseína. Este es un patrón de fosforilación exclusivo de esta familia de proteínas, y que puede ser usado para "diagnosticar" rápida y sencillamente a una proteína como SRPK.

Para comenzar a estudiar la actividad de TcSRPK, realizamos en primer lugar ensayos de actividad quinasa, utilizando estos tres sustratos: MBP, H1 o β -Caseína y TcSRPK recombinante, expresada en *Escherichia coli*, con un "tag" de histidinas (ver Materiales

y Métodos). Como era de esperar para una proteína de la familia SRPK, TcSRPK fosforiló MBP y no pudo hacerlo con H1 ni con β -Caseína (figura 44). Por otro lado, todas las proteínas SR ensayadas fueron fosforiladas, enmarcando la actividad in vitro de TcSRPK dentro de la familia de SRPKs.

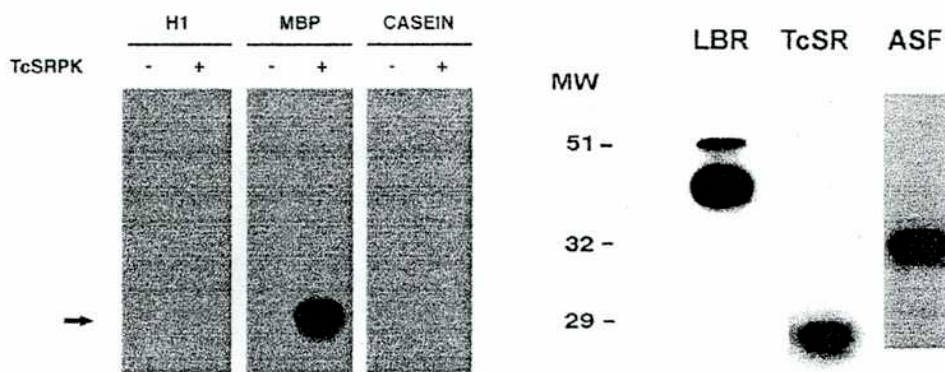


Figura 44. Ensayos de fosforilación in vitro con TcSRPK recombinante y diferentes sustratos. Panel de la izquierda. Ensayo de fosforilación in vitro con sustratos universales. Se incubaron aproximadamente 50 ng de TcSRPK con 1 μ g de cada sustrato por 30 minutos a 30°C y se detuvo la reacción como se indica en Materiales y Métodos y los distintos productos se separaron en un SDS-PAGE 12%. Los distintos sustratos fosforilados se revelaron por autoradiografía. **Panel de la derecha.** Ensayo de fosforilación in vitro con TcSRPK como quinasa y 1 μ g de diferentes proteínas SR como sustratos. LBR: (Receptor de Lamina B o Lamin B Receptor), TcSR: *Trypanosoma cruzi* SR protein, ASF: Associated Splicing Factor (ASF/SF2). El ensayo se realizó como en el panel izquierdo y como se detalla en Materiales y Métodos.

Las SRPKs son quinasas de serinas, pero lo que le da a estas proteínas una de sus principales características, es el hecho de que necesitan el residuo arginina en la posición +1 o -1 respecto de la serina que será fosforilada. De ahí que sean quinasas específicas de proteínas SR. Wang, (1998), mostró que la secuencia consenso para que la SRPK1 y 2 de humanos fosforilen proteínas SR, es "RSR", en donde las argininas son esenciales para la actividad enzimática. Todas las proteínas SR descritas, incluyendo TcSR, poseen estas secuencias. Para incluir a TcSRPK como un miembro de la familia de proteínas SRPK es importante determinar si esta proteína presenta la misma dependencia de argininas para la actividad. Para esto, expresamos diferentes proteínas mutantes de ASF/SF2 (Cáceres, 1993), e investigamos la

capacidad de TcSRPK para fosforilarlas en ensayos de actividad quinasa in vitro (figura 45). Estas mutantes han sido estudiadas en varios trabajos anteriormente (Colwill, 1996; Siebel, 1999) y todas las proteínas SRPK mostraron la misma actividad.

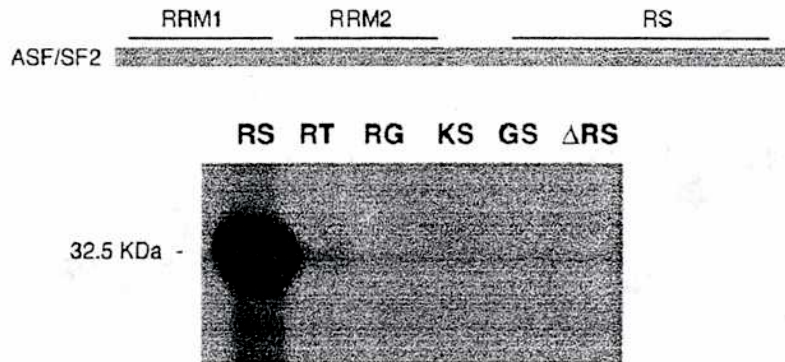


Figura 45. TcSRPK es una quinasa de proteínas SR, dependiente de argininas en la posición +/- 1 de la serina blanco. Se expresaron las diferentes mutantes del dominio RS de proteína ASF/SF2 (se muestra un esquema en la parte superior de la figura) generosamente donadas por Javier Cáceres (Edinburgo) en *E. coli* y se purificaron por una columna de afinidad utilizando el tag de histidinas. Se utilizó 1 µg de cada mutante en los ensayos quinasa, realizado como se indicó en las dos figuras previas. Las proteínas utilizadas son: RS: proteína wild type; RT: mutante de serinas a treoninas; RG: mutante de serinas a glicinas; KS: mutante de argininas a lisinas; GS: mutante de argininas a glicinas; ΔRS: mutante con todos los dipéptidos RS del dominio delecionados.

TcSRPK no fue una excepción, y mostró la actividad de fosforilación esperada para una típica SRPK. La figura 45 muestra que fosforiló la proteína ASF/SF2 salvaje como se esperaba y mucho mas eficientemente que cualquiera de las otras mutantes. Se ve claramente que la mutante en la todas las serinas del dominio RS han sido mutadas a treonina (mutante RT) es levemente fosforilada. No sabemos si esta fosforilación puede deberse a una actividad serina/treonina residual de TcSRPK o bien una similitud conformacional entre la serina y la treonina. Nos inclinamos por esta segunda hipótesis ya que la mutante KS, en la que las argininas del dominio RS, en lugar de las serinas, han sido mutadas a lisinas (K) también pudo ser fosforilada, aunque mínimamente. La lisina y la arginina son estructuralmente similares.

Más importante aún, resulta el hecho de que las mutantes con todas serinas intactas, pero en las que las argininas han sido mutadas a lisinas (KS) o glicinas (GS) no fueron fosforiladas. Si TcSRPK fuera una quinasa de serinas hubiera fosforilado estas mutantes también. Por lo tanto, podemos afirmar que TcSRPK es, *in vitro*, una auténtica proteína SRPK.

5. TcSRPK restaura el fosfoepitope reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb104, en ASF/SF2.

Es bien sabido que las SRPKs fosforilan proteínas SR en sus dominios RS. Una vez fosforiladas, tanto *in vivo* como *in vitro*, las proteínas SR pueden ser reconocidas por el anticuerpo monoclonal mAb104 (Roth, 1990). Todos los miembros de la familia SRPK restauran la reactividad a dicho anticuerpo, de las proteínas SR expresadas en bacterias (Siebel, 1999; Tang, 1998; Colwill, 1996). Aunque la fosforilación del dominio RS es necesaria para la actividad de las proteínas SRs, no está claro si el fosfoepitope reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb104 debe estar presente en las proteínas SR para que estas estén activas. Nos interesó investigar, entonces, si TcSRPK podía restaurar dicho fosfoepitope.

Para ello, hicimos un ensayo de actividad quinasa *in vitro* con ASF/SF2 recombinante expresada en bacterias, que obviamente no está fosforilada, con y sin TcSRPK, y luego realizamos un Western blot con el anticuerpo monoclonal mAb104. Como control positivo, incluimos una calle con extracto nuclear (EN) de células HeLa. En esas células, las proteínas SR se encuentran ya fosforiladas y son reconocidas por el anticuerpo monoclonal, sin necesidad de fosforilarlas con ninguna quinasa.

Como se muestra en la figura 46, TcSRPK pudo restaurar el fosfoepitope en ASF/SF2 recombinante. Resulta interesante que TcSR no pudo ser reconocida por el anticuerpo

monoclonal, a pesar de que TcSRPK puede fosforilarla (resultado no mostrado). No sabemos si esto implica algún tipo de diferencia a nivel funcional de TcSR, ya que nuestros resultados con esta proteína no presentaron ninguna diferencia con otras proteínas SR, aunque, claro está, no podemos descartarlo debido a que nuestros ensayos fueron realizados en sistemas heterólogos.

El hecho de que TcSRPK haya podido restaurar el fosfoepítipo reconocido por mAb104, es indicativo del grado de conservación de la actividad de TcSRPK.

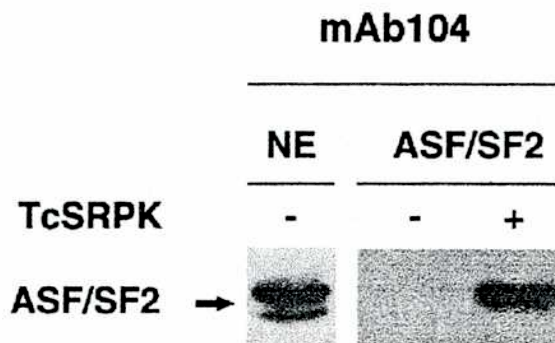


Figura 46. TcSRPK restaura el fosfoepítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb104. Se incubaron 1 µg de ASF/SF2 recombinante expresada en *E. coli* o 50 µg (15 µl) de Extracto nuclear (NE) de células HeLa con 50 ng de TcSRPK recombinante purificada. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos (30 minutos a 30°C). Los productos se separaron en un SDS-PAGE 12%, y se realizó el ensayo de Western blot con el mAb104 (1:20).

6. Estudio de la actividad de TcSRPK y TbSRPK in vivo en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

6.1 Sobre-expresión de TcSRPK y TbSRPK en la cepa salvaje 1913, de *Schizosaccharomyces pombe*.

Hemos probado hasta aca, que TcSRPK y TbSRPK presentan un significativo grado de homología con todos los miembros de la familia de proteínas SRPK tanto a nivel de estructura primaria como en los ensayos de fosforilación in vitro. Por esta razón, nos preguntamos si nuestras quinasas se comportarían como verdaderas SRPKs en

sistemas in vivo. En primer lugar, utilizamos el sistema de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, en el cual, la sobre-expresión de la SRPK endógena, Dsk1, produce un fenotipo elongado asociado con un bloqueo del ciclo celular en la progresión de G₂ a M, posiblemente debido a problemas en el procesamiento del pre-mRNA (ver Parte I, punto 7.1). Tang (2000), mostró que la sobre-expresión de hSRPK1 también producía el clásico fenotipo elongado logrado luego de la sobre-expresión de Dsk1, lo que indicaba que las SRPKs de diferentes organismos eran realmente homólogos funcionales. Siguiendo esta lógica, colocamos los genes de *tcsrpk* y *tbsrpk* bajo el control del promotor *nmt1*^{*} en el plásmido de expresión pREP1 (Maundrell, 1993). Luego de 20 a 25 hs en condiciones "no reprimidas", es decir en ausencia de tiamina, se midieron los largos celulares. Como puede verse en la figura 47, la gran mayoría de la población que sobre-expresaba TcSRPK o TbSRPK estaba muy elongada, al compararlas con células transformadas con el vector solo, pREP1/-.



Figura 47. Sobre-expresión de TcSRPK y TbSRPK en la cepa salvaje 1913 de *S. pombe*. Los cultivos inducidos (ver Materiales y Métodos) se fijaron y analizaron al microscopio óptico (aumento 400X). El panel de la izquierda es un cultivo transformado con el plásmido control (pREP1/-), los paneles central y derecho, son de cultivos transformados con los plásmidos que sobre-expresan TcSRPK y TbSRPK, respectivamente (pREP1/TcSRPK y pREP1/TbSRPK).

Para saber si este efecto era atribuible a la actividad de las proteínas quinasas o bien a interacciones inespecíficas, como la competencia por factores debido a la sobre-expresión, repetimos el experimento, pero en lugar de utilizar el gen completo de *tcsrpk*, utilizamos dos mutantes, inactivas. Las mutantes TcSRPK Δ N y TcSRPK Δ C son

inactivas en ensayos de actividad quinasa in vitro (no mostrado), y cada una contiene diferentes dominios de la proteína completa. La sobre-expresión de cualquiera de estas mutantes, genera una mínima elongación, comparada con células transformadas con la quinasa completa. Esto indica que la elongación producida por esta última, podría ser atribuida a la actividad quinasa. Para demostrar que las células elongadas tenían el ciclo celular interrumpido y no habían entrado en mitosis, teñimos células elongadas, mutantes y control, con DAPI, y analizamos la presencia de uno o dos núcleos. Se ve muy claramente en la figura 48 que las células que sobreexpresan TcSRPK poseen un solo núcleo, mientras que las control y las mutantes también, aunque algunas de estas están en mitosis. Esto demuestra que las células que sobre-expresan TcSRPK son células que han arrestado el ciclo celular.

Transformante	cepa	Largo celular promedio (μm) \pm S.E.M.	n
pREP1/-	1913 (wt)	7.1 \pm 0.19	109
pREP1/TbSRPKwt	1913 (wt)	11.35 \pm 0.73 (*)	64
pREP1/TcSRPKwt	1913 (wt)	14.25 \pm 0.96 (*)	51
pREP1/TcSRPK Δ N	1913 (wt)	8.00 \pm 0.23	67
pREP1/TcSRPK Δ C	1913 (wt)	8.48 \pm 0.24	109

Tabla IV. La sobre-expresión de TcSRPK y TbSRPK produce una población de células elongadas. Se muestran los valores de largo poblacional medios obtenidos con la sobre-expresión de ambas quinasas en *S. pombe*, así como de las dos mutantes de TcSRPK, TcSRPK Δ C y TcSRPK Δ N. La cepa 1913, es una cepa salvaje. Los valores de longitud están medidos en micrómetros \pm la media del error estándar. El *n* indica el número de células medidas en total. El experimento fue realizado 4 veces, y arrojó resultados muy similares.

(*) ANOVA $p < 0.005$

Cuando se graficaron los porcentajes de células del cultivo, en función de los largos celulares, se vió (figura 49), que existe un "corrimiento" pronunciado hacia formas elongadas al sobre-expresar tanto TcSRPK como TbSRPK, comparado con los largos celulares de las células del cultivo control, transformado solo con el plásmido pREP1-, sin inserto.

Un control realizado transfectando la misma cepa salvaje 1913 con las versiones mutantes de TcSRPK (TcSRPK Δ N y TcSRPK Δ C; ver figura 39), mostró que la distribución de frecuencias de las proteínas mutantes control no es significativamente diferente del control con el vector solo (figura 50 y Tabla IV).

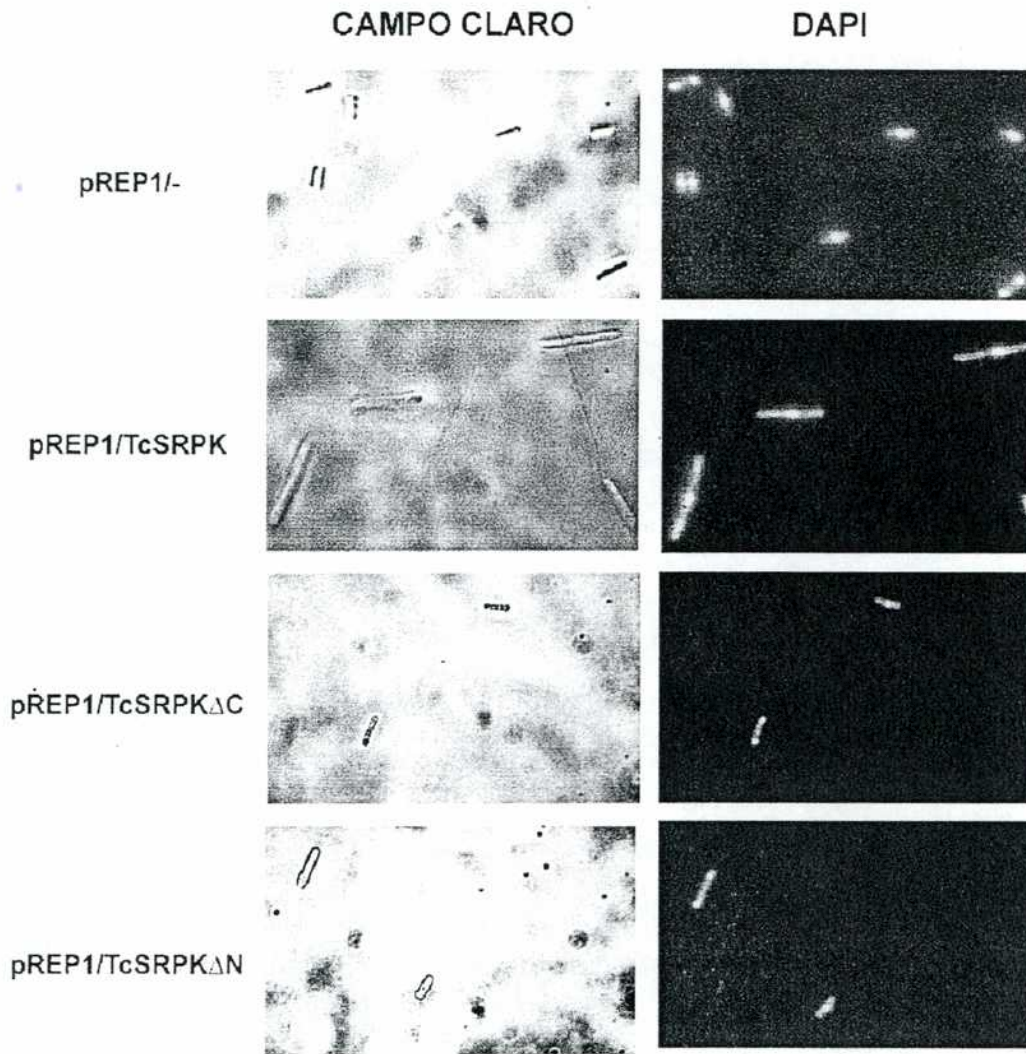


Figura 48. Tinción con DAPI de las células de *Schizosaccharomyces pombe*, cepa salvaje 1913. Se inoculó medio mínimo EMM2 sin tiamina con células de los cultivos de la cepa 1913 transformados con las distintas construcciones que se indican a la izquierda de la figura crecidos en presencia de tiamina. De esta forma, se permitió la desrepresión del promotor de *nmt1*⁺. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, se lo mantuvo en esa fase mediante el agregado de medio fresco, diluyéndolo. Luego de 20-25 hs en crecimiento exponencial, se fijaron las células por calor, y se tiñieron con reactivo DAPI como se indica en Materiales y Métodos. Las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia y se tomaron las fotografías a 400 aumentos.

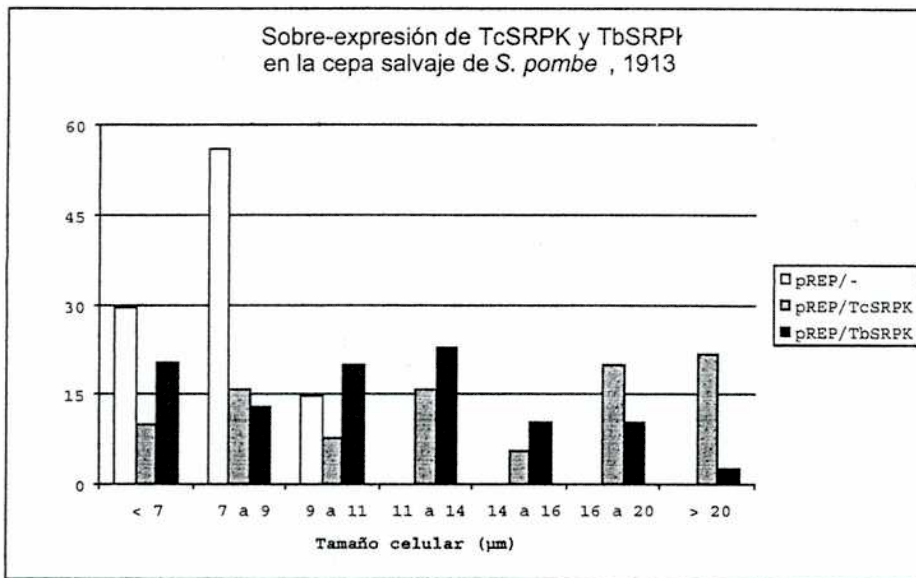


Figura 49. Distribución de frecuencias de los largos celulares luego de la sobre-expresión de ambas quinasas. La sobre-expresión de ambas quinasas se realizó como se indicó anteriormente. Se agruparon las células de acuerdo a su largo, en conjuntos arbitrarios. Las barras blancas, rojas y negras representan la distribución de frecuencias de las poblaciones transformadas con el vector control vacío (pREP1/-), con el vector que expresa TcSRPK (pREP1/TcSRPK) o TbSRPK (pREP1/TbSRPK), respectivamente.

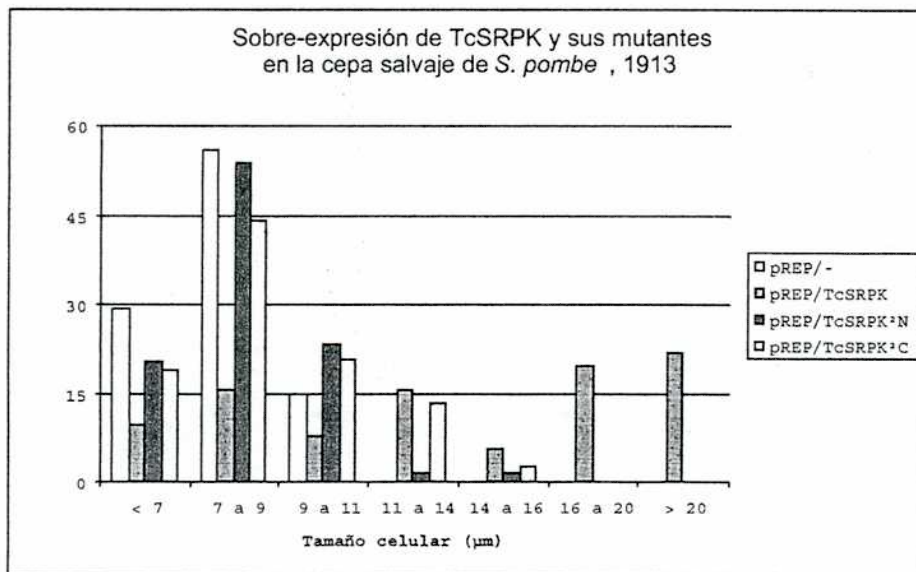


Figura 50. Distribución de frecuencias de los largos celulares luego de la sobre-expresión de TcSRPK y las mutantes. La sobre-expresión de las proteínas salvaje y mutantes se realizó como se indicó anteriormente. Se agruparon las células de acuerdo a su largo, en conjuntos arbitrarios. Las barras blancas, rojas, verdes y amarillas representan la distribución de frecuencias de las poblaciones transformadas con el vector control vacío (pREP1/-), con el vector que expresa TcSRPK (pREP1/TcSRPK), TcSRPK Δ N (pREP1/TcSRPK Δ N) o TcSRPK Δ C (pREP1/TcSRPK Δ C), respectivamente.

6.2 Complementación de la cepa doble mutante 2D4 con TcSRPK y TbSRPK.

Uno de los ensayos mas significativos de homología funcional entre determinadas proteínas es la complementación o rescate de actividad de mutantes sin el gen en cuestión. Existe una cepa mutante de *S. pombe*, 2D4 utilizada para determinar la homología entre quinasas de proteínas SR (ver Resultados Parte I). Esta doble mutante ($\Delta dsk1^+$, $\Delta kic1^+$), tiene la particularidad de no crecer en medio mínimo EMM2. Cuando la actividad quinasa de proteínas SR es rescatada, esta cepa recupera la habilidad de crecer en medio EMM2. Realizamos el ensayo de transformación de esta cepa 2D4, y, como se observa en la figura 51, ambas SRPK de Trypanosomátidos pudieron rescatar el fenotipo mutante, mientras que ninguna de las proteínas delecionadas (TcSRPK Δ C o Δ N) pudo hacerlo (figura 52).

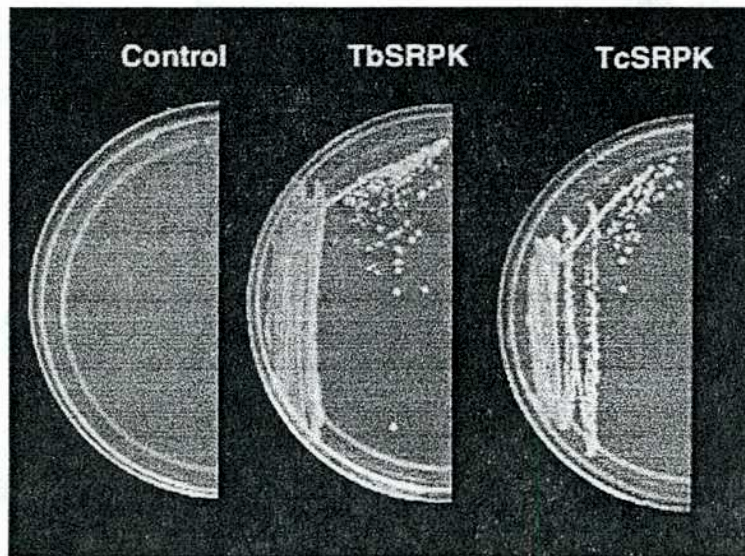


Figura 51. TcSRPK y TbSRPK rescatan el fenotipo mutante de la cepa mutante 2D4 de *Scizosaccharomyces pombe*. La expresión (no sobre-expresión) de las proteínas SRPK de Trypanosomátidos en la cepa mutante doble 2D4 rescata el fenotipo mutante (formación de microcolonias en medio mínimo EMM2). El panel indicado como "control", representa una estria de población de mutantes 2D4 transformadas con el vector control, vacío, que forma microcolonias. Las levaduras de los paneles indicados TbSRPK y TcSRPK fueron transformadas con los vectores pREP1/TbSRPK y TcSRPK, respectivamente. Las placas se incubaron a 33° C por 3 días.

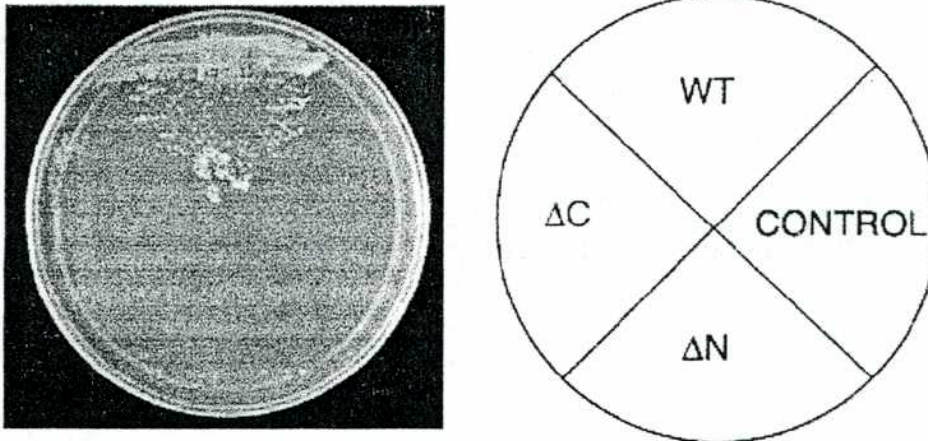


Figura 52. TcSRPK, pero no las mutantes deletionadas ΔN y ΔC rescatan el fenotipo mutante de la cepa mutante 2D4 de *Scizosaccharomyces pombe*. La expresión (no sobre-expresión) de la proteína SRPKs (o mutantes) en la cepa mutante doble 2D4 rescata el fenotipo mutante (formación de microcolonias en medio mínimo EMM2). El panel de la derecha es un esquema de las estrías realizadas en la placa del panel de la izquierda. Ver figura 51 y Materiales y Métodos.

Concluimos de estos experimentos, que las SRPKs que clonamos son homólogas funcionales de las SRPKs de eucariotas superiores.

7. TcSRPK y TbSRPK modulan la actividad splicing alternativo funcional en células HeLa.

Los resultados obtenidos con las levaduras resultaron altamente alentadores, pero no representaban una medición directa de la actividad de la quinasa. Para tener una idea mas concreta de ello, decidimos estudiar, la capacidad de TcSRPK de modular la actividad de splicing en una reacción directa. Dado que TcSR mostró una actividad de inclusión del exón alternativo EDI significativa, quisimos ver si la co-transfección de TcSRPK en células HeLa podía modular la actividad de TcSR. Además, por supuesto, de incluir TcSRPK junto a ASF/SF2 y analizar la capacidad de la primera de modular la actividad de la proteína SR de mamíferos.

La figura 53 muestra la cuantificación de dichos experimentos, realizados como se indicó en las figuras 27 y 28 para TcSR y en Materiales y Métodos.

En el panel A, se muestra el experimento realizado con TcSR. Se ve que TcSR aumenta la inclusión de EDI de manera que es dependiente de la dosis, como se había visto anteriormente (columnas negras). La transfección de TcSRPK aumenta la inclusión basal de EDI, posiblemente gracias a la fosforilación de sustratos endógenos, entre ellos, proteínas SR.

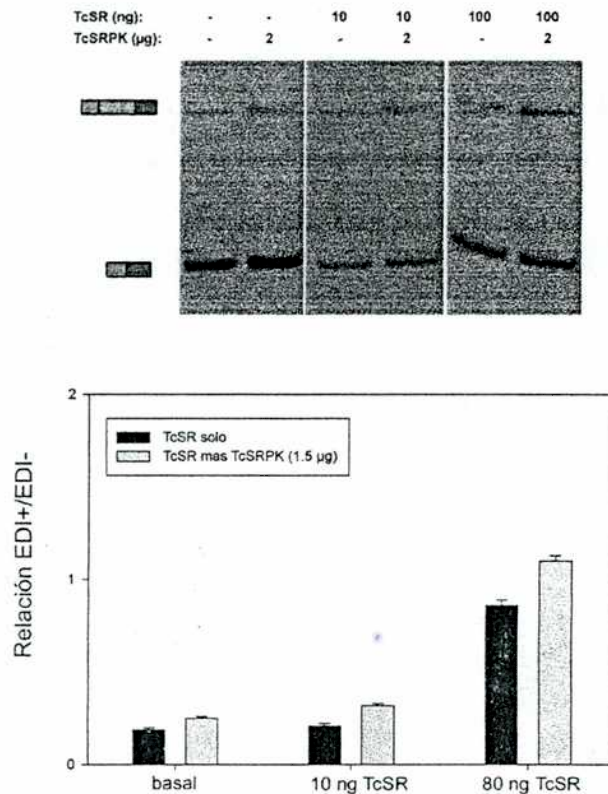


Figura 53. TcSRPK modula la actividad activadora del splicing alternativo de TcSR en células HeLa. **Panel superior.** Gel nativo mostrando las dos formas de splicing alternativo del minigen de fibronectina. **Panel inferior.** El ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Las columnas indicadas como "basal" representan el cálculo de la relación entre inclusión del exón alternativo EDI (EDI+) y exclusión del exón EDI (EDI-) de células transfectadas sin el vector de expresión de TcSR (pCG/TcSR) ni de TcSRPK (pCG/TcSRPK), pero con el vector control vacío (pCG/-) (barra negra), o sin pCG/TcSR pero con pCG/TcSRPK (1.5 µg) (barra gris). Las columnas indicadas como "10 ng TcSR" y "80 ng TcSR" son transfecciones de células con 10 u 80 ng de pCG/TcSR (ambas columnas en cada caso) sin o con (1.5 µg) de pCG/TcSRPK. En todos los casos, la masa de DNA total transfectado fue igual, equiparándose con plásmido vacío. En todos los casos, la masa de vector de expresión del minigén de fibronectina fue idéntica: 500 ng (pSVEDtot/mFN).

La co-transfección de la quinasa junto a TcSR, aumenta aún mas la inclusión de EDI. Este resultado no es trivial, ya que hay que recordar que estamos midiendo la inclusión de un exón alternativo de un gen de mamífero por parte de una proteína SR de

Trypanosoma, en una célula de mamífero y que además, la inclusión esta modulada por la actividad de una proteína quinasa de Trypanosoma. Esto indica la gran conservación de actividad entre estas proteínas. Además, pudimos ver que TcSRPK puede modular la actividad de splicing. Desde ya, no podemos descartar, a pesar de todos los datos bioquímicos de fosforilación en ensayos quinasa in vitro, que el aumento sea debido a un efecto indirecto sobre las proteínas SR, o TcSR.

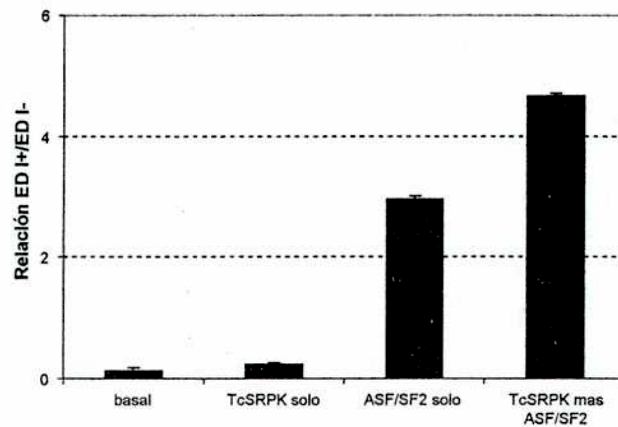


Figura 54. TcSRPK modula la actividad activadora del splicing alternativo de ASF/SF2 en células HeLa. El ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa se realizó como se describe en Materiales y Métodos. La columna indicada como "basal" representa el cálculo de la relación entre inclusión del exón alternativo EDI (EDI+) y exclusión del exón EDI (EDI-) de células transfectadas sin vector de expresión de ASF/SF2 (pCG/ASF/SF2) ni de TcSRPK (pCG/TcSRPK), pero con el vector control vacío (pCG/-). Las columnas indicadas como "TcSRPK solo" (1.5 µg) o "ASF/SF2 solo" (80 ng) representan células transfectadas con pCG/TcSRPK o pCG/ASF/SF2 solos, respectivamente. En todos los casos, la masa de DNA total transfectado fue igual, equiparándose con plásmido vacío. En todos los casos, la masa de vector de expresión del minigén de fibronectina fue idéntica: 500 ng (pSVEDto/mFN).

Quisimos estudiar la capacidad de TcSRPK y TbSRPK de modular la actividad de las proteínas SR de mamífero, como ASF/SF2. Para ello, repetimos el experimento de splicing alternativo en células HeLa con ambas quinasas de Trypanosomátidos y ASF/SF2 como proteína SR.

Se ve claramente en la figura 54, que TcSRPK puede modular la actividad de ASF/SF2, quizás aún mejor que la de TcSR. TcSRPK aumentó la inclusión basal del exón alternativo posiblemente debido a la fosforilación de proteínas SR endógenas. Cuando solo ASF/SF2 fue transfectada, la inclusión aumentó significativamente, como ha sido

reportado reiteradamente (Cramer, 1999; Caputi, 1994; Kadener, 2001). Al co-transfectar con TcSRPK, la inclusión se ve incrementada aún mas, entre el 50 y 100% de aumento, indicando algún tipo de modulación, directa o indirecta.

Los resultados son muy claros, para TbSRPK también (figura 55). En esta figura, se compara la actividad de incremento de la inclusión de EDI por ASF/SF2 (80 ng). Puede verse que TbSRPK y TcSRPK poseen una actividad similar, como es esperado.

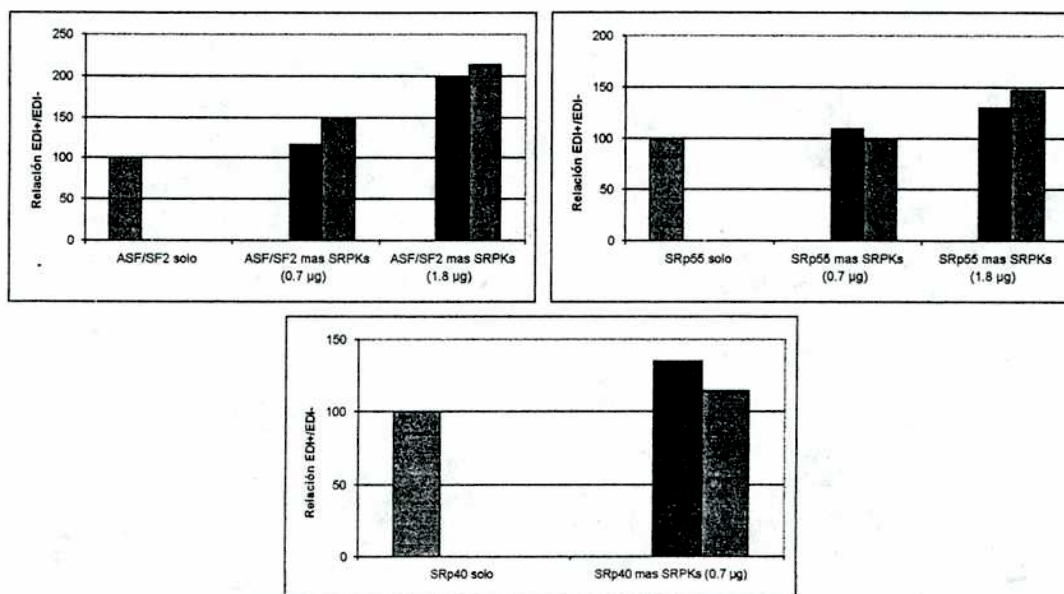


Figura 55. TcSRPK y TbSRPK modulan la actividad de splicing alternativo en células HeLa. En rojo, se indica la proteína SR transfectada en cada caso. En cada caso, se restaron los valores de relación de EDI+/EDI- obtenidos con el blanco (basal, ver figura 54) y para el caso del valor de la SR, se normalizaron a 100% de actividad de manera de relativizar los valores obtenidos con las quinazas. Las barras negras y azules indican los valores obtenidos con las quinazas de *Trypanosoma cruzi* (TcSRPK) o *Trypanosoma brucei* (TbSRPK), respectivamente. Los dos conjuntos de barras indican transfecciones con 0.7 µg y 1.8 µg de vector de expresión, en cada caso. Para los valores de SRp40, no se pudo realizar el punto de 1.8 µg.

Cuando ensayamos las quinazas con distintos minigenes que responden a otras proteínas SR diferentes de ASF/SF2, como SRp40 o SRp55, también se vió un efecto de aumento de la inclusión de EDI, lo que implica que las SRPKs pueden actuar sobre una variedad de proteínas SR, y que las de Trypanosomátidos no son una excepción en ese sentido.

Estos resultados fueron bastante sorprendentes, ya que demostraron que nuestras SRPKs fueron capaces de modular la actividad de diferentes proteínas SR, en

organismos muy distantes evolutivamente. Como dijimos, no queremos pasar por alto el hecho de que estos experimentos demuestran *in vivo*, que ambas quinasas son efectivamente quinasas de proteínas SR. Además estos resultados dejan en evidencia la existencia del *network* de proteínas SR, cosa que no es trivial, mas aún teniendo en consideración que tanto el *Trypanosoma cruzi* y como el *Trypanosoma brucei* son organismos que realizan *trans*-splicing. Los resultados aquí presentados sugieren que el *trans*-splicing podría ser controlado de manera similar al *cis*-splicing.

8. Actividad de TcSRPK en ensayos de splicing constitutivo in vitro con extractos de células HeLa.

Como ha sido argumentado en la Parte I, el ensayo paradigmático de splicing *in vitro*, es la complementación de un extracto S100 de HeLa. Asimismo, un ensayo algo mas general, es el realizado con Extractos Nucleares (EN) de HeLa. Este extracto es competente en ensayos de splicing, es decir que contiene todos los componentes de la maquinaria, y solo hay que agregarle un templado transcripto *in vitro*, para ser procesado.

Quisimos saber si TcSRPK podía actuar en un ensayo de este tipo, modulando la actividad de las proteínas SR endógenas. Para esto, expresamos TcSRPK en bacterias, la purificamos por una columna de afinidad gracias al tag de histidinas y agregamos a extractos nucleares (EN) de células HeLa junto a un lemplado derivado del gen de β -globina, transcripto *in vitro*, con [32 P]-UTP radioactivo. Como control, usamos la quinasa de humanos hSRPK1, expresada y purificada de igual manera. La figura 56 muestra los resultados obtenidos, en donde se ve que el agregado de 12 ng de TcSRPK recombinante al ensayo de splicing, lo inhibe significativamente. De forma similar, el agregado de 12 ng de hSRPK1 inhibieron el splicing.



Figura 56. Ensayo de splicing constitutivo in vitro con extractos nucleares de células HeLa. Panel izquierdo. Curva de concentración de TcSRPK y hSRPK1 incubadas con el minigen de β -globina expresado in vitro, radioactivo y Extracto Nuclear de células HeLa como fuente de proteínas y factores de splicing. La calle indicada como -NE, fue incubada con todo, menos Extracto Nuclear (control negativo). A la derecha de la autoradiografía, se muestra un esquema del templado, con los distintos productos del procesamiento: los exones unidos y el intrón. No se observan otros intermedios como el "lazo". **Panel derecho.** Ensayo de complementación de extracto S100 de células HeLa. El ensayo es idéntico al de Extracto Nuclear pero en lugar de usar ese extracto, se utiliza extracto S100 y se complementa con una sola proteína SR (en nuestro caso 50 ng de ASF/SF2 expresada en baculovirus). El control negativo, en este caso, es mezcla de reacción con todos los ingredientes menos el extracto S100 (primera calle). No se observan, en este caso, ni el intermedio "lazo" ni el intrón.

Estos resultados, vuelven a mostrar que existe una gran conservación en la actividad de estas quinasas. Para ver si la inhibición del procesamiento del minigen de β -globina por TcSRPK estaba mediado por proteínas SR, repetimos el mismo ensayo, pero en lugar de extractos nucleares, utilizamos extractos S100 de células HeLa. Como se dijo en la Parte I, este extracto es competente en splicing, solo si se agregan exógenamente al menos una proteína SR. En nuestro caso, utilizamos ASF/SF2, que expresamos en baculovirus, para que contuviera todas las modificaciones correspondientes, esto es, fosforilación basal, por parte de las SRPKs de las células de insecto Sf9, en donde fueron producidas. El resultado del experimento, se muestra en la figura 56, en donde se ve que el procesamiento del minigen de β -globina esta inhibido a medida que se

aumenta la concentración de TcSRPK o hSRPK1. Nótese que cantidades tan bajas como 0.5 ng de quinasa inhiben la formación de la forma madura. Cabe aclarar que al desnaturalizar por calor cualquiera de estas proteínas quinasas, se interrumpió la inhibición, indicando que esta es producto de la actividad de las proteínas (resultados no mostrados). Asimismo, la pre-incubación de las quinasas con el extracto complementado con las proteínas SR antes de agregar el templado, no fue diferente al resultado obtenido sin pre-incubar (resultado no mostrado).

Queda claro que ambas quinasas se comportan de igual manera, aunque es igualmente claro que no podemos confirmar un efecto directo sobre ASF/SF2.

9. Las proteínas SR tienen diferente estado de fosforilación en distintos estadios del ciclo de vida del parásito.

Sanford (1999 y 1999bis) ha demostrado que las proteínas SR del nematode *Ascaris lumbricoides*, tienen un estado de fosforilación diferencial durante el desarrollo del gusano. Esta fosforilación diferencial, podría estar regulando la actividad de proteínas SR, de manera de tener diferentes conjuntos de proteínas SR activas en momentos diferentes, con evidentes consecuencias en la expresión de distintos genes.

Por tal motivo, quisimos estudiar la actividad de TcSRPK en distintos estadios del parásito (figura 57). Para ello, preparamos extractos totales de epimastigotes y trypomastigotes y precipitamos las putativas proteínas SR. Este enfoque era tentativo, ya que hasta el momento sólo TcSR está descripta en el parásito, pero dada la simpleza de la purificación de las proteínas SR (Zahler, 1999) nos decidimos a encarar el experimento. Al ajustar las preparaciones a 20 mM MgCl₂, las putativas proteínas SR se vuelven insolubles, y se pueden separar del resto por simple centrifugación. El ensayo que hicimos, entonces, fue: preparación de extracto soluble, agregado de MgCl₂ hasta

20 mM, centrifugación y separación del pellet y el sobrenadante, y finalmente ensayo de quinasa con TcSRPK recombinante sobre los pellets y los sobrenadantes. A esta altura, hay que aclarar varios puntos importantes: En primer lugar, los ensayos dieron los mismos resultados haciendo el ensayo de actividad quinasa con igual cantidad de proteína posteriormente al agregado del MgCl₂ en precipitados y sobrenadante, o a igual cantidad de proteína inicial, ya que en epimastigotes el precipitado era mucho menor que en trypomastigotes. En segundo lugar, si bien estos resultados son reproducibles, no dejan de ser preliminares en el sentido que falta realizar un control importante, que a causa de la falta de extractos de trypomastigotes, no pudimos realizar aún. Este control, sería defosforilar ambos precipitados antes del ensayo de actividad quinasa, y de esta manera demostrar que el estado de fosforilación de las putativas proteínas SR en el extracto, es diferente.

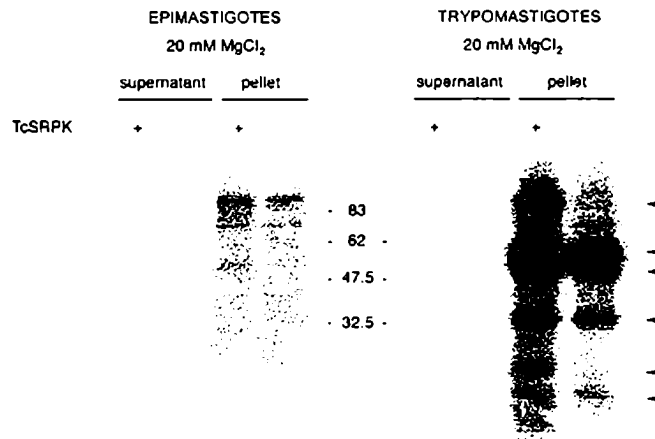


Figura 57. *Trypanosoma cruzi* posee putativas proteínas SR aparentemente reguladas durante el ciclo de vida del parásito. Se tomaron 100 µg de extracto total de epimastigotes o trypomastigotes (cosechados en buffer sin MgCl₂) y se les agregó una cantidad de MgCl₂ concentrado suficiente como para llevar el extracto hasta 20 mM MgCl₂ luego de clarificarlo a 12000xg por 10 minutos a 4°C. Luego de 1 h en agitación a 4°C, se centrifugó y se separó el precipitado de los sobrenadantes. Se lavó y resuspendió el precipitado en buffer apropiado (mismo que el del sobrenadante, pero sin MgCl₂) y se utilizaron 10 µg de "putativa proteína SR" en un ensayo quinasa con TcSRPK. También se usaron 10 µg de proteína de los sobrenadantes en el mismo ensayo. El ensayo se detuvo como se indica en Materiales y Métodos y los productos fosforilados se resolvieron en un SDS-PAGE 12% y se revelaron por autoradiografía. Se señalan con una punta de flecha las bandas fosforiladas en ambos ensayos. Se indican los marcadores de peso molecular, en el centro.

DISCUSIÓN

Discusión.

El trabajo presentado demuestra por primera vez la existencia de un "SR-network" altamente conservado en un protozoario como *Trypanosoma cruzi* o *Trypanosoma brucei*. Este descubrimiento no es trivial, ya que las familias de proteínas a las que pertenecen fueron descritas en sistemas de cis-splicing de metazoos y a excepción de un caso particular, los Trypanosomátidos no poseen intrones. Por esto, consideramos que cumplen funciones generales en la regulación de la reacción de trans-splicing.

El alto grado de conservación a nivel estructural, bioquímico, y funcional observado, así como el relativo grado de homología entre el cis- y el trans-splicing, sugieren que TcSR y TcSRPK poseen funciones conservadas en el parásito. Por lo tanto, creemos que su existencia representa un aporte significativo para el entendimiento de la reacción de trans-splicing.

TcSR.

La evidencia presentada en este trabajo de tesis indica claramente que el *Trypanosoma cruzi* posee una proteína de la familia SR que es activa en reacciones de splicing realizadas en sistemas heterólogos.

El descubrimiento de la proteína mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras con una proteína de la familia dedos zinc del tipo CCHC (PZFP) es novedoso, ya que este tipo de interacción no fue descrita anteriormente en proteínas de la ninguna de las dos familias. Dos datos sugieren que la interacción es funcional: en primer lugar, PZFP es una proteína que une específicamente RNA simple cadena, y en segundo lugar, dos factores de splicing como SLU7, de *S. cerevisiae* (Frank, 1992) y 9G8, una proteína SR

de mamíferos, (Cavaloc, 1994) tienen dedos de zinc de este tipo. No podemos afirmar demasiado en este estado de la investigación, pero seguramente la interacción no es inespecífica y refleja algún tipo de función en el *Trypanosoma cruzi* que puede o no ser generalizada a otros organismos.

La estructura de TcSR presenta dos dominios de unión a RNA (RBDs o RRM)s hacia el extremo amino terminal, y un dominio carboxi-terminal rico en residuos arginina y serina, muchos de los cuales están consecutivos formando dipéptidos RS o RS, que le dan el nombre al dominio. Estas son las características distintivas de las proteínas SR de metazoos. Quizás el miembro más prototípico de la familia es ASF/SF2, que ha sido estudiado en detalle. En nuestros experimentos utilizamos esta proteína SR a modo de control positivo en diversos ensayos, aunque en ningún momento pretendemos homologar nuestra proteína SR TcSR a ASF/SF2. Al analizar la secuencia de TcSR notamos importantes diferencias con miembros canónicos de la familia. En primer lugar, el RBD en TcSR no se ajusta exactamente al consenso del dominio propuesto por Birney (1993). Es cierto que este consenso tiene, desde su formulación algún tiempo ya y que a medida que nuevos miembros de la familia sean descritos deberá obligatoriamente ser modificado y ajustado, Por el momento, tendremos que suponer que TcSR no se ajusta estrictamente al consenso de los RBDs, aunque distintos programas de modelado indican claramente que ambos dominios son auténticos RBDs. En segundo lugar, muchas, aunque no todas las proteínas SR poseen una región "visagra" rica en el residuo glicina (G) entre ambos RBDs, llamado dominio "rico en G" ("*G-rich domain*"). Este no es el caso de TcSR. Este hecho podría restarle movilidad a los dominios, aunque a juzgar por los resultados en ensayos de splicing, no parece afectar la actividad de la proteína. Por último, el dominio RS de proteínas SR es típicamente un dominio rico en repeticiones SR o RS. En el caso de TcSR, no existen

largas repeticiones de dicho dipéptido. Existen, en cambio repeticiones cortas del dipéptido y trechos relativamente largos de uno u otro residuo, principalmente argininas. No sabemos si esta característica tiene o no una implicancia funcional, pero seguramente está indicando que la carga neta del dominio RS es importante, y por ende la fosforilación del mismo podría estar cumpliendo alguna función regulatoria. En ese mismo sentido, al haber menos dipéptidos SR/RS, la capacidad de modular la carga total del dominio en base a fosforilación parecería estar reducida en TcSR, aunque no queda claro si todas las serinas del dominio son fosforiladas o no. Se sabe además que existen estados de fosforilación discretos del dominio RS, que determinan al menos en el caso de ASF/SF2 (Prasad, 1998) tres estados de fosforilación, hipo, intermedio e hiperfosforiladas, dando lugar a proteínas inactivas, las hipo e hiperfosforiladas o activas, las de fosforilación intermedia. Lamentablemente, debemos mencionar aquí dos problemas técnicos que han imposibilitado parte de la caracterización de TcSR. En primer lugar, no pudimos poner a punto una reacción de trans-splicing con extractos de *Trypanosoma cruzi*. Por ello, luego de varios intentos infructuosos decidimos encarar la caracterización de TcSR en sistemas heterólogos, ya que en base a la bibliografía existente y luego de discutir el tema con los Dres Bruzik y Manley, decidimos no centrar el trabajo de tesis en la puesta a punto de un sistema de splicing y aprovechar los ensayos existentes y poder avanzar en el estudio de TcSR. En segundo lugar, a pesar de intentar por lo menos tres vectores diferentes de expresión en bacterias y otros tantos en baculovirus, no pudimos obtener TcSR soluble, con concentraciones de Guanidina lo suficientemente bajas como para poder ensayarla en ensayos de splicing in vitro que no inhibieran la reacción *per se*. Dicho esto, decidimos encarar en primer lugar la caracterización en el sistema de levaduras de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Como dijimos, decidimos utilizar una proteína SR muy estudiada como ASF/SF2 como control positivo. Como se vió, la proteína completa, TcSRwt produjo una

elongación celular leve, pero significativa, al igual que ASF/SF2 en la cepa salvaje 1913 de *S. pombe*. Otra proteína involucrada en splicing homóloga a U2AF⁶⁵, PRP2 en *S. pombe*, produjo un fenotipo similar, aunque más pronunciado (Tang, 2000). Interesantemente, cuando decidimos investigar si alguna de estas proteínas SR era capaz de complementar la falta de SRPKs en la cepa doble mutante de *S. pombe* 2D4, ambas SRs pudieron restaurar la capacidad de crecimiento en medio mínimo EMM2. La diferencia entre ambas proteínas SR fue clara al utilizar proteínas SR mutantes, sin los respectivos dominios RS (Δ RS). ASF/SF2 Δ RS no tuvo problemas para elongar la cepa salvaje 1913 al ser sobre-expresada, así como para complementar el crecimiento de la doble mutante 2D4. En cambio, TcSR Δ RS no produjo una elongación significativa de la cepa salvaje, aunque cuando se transformaron mutantes 2D4 se pudo observar un crecimiento, aunque mucho menor que con otras proteínas. No es sorprendente que una proteína SR sea activa sin su dominio SR. Krainer y colaboradores (Hastings, 2001; Zhu, 2000) mostraron que ASF/SF2 Δ RS es activa en ensayos de splicing in vitro, siempre y cuando el sitio 3' de splicing sea suficientemente fuerte. Nuestros resultados indican que al menos para TcSR, el dominio RS es necesario para la actividad. Esta diferencia puede responder a diferencias en los dominios RBDs de unión a RNA o a posibles dominios crípticos no descritos.

El trans-splicing fue descrito por primera vez en Trypanosomátidos y luego en una variedad de organismos, incluyendo a los Cordados. De los trabajos de Bruzik y Maniatis en 1992 (1992), resultó claro que los RNAs de SL pueden sufrir trans-splicing en extractos de células o células de mamífero. Lo que se desprende de estos experimentos, es que las señales necesarias para el trans-splicing pueden ser reconocidas por maquinarias de splicing de metazoos. Esto no es del todo

sorprendente, ya que como se vió en la Introducción, las secuencias de nucleótidos en los sitios dadores y aceptores de splicing no son del todo discímiles.

Además, la fuerte dependencia de las secuencias enhancer exónicas (ESEs) para la actividad de TcSR en el ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa con el minigen de fibronectina, confirma la existencia de simiitudes funcionales entre proteínas SR de metazoos y protozoos. Esto sugiere la interesante posibilidad que trechos de polipurinas, como los que se observan en el elemento A del ESE, constituyan señales en cis- con funciones establecidas desde los comienzos de la evolución de los mecanismos de splicing.

No podemos dejar de mencionar a TSR1, una proteína del tipo SR descrita en otro Trypanosomátido como *Trypanosoma brucei* (Ismaïli, 1999). Aunque los autores no pudieron mostrar algún tipo de actividad en ensayos de splicing con TSR1, mostraron que ésta se une al SL RNA y que interactúa con un factor de splicing, el U1 70KDa (Ismaïli, 1999 y 2000). Otro dato interesante es que TSR1 reside en el núcleo, mientras que TcSR lo hace en el citoplasma, mayoritariamente. Este hecho no descarta a TcSR como proteína SR, ya que existen proteínas SR que migran continuamente desde y hacia el núcleo. Estas diferencias sugieren que TcSR y TSR1 no son homólogas funcionales. Además, podría estar indicando que TcSR tiene algún rol en el transporte de RNA. Esta hipótesis será investigada en el futuro y no puede ser descartada en el estado en que se encuentra la investigación, pero de igual forma, nuestros datos en ensayos de splicing, sugieren fuertemente un rol en el procesamiento de RNA. Recientemente, Martín Vazquez, del Ingebi, ha clonado el homólogo de U2AF³⁵ en *Trypanosoma cruzi* y ha mostrado que esta subunidad interactúa específicamente con TcSR. Esta interacción es muy importante ya que muestra que TcSR interactúa con miembros de la maquinaria de trans-splicing en *Trypanosoma cruzi*.

Los experimentos descritos aquí describen por primera vez a una proteína SR activa en ensayos de splicing proveniente de un organismo protozoario que realiza trans-splicing en todos sus pre-mRNA. El alto grado de conservación entre la actividad de TcSR y la de otras proteínas SR de metazoos sugiere que los mecanismos de maduración de los pre-mRNA están igualmente conservados. Todos nuestros datos apuntan a un origen común de los componentes de splicing.

TcSRPK y TbSRPK.

Tanto TcSRPK como TbSRPK presentaron una estructura extremadamente conservada con otras proteínas de la familia SRPK, de metazoarios. En nuestras manos, estas proteínas no presentaron diferencias con sus contrapartes de eucariotas superiores en ensayos bioquímicos y funcionales tanto in vivo como in vitro. Esto es indicativo de un rol conservado en el parásito, muy probablemente regulando, en cierto nivel, la actividad de proteínas SR. Además, sugiere que indistintamente del tipo de splicing que realicen los organismos, los mecanismos de regulación guardan un significativo grado de conservación.

No sabemos con certeza si TcSRPK y TbSRPK son las únicas quinasas de proteínas SR existentes en estos organismos o no. Nuestras búsquedas en bases de datos sólo revelaron la existencia estas quinasas aunque no puede descartarse la existencia de otras, de esta o de otra familia de quinasas de proteínas SR, que pudieran no estar en las bases de datos.

Consideramos que el hecho de que en dos bases de datos independientes, como ser las de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* solo hayamos encontrado secuencias con homología con estas quinasas, es indicativo de que estas son las únicas proteínas

de la familia en estos parásitos. Además, en el caso de TcSRPK, solo observamos una banda en ensayos de Northern con el gen completo de *tcsrpk* como sonda y Western blot con anticuerpos específicos contra TcSRPK recombinante, reforzando la idea de que esta es la única quinasa de la familia. De cualquier forma, solo cuando se haya completado la secuenciación de los genomas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* sabremos con certeza si TcSRPK y TbSRPK son o no las únicas quinasas de este tipo.

Las búsquedas en esas mismas bases de datos de secuencias con homología con quinasas de otras familias, como Cik/Sty, arrojaron resultados negativos. De igual manera que para las SRPKs, habrá que aguardar la finalización de los proyectos genoma para un veredicto definitivo sobre este tema. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que alguna otra quinasa no relacionada con las familias normalmente descritas que fosforilan proteínas SR, pueda interactuar con ellas in vivo. Nuestros resultados con TcCRK, la proteína quinasa dependiente de ciclinas en el parásito, indican que, al menos in vitro, TcSR puede ser fosforilada por otras quinasas, aunque no por todo tipo de quinasas. Actualmente, estamos comenzando un proyecto para realizar un *knock-out* funcional de TcSRPK, lo que podría darnos una idea más acertada sobre estas cuestiones.

Ambas quinasas, Tc- y TbSRPK mostraron ser funcionales en ensayos de fosforilación in vitro con distintas proteínas con repeticiones SR, como el receptor de lámina B (LBR), ASF/SF2 o TcSR. Esto indica que ambas quinasas pueden interactuar con y modificar proteínas SR, aunque, desde ya no demuestra interacción alguna in vivo.

Nuestros estudios de localización intracelular de TcSRPK indican claramente que la localización es mayoritariamente citoplasmática, y en mucho menor medida, nuclear. Los resultados de las inmunofluorescencias coinciden con los observados en ensayos

de Western blot, mas allá de la falta de un control en los ensayos de Western blot con algún marcador nuclear, de manera de descartar posibles contaminaciones con citoplasma en la fracción nuclear. Además, este resultado es consistente con resultados previos en los que se sugiere un rol en procesos celulares como el procesamiento del pre-mRNA o ciclo celular. Experimentos realizados con Dsk1 (Takeuchi, 1993; Fukuda, 1997) y Sky1p (Siebel, 1999), dos proteínas SRPK de *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, mostraron que su localización es dependiente del ciclo celular: están enriquecidas en el citoplasma durante la interfase y en el núcleo durante la mitosis, inmediatamente antes de la disolución de la membrana nuclear. El mecanismo por el cual las SRPKs son retenidas en el núcleo es poco conocido y puede no estar conservado entre distintas SRPKs, ya que las regiones "spacer", donde se supone reside la señal de exportación nuclear, no están conservadas. Dsk1 posee una señal de exportación nuclear rica en leucinas conocida como NES (nuclear export signal) de la clase Rev. Como se describió en los Resultados Parte II, tanto TcSRPK y TbSRPK poseen una secuencia de tipo NES, aunque su función no ha podido ser demostrada aún, que podría indicar un mecanismo de localización conservado. En futuros experimentos, analizaremos si esta secuencia afecta la localización subcelular de TcSRPK. Actualmente, estamos realizando ensayos de sincronización de cultivos de epimastigotes, para estudiar si existe una localización o tránsito nuclear dependiente del ciclo celular. Asimismo, ensayos realizados con Leptomomicina B, un inhibidor específico de la exportación nuclear mediada por esta señal rica en leucinas, ayudarán a confirmar posibles variaciones en la localización subcelular. No podemos ignorar la localización subcelular de TcSRPK si queremos entender su función. Existen muchas hipótesis que intentan asociar la localización citoplasmática con funciones en el metabolismo de RNA. En primer lugar, la fosforilación de proteínas

SR mediada por SRPKs, puede inducir la importación de aquellas al núcleo. Varios datos experimentales, como el hecho de que las proteínas SR van y vienen del núcleo continuamente (Cáceres, 1998) o la existencia de un receptor en la membrana nuclear que reconoce proteínas SR fosforiladas para importarlas al núcleo (Lai, 2001), apoyan esta hipótesis. Otra hipótesis no mutuamente excluyente, es que la localización citoplasmática de las SRPKs refleje una manera de controlar su concentración nuclear. Esto es apoyado por observaciones en las que hSRPK1 y hSRPK2 expresadas en células de mamífero, induce la desensamblado de los "speckles" nucleares.

Los resultados obtenidos en levaduras de fisión demostraron que el grado de conservación observado a nivel de secuencia y en ensayos de fosforilación in vitro tiene relevancia funcional y que ambas SRPKs clonadas son realmente homólogas funcionales de otros miembros de la familia SRPK. Esto extiende resultados obtenidos inclusive con hSRPK1 en *S. pombe* a los protozoarios por primera vez, sugiriendo que los procesos celulares que involucran a las SRPKs evolucionaron a partir de los eucariotas inferiores.

Nuestros resultados en el ensayo de splicing alternativo funcional en células HeLa demostraron que no solo TcSRPK y TbSRPK son capaces de modular pre-mRNA in vivo, sino que también pueden funcionar en un entorno celular de mamífero. Esto es particularmente interesante ya que consideramos que es la primera evidencia de una proteína SRPK promoviendo activamente el splicing de un templado, y que dado que TcSRPK pertenece a un organismo que realiza trans-splicing, sugiere que los mecanismos de control de este tipo reacción, ya sea cis- o trans-splicing, están conservados en la evolución. Estos experimentos sugieren, además, que las SRPKs actúan fosforilando proteínas SR, condición para que ocurra el splicing. Las reacciones de splicing realizadas con extractos nucleares y S100 indican que tanto TcSRPK como

hSRPK1 pueden modular la actividad de proteínas SR (ASF/SF2) posiblemente hiperfosforilándolas y de esta forma inhibir el splicing.

En principio, el hecho de que TcSRPK indujera la inclusión del exón alternativo EDI e inhibiera el splicing constitutivo del pre-mRNA de β -globina parece contradictorio, aunque hay varias explicaciones posibles. En primer lugar, los ensayos de splicing alternativo fueron realizados en células vivas, en las que existen factores regulatorios. Estos factores, como por ejemplo fosfatasas, pueden de alguna forma compensar la hiperfosforilación de las proteínas SR producto de la sobre-expresión de TcSRPK. Si bien los ensayos de splicing in vitro no fueron realizados con TbSRPK creemos que debido a la absoluta conservación entre todos los miembros de la familia SRPK los resultados son extrapolables a la quinasa de *Trypanosoma brucei*. Otra hipótesis posible es que debido a que la mayoría de las proteínas SR y SRPKs están físicamente separadas en las células, dado que las primeras están mayoritariamente en el núcleo mientras que las segundas están mayormente en el citoplasma, gran parte de la hiperfosforilación puede ser evitada debido a esto. En los experimentos in vitro, por otro lado, todos los mecanismos posibles para evitar la hiperfosforilación de las proteínas SR no están presentes, por obvias razones, y por lo tanto TcSRPK puede hiperfosforilar las proteínas SR. Como consecuencia directa de esto, las proteínas SR son inactivas y por lo tanto no se produce splicing. Una hipótesis interesante, es que existan factores que regulen la actividad de las SRPK, ya sea por unión a dominios crípticos de la proteína, o bien por modificación, como fosforilación, por ejemplo. Siguiendo esta lógica, podemos pensar que la actividad de las SRPKs, pueda ser controlada en células. Estas hipótesis serán objeto de investigaciones futuras.

Los resultados presentados constituyen la primera evidencia directa de la existencia de un miembro de la familia SRPK en organismos protozoarios, como *Trypanosoma cruzi* y

Trypanosoma brucei. Estos resultados extienden los miembros de la familia hasta el comienzo del linaje eucariota. También constituye la primera evidencia de que las proteínas SRPK existen en un organismo que realiza trans-splicing casi exclusivamente. Esto plantea gran cantidad de preguntas, desde mecánicas hasta evolutivas. El alto grado de conservación funcional entre las SRPKs sugiere que el control del procesamiento de mRNA debe ser independiente del tipo de splicing que realizan los organismos. El descubrimiento de proteínas SRPKs en Trypanosomátidos que funcionan de manera tan conservada no es de importancia menor, ya que sugiere que el procesamiento del pre-mRNA evolucionó tempranamente en la evolución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos.

1. Medios y soluciones.

1.1 Medios de cultivo.

LIT (Liver Infusion Triptose), cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*: 1 litro. Disolver 5g infusión de hígado, 5g triptosa, 68 ml de 1M NaCl, 5.3 ml de 1M KCl, 22 ml 1M HPO_4Na_2 . Autoclavar. Agregar 10 ml 20% glucosa, 1 ml hemina (1g en 50 ml 0.2 M NaOH), 100 ml de suero fetal bovino (10% final), 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 100 U/ml penicilina.

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

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

YES (Yeast Extract + Supplements) Medio para crecimiento de cepas de levaduras, inhibe conjugación y esporulación: 0.5% p/v extracto de levaduras oxoide, 3% p/v Glucosa + aproximadamente 225 mg/Litro de Adenina, leucina, histidina, uracilo, e Hidrocloruro de lisina, dependiendo de la auxotrofia. Autoclavar.

EMM2 (Medio Mínimo de Edinburg) Medio para el crecimiento transformantes: 14.7 mM Potasio Hidrógeno Ftalato, 15.5 mM Na_2HPO_4 , 93.5 mM NH_4Cl , 111 mM Glucosa, 20 ml/Litro de stock 50x de sales, 1 ml/Litro de stock 1000x de vitaminas, agregado después de autoclavar, NO en caliente, 0.1 ml/Litro de stock 10000x de minerales. **Stock 50x de sales**: 0.26 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.99 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.67 M KCl, 14.1 mM Na_2SO_4 . **Stock 1000x de vitaminas**: 4.2 mM ácido pantoténico, 81.2 mM ácido nicotínico, 55.5 mM Inositol, 40.8 μM Biotina. **Stock 10000x de minerales**: 80.9 mM ácido Bórico, 23.7 mM MnSO_4 , 13.9 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.4 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.47 mM ácido molíbdico, 6.02 mM KI, 1.6 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 47.6 mM ácido cítrico. Para medio sólido, agregar 2% de agar. Autoclavar no mas de 20 minutos. Agregar 1:1:2 de Clorobenceno:Dicloroetano:Clorobutano al stock de minerales.

Concentración de tiamina utilizada: 2 μ M, agregada luego de autoclavar, y en caso de medio con agar, justo antes de plaquear, para que no se inactive por el calor. Guardar stock 1000x alejado de la luz.

Concentración de ampicilina utilizada: 50 μ g/ml.

Concentración de IPTG para placas: 0.1 M; disolver 120 mg en 5 ml de H₂O. Agregar 100 μ l/placa. Concentración final para placas: 0.5 mM.

Concentración de X-Gal para placas: 50 mg/ml. Disolver en dimetilformamida. Agregar 50 μ l/placa. Concentración final para placa: 40 μ g/ml.

1.2 Soluciones.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8.

TBE 10x: 1 litro. 108 gr Tris base, 55 gr ácido bórico, 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.

TAE 50x: 1 litro. 242 gr. Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml 0.5 M EDTA pH8.

Buffer de siembra para muestras de DNA, 6x: 0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v Xylene Cyanol y 30% v/v glicerol.

Buffer de siembra para muestras de RNA 4x: 1mM EDTA pH 8, 0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v Xylen Cyanol, 50% v/v glicerol.

Buffer de siembra para geles de secuencia: 80% formamida, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% Xylene Cyanol, 1x TBE

CB ("cracking buffer") o Buffer de siembra para muestras de proteínas, 5x: 50% v/v glicerol, 7.7% p/v DTT, 10% p/v SDS, 0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 0.002% p/v azul de bromofenol.

Buffer MOPS 10x: 0.2 M MOPS, 0.5 M acetato de sodio pH 7, 0.01 M Na₂EDTA.

Buffer Tris-glicina-SDS 10x: 1 litro. 30.3 gr Tris base, 144 gr glicina y 1% v/v SDS.

TBS 10x: 0.25 M Tris-HCl pH 8, 9% p/v NaCl.

TBS-T 1x: TBS 1x + 0.05% v/v Tritón X-100.

Buffer Taq 1x: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9, 0.1% Tritón X-100.

SSC 20x: 3 M NaCl, 0.3 M Na₃citrato pH 7.

PBS: 1 litro. 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr KH₂PO₄.

Coomassie blue: 0.25% p/v Coomassie R250, 30% Metanol, 10% ácido acético.

Reactivo de Bradford: 1 litro. Disolver 100 mg de Coomassie G250 en 50 ml de etanol 95%, agregar 100 ml de ácido fosfórico 85%, completar a volumen con H₂O, filtrar y guardar en frasco oscuro.

Solución de Church. NaHPO₄ 1M pH 7.2, 10 mg/ml BSA, 1 mM EDTA, 5% SDS.

Poinceau S. disolver 2 gr Poinceau S y 30 grs TCA en 100 ml de agua.

Antiproteásicos, concentración final: PMSF 0.5 mM, TLCK 50 µg/ml, inhibidor de tripsina 2 µg/ml, benzamidina 1 mM, aprotinina 25 U/ml.

GTC: 4 M isotiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH 7, 0.5% lauril sarkosyl sodio, 0.1M β-mercaptoetanol.

PIC: fenol equilibrado con Tris-HCl a pH 8/ cloroformo /alcohol isoamílico, 25:24:1

CHISAM: cloroformo /alcohol isoamílico 24:1

2 Técnicas Electroforéticas.

2.1 Geles de agarosa.

Los geles de agarosa se preparan con buffer TBE 1x o TAE 1x al 0.7-2 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizan a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspenden con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles son visualizados y fotografiados mediante el uso de transiluminadores de luz UVC.

2.2 Geles de agarosa con formaldehído.

Se arman geles de agarosa 1-2% con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH 7. Las muestras se preparan de la siguiente manera: 1 volumen de solución de RNA más 1 volumen de RNA LB 4x más 2 volúmenes de formamida deionizada. Luego se calientan 10 min a 65°C y se colocan en hielo hasta el momento de sembrar. La corrida electroforética se realiza con buffer MOPS 1x conteniendo 6% formaldehído a 5-10 V/cm.

2.3 Geles de poliacrilamida desnaturalizantes para secuenciación de DNA.

Se preparan geles de acrilamida al 6-8 % con 8 M urea en buffer TBE 1x. Se usan geles verticales de 40 x 35 cm. con espaciadores de 0.4 mm. Las muestras se resuspenden en buffer de siembra para DNA con 50% formamida deionizada y se calientan, antes de ser sembradas, a 70°C por 2 min. La corrida se realiza a 60 W de potencia. Finalizada la migración, los geles se secan a 80°C durante 1 hr y se exponen a placas autoradiográficas.

2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se utiliza el método de Laemmli (1970). Se arman geles desnaturalizantes (0.1 % SDS) discontinuos en celdas BioRad 220. Las muestras analizadas se preparan agregando los volúmenes correspondientes de CB 6x y calentando por 5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usa Tris-glicina-SDS 1x. Los marcadores de peso molecular usados son los de GibcoBRL de 14.3 a 200 kDa (*High Range Molecular Weight Markers*).

3. Parásitos: cultivo y preparación de extractos.

3.1 Cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Se utilizaron principalmente formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahén, población Tu1 2.

El cultivo de epimastigotes se efectuó en medio LIT a 28°C. Típicamente se inicia un cultivo con 10⁵ células/ml y a los siete días se alcanza la fase exponencial con 10⁷ células/ml aproximadamente.

3.2 Preparación de extractos protéicos de epimastigotes.

En el trabajo se utilizan extractos solubles o clarificados (S100).

La preparación de estos extractos es muy sencilla. Se cosechan los epimastigotes y se lavan en PBS u otra solución similar sin ningún agente protector como sacarosa, glicerol, etc.

Luego las células se resuspenden en un pequeño volumen del mismo buffer con antiproteásicos, aproximadamente 100 mg parásitos/ml, y se realiza la ruptura por ciclos de congelamiento/descongelamiento con nitrógeno líquido y baños de agua a temperatura ambiente.

Después de 5-7 ciclos las células se hallan rotas y la muestra se centrifuga 15 min a 5000xg. El sobrenadante se considera como extracto crudo o S5000.

Si a éste lo centrifugamos nuevamente 1 hr a 100000xg obtenemos el S100 o extracto soluble clarificado.

3.3 Preparación de DNA genómico de epimastigotes de *T. cruzi*.

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

3.4 Preparación de RNA total de epimastigotes de *T. cruzi*.

Pequeñas cantidades de parásitos (10⁸ células)

1. *Pellets* de parásitos, 10⁸ células, se resuspenden en 500 µl de GTC + 0.1 M β-mercaptoetanol y se pasan 40 veces, por jeringa G21.
2. Se agregan 50 µl de 3 M acetato de sodio pH 4 y se mezcla bien.
3. Se agregan 550 µl de fenol saturado en agua y se mezcla con vortex.
4. Se agregan 100 µl de una solución de cloroformo:isoamílico, 49:1, se incuba por 15 min a 0°C y se centrifuga a 10000xg por 20 min a 4°C.
5. Se toma la fase acuosa y se precipita con el agregado de 1 volumen de isopropanol, se incuba por 30 min a -70°C y se centrifuga a 10000xg por 20 min a 4°C.
6. El *pellet* se resuspende en 50 µl de GTC + 0.1 M β-mercaptoetanol y se agita con vortex.
7. Se le agrega 1 volumen de isopropanol, se incuba por 20 min a -70°C y se

centrifuga a 10000xg por 20 min a 4°C.

8. El *pellet* se seca y se resuspende en 500 µl de agua + 50 µl de 3 M acetato de sodio pH4.
9. Se extrae 2 veces con PIC y 4 veces con eter.
10. Se agrega 1 volumen de isopropanol, se incuba por 20 min a -70°C y se centrifuga a 10000 rpm por 20 min a 4°C.
11. El *pellet* se lava 3 veces con etanol 70%, se lo deja secar y se resuspende en 20 µl de agua.

3.5 Preparación de fracciones nucleares y citoplasmáticas de *Trypanosoma cruzi*.

Se largaron cultivos de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *Trypanosoma cruzi* en 500 ml de medio LIT. Se cosecharon los parásitos centrifugando 5 min a 1000xg. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se resuspendió el precipitado en solución de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM sacarosa y 5 mM KCl, a una concentración final de $2 \cdot 10^9$ parásitos/ml.

Se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado con nitrógeno líquido para lisar las células. Para obtener la fracción nuclear, se realizó una centrifugación a 500xg por 15 min, el sobrenadante se asumió como fracción citoplasmática. La fracción conteniendo los núcleos, fue resuspendida y lavada 2 veces con la misma solución y centrifugada a la velocidad correspondiente. Luego se resuspendieron en volúmenes no superiores a 300 µl. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, previa curva de calibración con BSA (0.075-5 mg/ml). Las muestras fueron preparadas agregando 1/6 volúmenes de buffer de siembra (Cracking buffer) para proteínas 6X. De acuerdo a la concentración obtenida se colocó aproximadamente 20 a 30 µg por calle.

4. Manipulación de ácidos nucleicos.

4.1 Purificación fenólica y precipitación alcohólica de ácidos nucleicos.

1. Los ácidos nucleicos a ser purificados se llevan a más de 200 µl con H₂O o buffer TE.

2. Para remover proteínas y lípidos se agrega 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamilico pH 8 (25:24:1) (PIC), se mezcla con vortex, se separan las fases por centrifugación 2 min a 10000xg y se toma la fase acuosa (superior).
3. Para remover restos de fenol, se agrega 1 volumen de cloroformo:isoamilico (24:1) (CHISAM), se mezcla con vortex, se centrifuga y se toma la fase acuosa.
4. Los ácidos nucleicos se precipitan con 1/10 volúmenes de 3 M acetato de sodio pH 5.2 o pH 4.8, o con 1/3 volúmenes de 7.5 M acetato de amonio pH 5.2, con el agregado de 2.5 volúmenes de etanol 100%.
5. Se deja a -70 °C por 20-30 min y se centrifuga a 10000xg por 20 min.
6. El *pellet* se lava con etanol 70%, se deja secar y se resuspende con H₂O o buffer 0.1x TE.

4.2 Cuantificación de DNA, RNA y oligonucleótidos.

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

4.3 Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Las digestiones de DNA se realizan en los buffers indicadas por el fabricante. Se utilizan de 3 a 5 unidades de enzima por µg de DNA y las incubaciones se hacen a las temperatura recomendadas por el fabricante.

4.4 Secuenciación de DNA.

La secuenciación de ácidos nucleicos se lleva a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1975). Utilizamos el kit *fmol* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Como plantillas se utilizan los plásmidos doble cadena purificados por el método de lisis alcalina/PEG.

4.5 Preparación del vector con extremos adhesivos.

Si estamos digiriendo con dos enzimas para obtener un subclonado orientado, prescindimos de la reacción de defosforilación necesaria en caso de preparar extremos romos. Se requiere eliminar todo tipo de contaminantes (sales, agarosa, trazas de fenol o de enzimas de restricción, quelantes como EDTA, etc).

4.6 Ligación de extremos adhesivos.

Hay que tener en cuenta que la reacción de ligación debe hacerse con inserto y vector en estado puro (sin sales, agarosa y otros contaminantes) por lo que hay que trabajar cuidadosamente para evitar tener que repetir las ligaciones. Como esta reacción suele ser más eficiente, se utiliza menos enzima y podemos incubar a una mayor temperatura que para el caso de extremos romos (18-22°C vs 14-16°C).

5. Preparación de bacterias competentes, expresión heteróloga de genes y amplificación y purificación de plásmidos.

Para las cepas DH5 α y BL21/Lys se utiliza una modificación del método descrito por Ausubel (1997).

1. A partir de una placa fresca se pica una colonia aislada y se inoculara a 7 ml de LB en Erlenmeyer de 125 ml. Se crece con agitación a 37°C hasta una $DO_{550nm}=0.3$.
2. Luego, se pasan 5 ml de este cultivo a 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml. Se crece con agitación a 37°C hasta una $DO_{550nm}=0.48$ y luego se coloca en hielo por 10 min.
3. Se centrifuga a 3000xg por 5 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante. El *pellet* se resuspende cuidadosamente en 40 ml de solución T_{fb}l fría y se deja en hielo 5 min.

4. Luego se centrifuga a 3000xg por 5 min a 4°C y se descarta el sobrenadante. El *pellet* se resuspende cuidadosamente y siempre en hielo con 4 ml de TfbII preenfriado. Se incuba en hielo por 15 min.
5. Las células se alicuotan en *eppendorf* estériles en volúmenes de 50 a 200 µl, se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardan a -70°C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizan 50 µl.

Soluciones.

Tfbl: 30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% v/v glicerol, el pH se ajusta a 5.8 con acético 0.2 M.

TfbII: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% glicerol, el pH se ajusta a 6.5 con KOH.

5.1 Transformación de bacterias competentes.

Se utiliza el método de golpe de calor. Indistintamente, se puede realizar el golpe térmico por 2 min a 42°C o 5 min a 37°C. Para transformar se utiliza la mitad de la reacción de ligación.

5.2 Identificación de los plásmidos recombinantes.

Dependiendo de la cantidad de colonias obtenidas después de la transformación, elegimos diferentes métodos para la identificación de los plásmidos recombinantes. Si los controles del vector sin inserto son alentadores, entiéndase que nos dan 1/3 o menos de las colonias que hay en las placas correspondientes al vector con inserto, personalmente prefiero la preparación de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción para ver si está el inserto. Si los números no son tan alentadores, existen dos opciones: PCR de colonia o Hibridación de colonia.

5.3 Preparación de DNA plasmídico.

En esta sección se describen dos protocolos: uno rápido, pero que no otorga un DNA de alta calidad (aunque puede digerirse y secuenciarse), y un segundo método mas extenso, pero con el que se obtiene un DNA de excelente calidad.

5.3.1 Minipreparación rápida (método TELT)

1. Picar una colonia y crecer en 3-4 ml de LB con antibióticos (no más de 14 hrs).
2. Centrifugar el cultivo a tubos *ependorf* de 1.5 ml, 3 min 5000xg
3. Remover el sobrenadante y resuspender en 150 μ l de buffer TELT por agitación.
4. Calentar 2 min 100°C y enfriar rápidamente en agua-hielo.
5. Centrifugar 10 min 10000xg
6. Remover el firme pellet con un escarbadiante y agregar 1 volumen de isopropanol al sobrenadante. Mezclar y reposar 5 min a temperatura ambiente.
7. Precipitar el DNA centrifugando 10 min 10000xg
8. Remover el sobrenadante y agregar 150 μ l de etanol 70%.
9. Recentrifugar 5 min 10000xg.
10. Remover el etanol y secar sobre la mesada 5-10 min
11. Resuspender el pellet en 25 μ l de TE-RNAasa 10 μ g/ml. Reposar 20 min a 37°C.

TELT:

50 mM Tris HCl pH 7.5

62.5 mM EDTA

0.4% Triton X-100

2.5 M LiCl

Antes de usar se agrega lisozima a 1 mg/ml.

5.3.2 Minipreparación de alta pureza para secuenciación (PEG)

Se utiliza una modificación del método de Birnboim y Doly (1979). Este protocolo no usa fenol y se hace una precipitación con PEG que otorga un DNA muy limpio.

1. Se parte de 3-5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio Terrific/ampicilina. Este medio es más rico que el LB y compensa el hecho de que este protocolo no otorga un alto rendimiento.
2. Se cosechan las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 5' a temperatura ambiente.
3. El *pellet* se resuspende en 300 μ l de solución I.
4. Se agregan 300 μ l de solución II, preparada en el momento, se mezcla suavemente y se deja 5 min en hielo.
5. Se agregan 300 μ l de solución III, se mezcla suavemente y se deja en hielo 5 min.
6. Se centrifuga a máxima velocidad por 10 min y se toma el sobrenadante.
7. Se agregan 50 μ g/ml de RNAasa A (libre de DNAasa) y se incuba por 30 min a 37°C.
8. Se hacen 2-3 extracciones con 400 μ l de cloroformo.
9. Se precipita con el agregado de 1 volumen de isopropanol 100% y centrifugación a máx velocidad por 10 min a temperatura ambiente.
10. El *pellet* se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en 32 μ l de H₂O estéril.
11. Se agregan 8 μ l de 4 M NaCl y 40 μ l de PEG₈₀₀₀ 13%, se mezcla muy bien y se incuba en hielo por 30 min.
12. Se centrifuga a máxima velocidad por 20 min a 4°C.
13. El *pellet* se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en 20 μ l de H₂O.

Soluciones.

Solución I: 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8.

Solución II: 0.2 N NaOH, 1 % SDS.

Solución III: 3 M acetato de potasio pH 4.8 o 3 M acetato de sodio pH 5.2.

5.4 Secuenciación de DNA.

La secuenciación de ácidos nucleicos se lleva a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). El *kit* utilizado fue el *fmoI* (Promega) utilizada según las instrucciones del fabricante. Como templados se utilizan los plásmidos doble cadena purificados por el método de lisis alcalina/PEG.

5.5 Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* con el sistema pRSET/His6x

5.5.1 Concepto

La serie de plásmidos pRSET permiten la expresión de polipéptidos en *E. coli* bajo un sistema binario. Estos plásmidos poseen un promotor del fago T7. Para que este promotor funcione en una célula de *E. coli* debe aportarse la RNA polimerasa del fago T7. Para ello se utiliza la cepa de *E. coli* conocida como BL21/Lys (F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B⁻) gal (DE3) dcm pLysS, (cam^R)). Esta cepa posee en su genoma el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG. De este modo, las células tratadas con este compuesto expresan la polimerasa de T7 y por ende la proteína bajo el control del promotor T7 en pRSET. Además, esta cepa posee un plásmido (pLysS, cam^R) que tiene el gen para una lisozima bacteriana bajo el control de otro promotor T7. La presencia de este plásmido no solo aporta la existencia de una lisozima después de la inducción, lo cual mejora la lisis celular notablemente, sino que además reduce el basal de expresión del gen en pRSET. Para facilitar la purificación de la proteína recombinante, este sistema expresa la misma como una fusión con un pequeño péptido que contiene un motivo de 6 histidinas, cuyos grupos imidazólicos poseen una gran afinidad por el Ni⁺². De este modo, la proteína recombinante puede purificarse a homogeneidad con el uso de resinas de Ni⁺² coordinado a una matriz sólida. La interacción es tan fuerte que puede realizarse en presencia de agentes desnaturizantes como urea, lo cual hace que este sea el mejor sistema cuando la proteína produce cuerpos de inclusión, los cuales deben ser disueltos con agentes caotrópicos.

A continuación se detalla un protocolo para la expresión con este sistema, para el caso de una proteína que forma cuerpos de inclusión.

5.5.2 Protocolo

5.5.2.1 Cultivo e inducción

1. Transformar bacterias BL21Lys(DE3) competentes con la construcción de interés. Seleccionar sobre LB ampicilina/cloramfenicol.
2. Repicar una colonia a 3 ml de cultivo líquido y crecer ON a 37°C con agitación.
3. Inocular 250 ml de cultivo líquido y crecer hasta DO_{600} 0.45-0.55. Inducir la expresión con 0.1-0.5 μ M IPTG. Seguir creciendo 2-3 hrs.
4. Es importante retirar 1 ml de cultivo antes de inducir, para utilizar como control, centrifugar 2 min a 10000xg y congelar.

Visualización de la expresión

5. Una vez terminada la inducción se toman 0.5 ml del cultivo (la mitad que el control sin inducir) y se cosecha centrifugando a 10000xg. Esta muestra y la que hemos tomado antes de la inducción se usan para certificar la expresión.
6. Se resuspenden las células en 100 μ l de Buffer de Lisis (Tris HCl 50 mM pH 7.5-8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) con Tritón X-100 1%. Las muestras se sonicán con tres pulsos de 30 seg a la máxima capacidad de la micropunta **Importante:** el proceso de sonicado puede hervir la muestra, por lo que se requiere ser muy cuidados y mantener permanentemente la muestra en hielo. Una mezcla de hielo y NaCl asegura una temperatura suficientemente baja.
7. Los lisados se centrifugan 10 min a 10000xg. En el pellet se hallan los cuerpos de inclusión y el sobrenadante se considera como extracto soluble.
8. Ambas fracciones de ambas muestras (- y + IPTG) se siembran en geles SDS-PAGE y se visualizan las proteínas con Coomassie Blue.

5.5.2.2 Lisis celular

9. Si la expresión es satisfactoria se realiza la lisis de las células cosechadas por centrifugación a 5000xg 15 min al finalizar la inducción (el pellet se puede guardar a -70°C).
10. El pellet se resuspende en 3 ml de Buffer de Lisis, se agregan 8 μ l de PMSF 50 mM por gramo de peso húmedo y lisozima a 50 μ g/ml concentración final (opcional).

11. Se sonica la suspensión 3 veces por 30 segundos en hielo.
12. Luego se procede a degradar los ácidos nucleicos con el agregado de DNAasa I y RNAasa 20 µg/ml final. Se deja agitando hasta que la solución pierda la apariencia viscosa.
13. Si la proteína se expresa como proteína soluble, se toma el sobrenadante y se lo guarda hasta la purificación de la proteína.

5.5.2.3 Purificación de los cuerpos de inclusión (proteína insoluble, TcSR)

14. Se centrifuga el lisado 15 min a 12000xg a 4°C.
15. El pellet con los cuerpos de inclusión se resuspende en 5 ml de Buffer de Lisis con 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA y antiproteásicos.
16. Se agita y vortexea 5 min y se recentrifuga 15 min 12000xg 4°C.
17. El pellet se trata de resuspender en 5 ml de agua deionizada. Se vuelve a centrifugar.

5.5.2.4 Purificación de la proteína recombinante (insoluble)

18. El pellet se resuspende en 3 ml de Buffer A (6 M isotiocianato de guanidinio, 10 mM Tris HCl, 0.1 M NaPO₄, pH 8).
19. Se agita 1 hr a temperatura ambiente y los cuerpos que no se han resuspendido se retiran por centrifugación 15 min 12000xg a 4°C.
20. Al sobrenadante se le agrega 8 ml de una suspensión 50% v/v de la resina con Ni²⁺ (NTI-agarosa de Quiagen por ejemplo) previamente equilibrada en Buffer A.
21. Se permite la interacción agitando 1 hr temperatura ambiente y luego se empaqueta la resina en una columna (existen columnitas preparadas, pero son muy caras. Se puede usar una jeringa con un pedacito de Valeriana cortado para retener la resina. En este caso, cuidar que la resina se empaque correctamente y no usar jeringas muy anchas o muy delgadas).
22. Se realizan lavados con 5 volúmenes de lecho de Buffer B (6 M isotiocianato de guanidinio, 10 mM Tris HCl, 0.1M NaPO₄, pH 8), 5 volúmenes de Buffer C (igual que

Buffer B pero pH 6.5). Corroborar que la última porción de los lavados con Buffer C tenga una DO_{280} por debajo de 0.1. Alternativamente, seguir estos pasos por Bradford y detener los lavados cuando el eluido deja de tomar coloración azul.

23. La elución se realiza con un gradiente de pH logrado con el Buffer C y el Buffer D (igual que C pero pH 3.5) Con un gradiente de 10 volúmenes de lecho es suficiente. Puede hacerse por pasos, la elución. En nuestra experiencia, la proteína no eluye a pHs mayores de 5, con lo que a veces puede hacerse un corte a ese pH. **Atención:** el buffer D tiende a alcalinizarse, guardar a -20°C .
24. Se recogen fracciones de 0.5/1 ml y se van siguiendo por Bradford.
25. Las fracciones con proteína se corren en SDS-PAGE. La resina se regenera según instrucciones del fabricante.

5.5.2.5 Purificación de la proteína soluble (TcSRPK y TbSRPK)

- 19 bis. Se incuba el sobrenadante de la lisis celular con resina equilibrada en el buffer de lisis, por 1 hora a 4°C . Se puede incluir 10 mM en el buffer, para disminuir el pegado inespecífico.
- 20 bis. Se siembra en una columna, (no descartar el percolado, se puede volver a cargar en la columna y además, es representa un control que nos indicará cuán eficiente ha sido el pegado a la resina, al compararlo con el "input".
- 21 bis. Se lava con 5 volúmenes de resina de buffer de lavado con 10-20 mM de Imidazol.
- 22 bis. Se puede hacer un gradiente de concentración de Imidazol, pero no conviene por razones de simpleza y rapidez . Además, eluyendo por pasos, se puede obtener la proteína mas concentrada. Se preparan soluciones de buffer de lisis, con concentraciones de Imidazol crecientes (un primer corte a 50 mM Imidazol es correcto, para empezar). Generalmente, las proteínas recombinantes salen entre 150 y 200 mM Imidazol. Entonces, buffers con 50, 100, 150, 200, 250 y 500 mM Imidazol son suficientes. Se toman alícuotas de no mas de 0.5-1 ml.

5.5.2.6 Diálisis.

26. Para renaturalizar la proteína se dializa contra soluciones que paulatinamente disminuyen su contenido de urea. El agregado de glicerol 20% y DTT 1 mM favorece el correcto plegamiento. La diálisis se realiza contra 100 volúmenes de buffer de diálisis con agitación y a 4°C.
- 23 bis. Si la proteína es soluble, se dializa contra algún buffer de interés (generalmente, se usó Tris-HCl 50mM pH 7.5, 10% glicerol, 10% DTT, algún antiproteásico (dependiendo de la disponibilidad) (no hace falta agregar a cada vez PMSF, ya que la inhibición que produce es irreversible). Se dializa ON a 4°C y se alicuota en pequeñas fracciones (5, 10, 50 μ l) y se guardan a -70°C, hasta su uso.

6. Anticuerpos: obtención y usos.

6.1 Obtención de anticuerpos.

Los anticuerpos contra His6x-TcSR y TcSRPK fueron obtenidos inoculando ratones con cada proteína. A continuación detallo el protocolo para preparar antígenos a partir de cuerpos de inclusión (para TcSR). En el caso de TcSRPK se partió de la proteína soluble, ya que se expresa fuertemente como tal, se parte del punto 2, del protocolo.

1. Se preparan los cuerpos de inclusión y se purifica la proteína por afinidad a columnas de Ni²⁺ como se describe en la sección anterior.
2. Se cuantifica la proteína eluida de las columnas de Ni²⁺ mediante comparación con cantidades conocidas de una proteína patrón (BSA por ejemplo) en geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie Blue. El rango de linealidad para esta tinción está entre 100 ng y 5 μ g.
3. Se siembra 1 mg de proteína recombinante en un gel SDS-PAGE. Para ello se utilizan calles de gran tamaño (6 cm o más). Al finalizar la corrida se tiñe el gel con Coomassie Blue en agua (no fijar) y se localiza la banda de interés. Se corta con un bisturí estéril y se troza en pequeños fragmentos.
4. Se liofilizan los fragmentos de gel y una vez secos se pulverizan con mortero. El polvo se humedece con PBS 1x y se pasa repetidas veces por jeringas de grosor descendente hasta lograr pasar el granulado por una punta 21G o 22G.

5. Este granulado se puede emulsionar con adjuvante de Freund completo o se puede inocular sin adjuvar. Para los anticuerpos contra TcSR se inocularon 2 ratones por vía subcutánea. Se los volvió a inyectar 2 veces, con la misma preparación antigénica, y se sangraron un mes más tarde. Antes de la primera dosis se retiró suero preinmune.

6.2 Western blot.

Electroforesis. Se realiza un gel SDS-PAGE del porcentaje adecuado. Típicamente, se resuelven 20-50 μg extractos proteicos (o ng de proteína recombinante pura) por calle.

Transferencia semihúmeda. Una vez que ha terminado la corrida electroforética, se desarma el gel y se procede a la transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa. Se toma el gel con guantes y se monta sobre una torre de tres papeles Whatmann 3MM y el filtro de nitrocelulosa, previamente humedecidos en Tris-glicina-SDS 1x, metanol 10%. Se cubre el gel con otros tres papeles embebidos en el mismo buffer y se monta todo el dispositivo sobre el grafito anódico. Se cubre con el grafito catódico y se transfiere 20 min a 200 V constante (se necesita una fuente de alto poder). Es fundamental corroborar que no queden burbujas entre papeles-grafitos-filtro-gel.

Se certifica el éxito de la transferencia tiñendo el filtro de nitrocelulosa con Poinceau S. El mismo se puede guardar por varios días a -20°C . Se marcan con lápiz los marcadores de peso molecular sobre la cara que tiene la proteína.

Se bloquea el filtro con una solución de bloqueo (3-5% leche descremada en polvo, TBS 1x, Tween-20 0.1% p/v). Una hora a temperatura ambiente con agitación suele ser suficiente. Para mAb104, alcanzan veinte minutos, recordemos que el Ab reconoce un fosfoepitope y la leche contiene fosfatasas.

Se incuba con una dilución del primer anticuerpo 1-2 hs a temperatura ambiente con agitación (ON a 4°C se puede, también) (hay que optimizar para cada caso, 1/500 funcionó bien para TcSR y TcSRPK y 1:20 para mAb104). Se realizan 3-5 lavados de 5 min con TBS 1x, Tween-20 0.1% p/v también en agitación.

Se incuba con una dilución del anticuerpo secundario correspondiente según indicaciones del proveedor y se repiten los lavados.

Se revela según instrucciones del proveedor de los reactivos de detección. En este trabajo se ha utilizado el *kit* Renaissance "ECL" (Dupont, NEN, USA) para detección con quimioluminiscencia.

7. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.

7.1 Southern blot.

Aquí voy a describir un ensayo de Southern blot partiendo de DNA genómico y al final del protocolo agregaré algunas observaciones para realizarlo sobre productos de PCR, fragmentos de digestión plasmídica o colonias bacterianas, o para realizar un Northern blot.

1. **Enzimas.** Si el Southern blot es realizado para conocer el número de copias del gen en un genoma, se elijen dos tipos de enzimas, unas con sitio de corte dentro de la sonda y otras sin sitios de corte. En el caso de ser una copia única, la interpretación podría ser fácil: con el primer grupo obtendremos dos bandas y con el segundo solo una. Esto no siempre ocurre de este modo dada la presencia de genes relacionados que dan reacción cruzada, polimorfismo para los sitios de restricción, etc, pero es un comienzo. Si es necesario hacer digestiones con dos enzimas, tratamos de que ambas corten en un mismo buffer.
2. **Digestión.** Se digiere DNA genómico con 5 unidades de enzima por microgramo de DNA. Para estos ensayos hay que asegurarse que la digestión del DNA sea total. Una digestión parcial puede confundir la interpretación sobre el número de copias de un gen por genoma. La mejor manera de asegurar la digestión total es mediante curvas de tiempo. Una vez que el patrón de digestión visualizado en geles de agarosa ya no varía, es que estamos en condiciones de digestión total. El tiempo para alcanzar este punto varía según la enzima y ha de ser optimizado para cada caso particular. Aunque una digestión ON suele ser total en la mayoría de los casos, se trata de evitar incubaciones tan largas, debido a la actividad inespecífica de corte

de muchas enzimas. Con respecto a la cantidad de DNA a digerir, entre 5 y 10 μg por calle es suficiente.

3. **Electroforesis.** Los fragmentos de digestión se resuelven en agarosa entre 0.6 y 0.8% p/v. Más concentrados tienen mala resolución. Preferentemente, los geles serán tan finitos como el volumen de siembra nos lo permita. Esto optimiza la transferencia. En una calle del costado y separado por una calle de las muestras, se corren unos 100 ng de un marcador de peso molecular. Los geles corren hasta que el azul de bromofenol está a 2/3 del final del gel. La visualización es con EtBr 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
4. **Transferencia.** Antes de transferir el gel se trata de la siguiente manera: se incuba por 20 min en 0.25N de HCl (solución de depurinación), se lava con agua bidestilada y se incuba por 15 min en una solución 0.4N de NaOH. Después se coloca el gel boca abajo sobre un Whatman 3MM y se arma el típico dispositivo de transferencia (Ausubel, 1997). Al poner el gel boca abajo el DNA queda más cerca de la superficie y se transfiere mejor y más rápido. Es conveniente aislar el Whatman inferior con un "marco" hecho de placas radiográficas viejas o trozos de Parafilm, para evitar que los papeles de la torres arriba del gel toquen el Whatman y la transferencia de buffer ocurra por afuera del gel. Manipular la membrana siempre con guantes o pinzas. **Nota:** En caso de usar HybondN⁺ de Amersham, se transfiere DNA con 0.4 N NaOH y no necesita fijación.
5. **Fijación:** después de transferir ON se retiran los papeles absorbentes y con un lápiz se marcan las calles. Los filtros se lavan con 2xSSC y se guardan húmedos a 4°C hasta el momento de la hibridación. Se corta la porción que tiene los marcadores de peso molecular.
6. **Marcación de la sonda.** Si la sonda es mayor de 200 pb, se usa "random priming" con $\alpha(^{32}\text{P})\text{-dCTP}$ marcado. Se realiza según las instrucciones del proveedor del kit. Si la sonda es un oligonucleótido, se marca con T4 polinucleótido quinasa y $\gamma(^{32}\text{P})\text{-ATP}$. En este caso hay que separar la marca incorporada de la marca libre. Generalmente, lo que hacemos es precipitar tres veces con 2 volúmenes de 100% etanol, 0.4 volúmenes de 7.5 M AcNH_4 y algún "carrier" como acrilamida lineal, RNAt o glicógeno (1-5 μg).
7. Se marcan con T4 PNK y $\gamma(^{32}\text{P})\text{-ATP}$ unos 5 ng del patrón de peso molecular que se corrió en el gel. **Importante!:** comprar marcadores defosforilados.

8. **Hibridación.** La hibridación y la prehibridación se hacen con Solución de Church. Es importante cambiar la solución de prehibridación antes de poner la sonda. Esto reduce mucho la suciedad en el filtro. **Nota:** No olvidarse de hervir la sonda 10 min. antes de ponerla en la solución de hibridación (llevar en hielo hasta el homo después de hervir, para evitar la renaturalización). Con una hora de prehibridación y entre 5 hs. y ON de hibridación es suficiente. Si la sonda es homóloga todo el proceso se hace a 60-65°C. Si la sonda es heteróloga hay que poner a punto para cada caso.
9. **Lavados.** Los lavados son con solución SSC cada vez más diluída y el número y tiempo de cada lavado depende de la señal que percibimos con un contador Geiger. Típicamente, se empieza con enjuagues de 5 min con SSC 2x SDS 0.1% a temperatura ambiente, para luego bajar a SSC 1x, SSC 0.5x y de ser necesario SSC 0.1x, todo a la temperatura de hibridación. **Consejo:** es mejor hibridar estrictamente que tener que lavar mucho. La sonda que ya se ha "pegado" es muy difícil de despegar.
10. **Exposición.** Se envuelve la membrana en un folio plástico y se sella con calor. No olvidarse de orientar la membrana con respecto a la placa radiográfica para poder reconocer los orígenes de siembra. En el mismo folio se coloca la membrana conteniendo los marcadores de peso molecular, reconstruyendo entonces la membrana original.

Observaciones: Si el Southern blot es para conocer la identidad de un fragmento de PCR o de los productos de digestión de un plásmido, fago, etc, realizamos las siguientes modificaciones: no se trata al gel con ninguna de las soluciones antes de transferir y se acorta el tiempo de transferencia y de hibridación. Esto se debe a que estamos trabajando con masas muy grandes de DNA.

7.2 Northern blot.

1. **Preparación de la muestra.** La muestra se prepara del siguiente modo: 1 volumen de muestra más dos volúmenes de formamida deionizada más 1 volumen de RNA LB 4x. Se calienta 10 min a 70°C, se coloca en hielo y se siembra inmediatamente.

2. **Electroforesis.** El gel desnaturizante para RNA se hace según se indica en la sección Técnicas electroforéticas. Al terminar la corrida se enjuaga el gel 20-30 min con agua deionizada para sacar un poco de formaldehído.
3. **Transferencia.** Se utiliza el mismo dispositivo que para Southern blot. La solución de transferencia para Hybond N+ es NaOH 0.05 N.
4. **Hibridación** igual que para Southern blot.

8. Clonado de genes de *Trypanosoma cruzi*.

8.1 *tcsr*.

La tesis del Dr. Joaquín Espinosa describe en detalle la obtención de los clones con secuencia parcial de *tcsr*. Básicamente, en un ensayo de doble híbrido en levaduras *S. cerevisiae* utilizando al gen completo de la PZFP (Poly Zinc Finger Protein) una proteína con dedos de zinc del tipo CCHC como anzuelo, se identificaron una serie de clones idénticos, todos correspondientes a un marco abierto de lectura incompleto, con una región 5' rica en AT con un sitio aceptor de splicing posible, y un codón de iniciación ATG, pero no de STOP, no descrito en *Trypanosoma cruzi*, con homología de secuencia con proteínas de unión a RNA. Diseñamos varias estrategias, como búsquedas en bibliotecas genómicas, de cDNA, clonado molecular por PCR, para intentar clonar el gen completo o full length. Solo describiré aquí la técnica que arrojó resultados positivos, la de clonado molecular por PCR ("*nested PCR*").

El método está basado en Paabo, 1989. La idea es muy sencilla, y está esquematizada en la figura 58:

El clon que teníamos tenía 657 pares de bases y debíamos extendernos hacia el extremo 3'. Diseñamos 3 primers en orientación 5'-3' de los clones obtenidos en el doble híbrido (primers sense):

sense 1: 5'-CTTCGCAGCAAAGTGGAGGAG-3' (posiciones 346 a 366)

sense 2: 5'-GGTGATTGCCGTCTTTCTGTTC-3' (posiciones 475 a 495)

sense 3: 5'-TCGACGCAGAAGTTACAGTTACA-3' (posiciones 618 a 640)

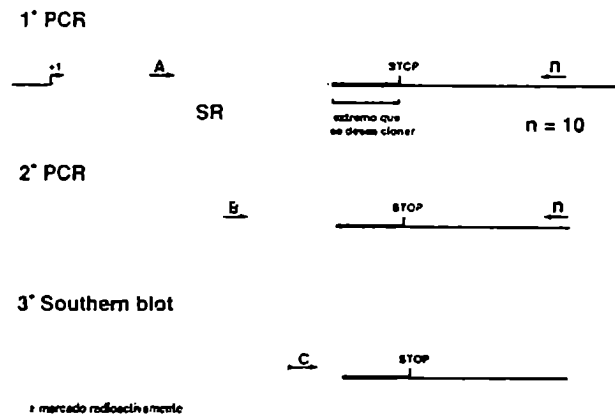


Figura 58. Esquema de la estrategia utilizada para el clonado del gen *tcsr*. En primer lugar, se realizó una PCR con DNA genómico como templado y el primer A, basados en la secuencia conocida obtenida en el doble híbrido (ver texto), y primers inespecíficos denominados "n". El segundo paso fue realizar una PCR con la primera PCR como templado y de cada par de primers A-n₁ se cambió el primer A por uno diseñado específicamente, B. Estos productos se transfirieron a membranas de nylon y se realizó una hibridación con el oligonucleótido C marcado radioactivamente, como sonda. Los clones positivos se secuenciaron. La obtención del gen completo se describe en el texto. En amarillo, porción del gen *tcsr* que se conocía (por el 2H); en Rojo, porción del gen que se deseaba clonar (3'); +1 indica la posición del codón de iniciación putativo; Negro, DNA genómico no codificante. Asterisco rojo, ³²P.

Se diseñaron *primers* específicos sobre la secuencia conocida del doble híbrido, (primer A, B o C en la figura), en sentido "sense". Se realizó la primera serie de PCRs sobre DNA genómico de *Trypanosoma cruzi*, utilizando el primer A y diez primers inespecíficos diferentes, antisentido (en nuestro caso, se utilizaron primers con secuencias de ratón, cedidos por Tomás Falzone, del laboratorio del Dr. Rubinstein, en aquel entonces). Cabe aclarar que se hicieron 10 PCRs, todas con el primer específico A y diferente primer inespecífico n, en la figura 58. Es decir: cada par A-n₁, con n de 1 a 10, y A constante.

Cada una de estas PCRs fue utilizada como fuente de templado (en lugar de DNA genómico) para una segunda serie de reacciones, con la modificación adicional que se utilizó el primer B, en lugar del A. Los primers inespecíficos se mantuvieron igual. Es decir para el templado obtenido con el par A-n₁, en la primera amplificación, se realizó la PCR con primers B-n₁ y así sucesivamente, con los demás primers inespecíficos. Esta segunda ronda amplificatoria, fue separada en un gel de agarosa 1%, transferida a una membrana de nylon y se realizó un ensayo de Southern blot, utilizando como sonda, un tercer oligonucleótido C, marcado radioactivamente.

Aquellos clones que dieron una señal positiva fueron escindidos de un gel de agarosa preparativo, y subclonados en vectores de clonación rápido, como pGEM-T-easy[®] (Promega). La identidad de los clones fue confirmada por secuenciación. Finalmente, se

determinó que el codón STOP mas probable era el primero de una serie, basados en el mayor porcentaje de GC, de las regiones codificantes.

Teniendo en cuenta secuencia 3' obtenida por "nested PCR", y el extremo 5' obtenido por doble híbrido, se diseñaron primers para obtener el gen completo, o "full length", a partir de DNA genómico de *Trypanosoma cruzi*. La PCR realizada con dichos primers dio una única banda, correspondiente, luego de que fuera secuenciada, a un marco abierto de lectura, de 771 pares de bases (pb).

8.2 *tcsrpk* y *tbsrpk*.

Búsquedas en bases de datos de Trypanosomátidos (www.cbil.upenn.edu/ParaDBs/T_cruzi (o T_brucei, según el caso), utilizando en gen completo de hSRPK1 (hSRPK1 de humanos, número de acceso NP 003128) como anzuelo, arrojaron dos resultados positivos: Un EST (TENS 2583) con homología con hSRPK1 en *Trypanosoma cruzi*, y un clon, en *Trypanosoma brucei* correspondiente a la secuencia de gran parte del brazo largo del Cromosoma 6 de ese organismo. El clon de *T. cruzi*, era de aproximadamente 400 pares de bases y presentaba alta homología con el Dominio de Activación y el loop P+1 (figura 38, Resultados Parte II). El clon de *T. brucei*, en cambio contenía un marco abierto de lectura con homología con todo el gen hSRPK1. Para clonar el gen completo de *tcsrpk*, se utilizó la técnica de RT-PCR.

El extremo 5' del gen se clonó haciendo una transcripción reversa (RT), utilizando el primer "antisense" (**TENS 2583 3' reverse I**: 5'-GGTAAACTTGTGCTTGCGGTAAA-3'). El RNA (5 µl), se desnaturalizó a 65°C por 5 min y luego se agregó la mezcla de reacción conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 U RNAsin (Promega), 400 µM dNTPs, 2.5 µM de primer, según el caso y 300 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La reacciones se incubaron a 35°C por 1 h, se se inactivó a 95°C por 5 min.

Luego, la PCR se realizó utilizando los primers *me*: 5'-GGATCCCTAACGCTATTATTG-3', correspondiente al miniexón como primer sense, y como antisense el primer **TENS 2583 3' reverse II**: 5'-CGCAGCGCACCGCGCGAATTG-3'. Para el extremo 3' de *tcsrpk*, la RT fue realizada con un oligodT como primer "antisense", y la PCR fue realizada con los primers **TENS 2583 5' sense**: 5'-GTTGGACATACAGGCAGTTCACG-3' y oligodT nuevamente. Ambas PCRs se resolvieron en un gel de agarosa 0.8%, transferidos a membranas de nylon (HybondN⁺) e hibridizados utilizando al clon TENS 2583 completo,

marcado radioactivamente, como sonda. Los clones positivos se cortaron y purificaron de un gel de agarosa y se clonaron en el vector de clonado pGEM-T-easy® de Promega. El gen completo de *tcsrpk*, se obtuvo a partir de DNA genómico total de *Trypanosoma cruzi*, utilizando los primers: **NdeI tcsrpk ATG sense:** 5'-CATATGCCGAAGTTTAACAAG-3' y **BamHI tcsrpk STOP reverse:** 5'-GGATCCTCAATCGCTCCCAGCGTCA-3'. Se obtuvo un solo producto de amplificación de 2148 pb que fue clonado en el vector de expresión en bacterias pET19b (Novagen), digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado de un gel de agarosa. El inserto se secuenció nuevamente por completo para confirmar su identidad.

9. Ensayos in vivo con levaduras de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

9.1 Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas.

Se utilizaron las siguientes cepas haploides de *S. pombe*: 1913 (*h- leu1*), 2D4 (*h- leu1 ura4 dsk1::ura4⁺ kic1::ura4⁺ his2*), 2A5 (*h- leu1 ura4 kic1::ura4⁺ his2*) and B8 (*h- leu1 ura4 dsk1::ura4⁺ his2*) (Tang, 2000).

9.2 Expresión de proteínas recombinantes en *Schizosaccharomyces pombe*.

Para la expresión de proteínas recombinantes en levaduras de fisión, se utilizó el plásmido pREP1 (Maundrell, 1993) (gentileza del Dr. Ren-Jan Lin, City of Hope). La expresión de los distintos insertos en este plásmido no integrativo, se indujo mediante la eliminación de la tiamina que reprime el promotor *nmt1⁺*. Esto se realizó reestriando colonias a placas sin tiamina, o bien repicando un cultivo a medio sin tiamina. El clonado de los distintos genes en el vector previamente digerido con las enzimas Nde I y BamHI, se hizo utilizando los siguientes primers:

tcsrpk:

1. **NdeI tcsrpk ATG sense:** 5'-CATATGCCGAAGTTTAACAAG-3'

2. **BamHI tcsrpk STOP reverse:** 5'-GGATCCTCAATCGCTCCCAGCGTCA-3'
 3. **NdeI tcsrpk Δ N ATG sense:** 5'-CATATGTGGGAGATTGAGCGTCTGCAT-3'
 4. **BamHI tcsrpk Δ C STOP reverse:** 5'-GGATCCTTAATGCAGACGCTCAATCTCCCA-3'

tbsrpk:

5. **NdeI tbsrpk ATG sense:** 5'-CATATGCCCCGACCCGACAGAAGA-3'
 6. **BamHI tbsrpk STOP reverse:** 5'-GGATCCTTAGTCATTAGTGCAGCTGCTG-3'

tcsr:

7. **NdeI tcsr ATG sense:** 5'-CATATGAAAACAACGTCCGTTTTT-3'
 8. **BamHI tcsr STOP reverse:** 5'-GGATCCTCACGATCGACTACTATAACT-3'
 9. **BamHI tcsr Δ RS STOP reverse:** 5'-GGATCCGGTGATTGCCGTCTTTCTGTT-3'

Primers 1 y 2 para el gen completo *tcsrpk*, 2 y 3 para mutante Δ N, 1 y 4 para mutante Δ C, primers 5 y 6 para gen completo *tbsrpk*, 7 y 8 para *tcsr*, gen completo y finalmente 7 y 9 para mutante *tcsr Δ RS*.

Las mutantes de TcSRPK son: TcSRPK Δ N aminoácidos 395 a 716, y TcSRPK Δ C 1 a 403. Básicamente, las mutantes contienen todos los dominios presentes en la mitad N-terminal (Δ C) hasta la mitad de la región espaciadora o spacer región y desde la mitad de esta región hasta el final de la proteína (conteniendo todos los dominios presentes en esa porción) en el caso de TcSRPK Δ N.

9.3 Transformación de levaduras con pREP1.

Para la manipulación de levaduras se siguieron los protocolos claros de Moreno, 1991. Básicamente se usó el protocolo de acetato de litio para transformar todas las cepas utilizadas con todas las construcciones utilizadas.

1. Largar un cultivo ON de 5 ml en medio YES de la cepa que se desea transformar, a 33°C, en agitación.
2. Se utiliza una cantidad de células de ese cultivo tales que al inocular un cultivo de 200 ml de medio YES, este crezca a una densidad de entre 0.5 y 1.5 x 10⁷ células/ml en un cultivo ON. Esto es algo que hay que poner a punto para cada cepa, ya que no todas crecen a la misma tasa.
3. Una vez confirmado que las células están en el rango necesario (fase de crecimiento exponencial), se cosechan por centrifugación a 5000xg y 4°C. Se

lavan las células con agua mQ estéril y se resuspenden a una densidad final de 10^8 células/ml, en 0.1 M Acetato de Litio en buffer TE.

4. Se incuban por 1h a 30°C, con agitación ocasional.
5. Se agrega 1 μ g de plásmido en 15 μ l de buffer TE (aprox. 70 ng/ μ l) a 100 μ l de suspensión de células, se agregan 290 μ l de 50% PEG 3350 y se incuban por 1h a 30°C con vortexeado ocasional.
6. "Heat shock", a 42°C por 15 min y luego se deja enfriar suavemente a temperatura ambiente por 10 min.
7. Se centrifugan y se lavan las células a 6000xg. Se resuspenden las células en 100-200 μ l de medio líquido EMM2 sin leucina (aminoácido utilizado para seleccionar transformantes).
8. Plaques en la suspensión en placas de Petri con medio sólido EMM2 suplementado con 2 μ M de tiamina e incubar a 33°C hasta que las colonias aparezcan (normalmente 2-3 días).

9.4 Inducción de proteínas en las levaduras transformadas.

El protocolo se basa en quitar del medio la tiamina que reprime el promotor de *nmt1**. Para la elongación en medio líquido (todas las cepas menos 2D4) el protocolo es el siguiente:

1. Picar una colonia transformada a medio líquido EMM2 CON tiamina y crecer hasta la fase exponencial a 30°C.
2. Se mide la absorbancia a OD₆₀₀ de esos cultivos y se inocula nuevo medio EMM2 SIN tiamina de manera tal que NO llegue a fase estacionaria ON
3. Mantener el cultivo en fase exponencial por 20-25 horas, mediante el agregado de medio fresco, evitando una pobre oxigenación (volumen de medio << volumen de recipiente y agitación a 30°C).
4. Fijar 2 min a 72°C (se puede apoyar el portaobjetos en la plancha de la PCR, por ejemplo). Mirar al microscopio (400x esta perfecto).

Para la cepa 2D4, la inducción no se hace de esta manera. El rescate de la cepa no requiere la sobre-expresión del inserto. Simplemente se aprovecha la naturaleza "permissiva" del promotor reprimido con tiamina (expresión baja, no sobre-expresión) y

se estria una colonia obtenida en la transformación a una placa fresca de EMM2 CON tiamina. En el caso de los controles (pREP1/- o alguna mutante de quinasa TcSRPK) que prácticamente no crece en ese medio, se repican microcolonias (que se ven con algún esfuerzo) a la placa fresca. Se incuba 2 días a 33°C.

10. Expresión transitoria en células HeLa.

En primer lugar hubo que clonar los genes de *tcsrpk*, *tcsrpk Δ N/ Δ C*, *tbsrpk*, *tcsr* y *tcsr Δ rs* en el vector de expresión eucarionte pCG (ver trabajos de Caputi, 1994 y de Cramer, 1999). Otra vez, amplificamos por PCR los distintos insertos utilizando los primers:

tcsrpk:

1. **XbaI *tcsrpk* ATG sense:** 5'-TCTAGAATGCCGAAGTTTAACAAG3'
2. **BamHI *tcsrpk* STOP reverse:** 5'-GGATCCTCAATCGCTCCCAGCGTCA-3'
3. **XbaI *tcsrpk Δ N* ATG sense:** 5'-TCTAGAATGTGGGAGATTGAGCGTCTGCAT-3'
4. **BamHI *tcsrpk Δ C* STOP reverse:** 5'-GGATCCTTAATGCAGACGCTCAATCTCCCA-3'

tbsrpk:

5. **XbaI *tbsrpk* ATG sense:** 5'-TCTAGAATGCCCCGACCCGACAGAAGA-3'
6. **BamHI *tbsrpk* STOP reverse:** 5'-GGATCCTTAGTCATTAGTGCAGCTGCTG-3'

tcsr:

7. **XbaI *tcsr* ATG sense:** 5'-TCTAGAATGAAAACAACGTCCGTTTTT-3'
8. **BamHI *tcsr* STOP reverse:** 5'-GGATCCTCACGATCGACTACTATAACT-3'
9. **BamHI *tcsr Δ rs* STOP reverse:** 5'-GGATCCGGTGATTGCCGTCTTTCTGTT-3'

10.1 Transfección y medición de la capacidad de modular la reacción de splicing.

El ensayo de splicing alternativo in vivo en células HeLa se realizó en el laboratorio de Alberto Kornblihtt. El ensayo utiliza la construcción llamada minigén α -globina/fibronectina (α -glob/FN) (Vibe-Pedersen, 1984), en la cual la región genómica conteniendo el exón EDI, sus intrones flanqueantes y los exones EDI-1 y EDI+1 ha sido ligada al tercer exón del gen de la α -globina humana (α -gb). Esta construcción está presente en el plásmido pSVEDAtot (Caputi, 1994) en la cual la expresión del gen

quimérico α -globina/fibronectina se halla bajo la expresión del promotor de la α -gb humana. La transcripción del gen produce un transcripto primario con tres exones. Este es procesado a dos tipos de transcriptos maduros ya sea con los 3 exones o bien con 2 (ver figura 27), por splicing alternativo.

1. Crecer las células HeLa en medio DME con 10% suero fetal bovino
2. Agregar distintas concentraciones de plásmido con Lipofectamina (Gibco-BRL). Incluir un control de transfección "mock".
3. Dejar crecer las células 48 hs
4. Cosechar las células y preparar RNA
5. Reacción de Transcriptasa Reversa (RT) con oligodT. Incluir un control sin enzima transcriptasa reversa. 5 μ l de RNA se desnaturaliza a 65°C por 5 min y se coloca en baño de hielo. Se agregó la mezcla de reacción conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 U RNAsin (Promega), 400 μ M dNTPs, 2.5 μ M oligodT₁₂₋₁₈ (Pharmacia) y 300 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La reacciones se incubaron a 35°C por 1 h, se se inactivó a 95°C por 5 min
6. Realizar las PCRs radioactivas en condiciones establecidas en Cramer, 1999. Básicamente, 30 ciclos, Desnaturalización: 93°C, por 45", Apareamiento: 63°C, por 1 min, Elongación: 72°C por 30". α -(³²P)-dCTP (aprox. 1 μ Ci/reacción). Oligonucleótidos utilizados (1 μ M final de cada uno): **pSV3'**: 5'-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3', **pSV5'**: 5'-CACTGCCTGCTGGTGACTIONCGA-3', 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 3% DMSO, 1.5 u *Taq*, templado: 10% reacción de RT, siempre se incluyeron controles sin cDNA templado.
7. Separar los productos de PCR radioactivos en un gel de poliacrilamida nativo al 6%, corridos a 15W en TBE1x.
8. Cuantificación de las diferentes bandas mediante Fosfoimager.

11. Ensayos de splicing in vitro.

NOTA: Primeramente, hay que tener en consideración que para trabajar con RNA y evitar las contaminaciones por RNAsas, no hay que volverse paranoico, solo ser muy limpio y cuidadoso con todos los reactivos.

Preparación del templado: en nuestro caso utilizamos el templado de β -globina clonado en pBS digerido de manera de transcribirlo con T7 polimerasa en una reacción de *run-off*, in vitro, dCTP marcado radioactivamente con α -(32 P). Los templados se purificaron de un gel de poliacrilamida nativo 5% (se "revela" el gel bien rotulado para identificar la banda que es cortada y pasada a un tubo eppendorf), en agitación fuerte a 37°C en buffer Tris-HCl 10 mM, pH7.5, SDS 1%.

11.1 Protocolo.

1. 4 μ l de Extracto Nuclear (NE) (típicamente cerca de los 2-3 μ g/ μ l) o 15 μ l de Extracto S100 (0.5-1 μ g/ μ l) de células HeLa se incuban con el templado (no menos de 10^4 cpm/ensayo) y concentraciones crecientes de proteína TcSRPK o hSRPK1 recombinantes y/o proteína SR (para ensayo S100, solamente) ASF/SF2 expresada en baculovirus (se usó 10 ng) o TcSR renaturalizada (se usaron de 10 a 100 ng). Llevar a volúmen final (25 μ l) con buffer de NE, por 1-2 hs a 30°C. Todo en presencia de 10U de RNAsin (Promega).
2. Se detiene la reacción con el agregado de 200 μ l de buffer 1x de proteinasa K, con la enzima. Se incuba a 37°C por 15 minutos.
3. Se realiza una extracción con Fenol/Cloroformo
4. Precipitación alcohólica, y lavado de los RNAs
5. Resuspender los RNAs en 10 μ l de buffer de siembra de RNA.
6. Separación en gel desnaturizante de acrilamida 4-6%
7. Revelado de los productos de splicing y cuantificación con Phosphoimager.

12. Ensayos de fosforilación in vitro (Ensayo Quinasa, EQ o EK).

Se utilizó 1 μ g de sustrato en cada caso (ASF/SF2 y sus mutantes, LBR, TcSR, MBP, Histona H1, y β -caseína). Se incubaron (o no, control negativo) con alrededor de 50 ng de enzima TcSRPK, TbSRPK, CRK, o hSRPK1 (control positivo), en un volúmen final de 25 μ l, a 30°C por 30 minutos. La reacción se detuvo por agregado de 5 μ l de "cracking buffer" o buffer de Laemmli 6x y posterior hervido de las muestras. Las reacciones se sembraron en un gel SDS-PAGE de 10-12% dependiendo el caso,

transferidas a membranas de Nitrocelulosa como se explicó para Western blot, y revelados por autoradiografía.

13. Fijación de parásitos e inmunofluorescencia (IFI).

Existen muchos protocolos de fijación e IFI, pero a continuación presentamos el utilizado en esta Tesis.

1. Cultivo de *T. cruzi* en fase exponencial (se usan 10^6 células/ensayo)
2. Cosechar y lavar los parásitos por centrifugación con PBS estéril
3. Fijación con: Formaldehído 2%, Glutaraldehído 0.5% en PBS, 30 min a temperatura ambiente
4. lavar con PBS
5. Incubar 5 minutos con Metanol frío (-20°C)
6. lavar con PBS
7. Permeabilizar las células con Tritón X-100 0.02%, PBS por 5 min a temperatura ambiente
8. lavar con PBS
9. Bloquear con PBS-BSA (1%), 1h a temperatura ambiente, en agitación.
10. Incubar con 1^{er} anticuerpo (1/250 para Ab vs TcSRPK y 1/200 para Ab vs TcSR) en PBS-BSA 1%- Tween 20 0.05%, 1h a temperatura ambiente
11. Lavar 3-5 veces con PBS-Tween 20 0.05%, 5 min c/u. Centrifugar en frío (4°C , 5 minutos, 2500-2700 rpm, aproximadamente 250-500 μl cada lavado
12. Incubar con 2^{do} anticuerpo anti mouse acoplado a fluoróforo. Usamos FITC. Dilución 1/100 en PBS-BSA 1%-Tween 20 0.05%, 40 minutos a temperatura ambiente en agitación. CUIDAR DE LA LUZ.
13. Lavar 3-5 veces con PBS-Tween 20 0.05%, 5 min c/u.
14. Se puede agregar un último lavado con H_2O mQ
15. Centrifugar, dejar secar el pellet y resuspender en 30 μl de PBS

Controles importantes:

1. Incubar sólo con 2^{do} anticuerpo (FITC),
2. suero preinmune,

3. primer anticuerpo solo.

14. Tinción con DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride).

El protocolo de tinción con DAPI es rápido y sencillo. Existen muchos protocolos para teñir con DAPI células de levadura. Nosotros lo usamos con células fijadas por calor en un porta objetos al cual se agregó la solución de DAPI 1x (1 µg/ml de DAPI, 1 mg/ml de fenilenendiamina (anti fade), 50% glicerol). Tomar 20 µl de solución stock de DAPI 10x (guardar a -20°C en oscuridad) y agregar 180 µl de 50% glicerol (se puede usar 100% también). Luego de incubar 2 minutos con solución de DAPI 1x, se descarta en excedente y ya se puede ver al microscopio.

15. Precipitación de proteínas SR de extractos de *Trypanosoma cruzi*.

Este experimento se basó en una característica de las proteínas SR: son insolubles a una concentración de MgCl₂ de 20 mM. El experimento no asume necesariamente que existen otras proteínas en el parásito con esas características, además de TcSR.

1. Se tomaron 100 µg de extracto total de epimastigotes y trypomastigotes se centrifugaron a 12000xg por 10 min a 4°C y se llevaron a 20 mM MgCl₂.
2. Se incuban a 4°C en agitación por 1-2 hs.
3. Se centrifugan las proteínas insolubles, 12000xg por 20 minutos a 4°C.
4. Se resuspenden los pellets en buffer A: 50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT y se dializan contra 50 volúmenes del mismo buffer.
5. 30 µg de proteínas de cada pellet se utilizaron en los ensayos de fosforilación.
6. El experimento continúa de igual manera que para los ensayos de fosforilación.

Nota: Estos experimentos se hicieron 3 veces de manera independiente con idénticos

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia.

- Agabian, N.** 1990. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. **61**, p.1157.
- Aly, R.M.; Argaman, M.; Halman, S.; and Shapira, M.** 1994. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* **22**, p.2922.
- Aksov, S.** 1992. Spliced leader RNA and 5S rRNA genes in *Herpetomonas* spp. are genetically linked. *Nucleic Acids Res.* **20**, p.913.
- Amrein, H.; Hedley, M.L.; and Maniatis, T.** 1994. The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by transformer2. *Cell*. **76**, p.735.
- Andrews, N.W.; Robbins, E.S.; Ley, V.; Hong, K.S.; and Nussenweig, V.** 1988. Developmentally regulated phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **167**, p.300.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; and Struhl, K.** 1997. *Current protocols in Molecular Biology*. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- Bandziulis, R.J.; Swanson, M.S.; and Dreyfuss, G.** 1989. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* **3**, p.431.
- Ben Amar, M.F.; Jefferies, D.; Pays, A.; Bakalara, N.; Kendall, G.; and Pays, E.** 1991. The actin gene promoter of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5857.
- Benne, R.** 1994. RNA editing in trypanosomes. *Eur. J. Biochem.* **221**, p.9.
- Benne, R.; Van Den Burg, J.; Brakenhoff, J.P.H.; Sloof, P.; Van Boom, J.H.; and Tromp, M.C.** 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*. **46**, p.819.

Berberof, M.; Vanhamme, L.; Tebabi, P.; Pays, A.; Jefferies, D.; Welburn, S.; and Pays, E. 1995. The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. EMBO J. **14**, p.2925.

Birnboim, H.C.; and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**, p.1513.

Blum, R.; Bakalara, N.; and Simpson, L. 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "Guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. Cell. **60**, p.189.

Boothroyd, J.C.; and Cross, G.A.M. 1982. Transcripts coding for variant surface glycoproteins in *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. Gene. **20**, p.281.

Bruce, D. 1895. Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand. Bennet and David, Durban. **28**.

Bruzik, J.P.; and Steitz, J.A. 1990. Spliced leader RNA sequences can substitute for the essential 5' end of U1 RNA during splicing in a mammalian in vitro system. Cell. **62**, p.889.

Bruzik, J.P.; and Maniatis, T. 1992. Spliced leader RNAs from lower eukaryotes are *trans*-spliced in mammalian cells. Nature. **360**, p.692.

Burge, C.B.; Tuschl, T.; and Sharp, P.A. 1999. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In Gesteland, R.F.; Cech, T.R.; Atkins, J.F. 1999 (2nd edition). The RNA World. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. USA.

Cáceres, J.F.; and Krainer, A.R. 1993. Functional analysis of pre-mRNA splicing factor ASF/SF2. EMBO J. **12**, p.4727.

Cáceres, J.F.; Stamm, S.; Helfmann, D.M.; and Krainer, A.R. 1994. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*. **265**, p.1706.

Cáceres, J.F.; and Krainer, A.R. 1999. Mammalian pre-RNA splicing factors. In Krainer, A. *Eukaryotic mRNA Processing*. 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.

Cao, W.; Jamison, S.F.; and García-Blanco, M.A. 1997. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA* **12**, p.1456.

Caputi, M.; Casari, G.; Guenzi, S.; Tagliabue, R.; Sidoli, A.; Melo, C.A.; and Baralle, F.E. 1994. A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acids Res.* **22**, p.1018.

Cavaloc, Y., Popielarz, M., Fuchs, J.-P., Gattoni, R. and Stévenin, J. 1994. Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *EMBO J.* **13**, p.2639.

Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* **1**, p.159.

Chagas, C. 1912. Sobre um trypanosoma do tatú. *Tatusia novemcincta*, transmittido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatú um depositario do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. *Brasil-Medico.* **26**, p.305.

Chung, H.M.; Lee, M.G.S.; and Van der Ploeg, L.H.T. 1992. RNA polymerase I-mediated protein coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today.* **8**, p.414.

Clayton, C.E. 1985. Structure and regulated expression of genes encoding fructose biphosphatase aldolase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **4**, p.2997.

Clayton, C.E.; Fueri, J.P.; Itzakhi, J.E.; Bellofatto, V.; Sherman, D.R.; Wisdom, G.S.; Vijayasarathy, S.; and Mowatt, M.R. 1990. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, p.30.

Clayton, C.E. 1992. Developmental regulation of gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **43**, p.37.

Cole, F.J. 1926. *The History of Protozoology*. London.

Colwill, K.; Pawson, T.; Andrews, J.; Prasad, J.; Manley, J.L.; Bell, J. C.; and Duncan, P.I. 1996. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intracellular distribution. *EMBO J.* **15**, p.265.

Colwill, K.; Feng, L. L.; Yeakley, J. M.; Gish, G. D.; Cáceres, J. F.; Pawson, T.; and Fu, X.-D. 1996bis. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine-arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.* **271**, p.24569.

Cornelissen, A.W.C.A.; Evers, R.; Grondal, E.; Hammer, A.; Jess, W.; and Köck, J. 1991. Transcription and RNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. *Nova Acta Leopold.* **279**, p.215.

Cramer, P.; Cáceres, J.F.; Cazalla, D.; Kadener, S.; Muro, A.F.; Baralle, F.E.; and Kornblihtt, A.R. 1999. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA Pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol. Cell* **4**, p.251.

CTD-WHO. Division of Control of Tropical Diseases – World Health Organization. 1997. Progress Report.

Curotto de LaFaille, M.A.; Laban, A.; and Wirth, D.F. 1992. Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, p.2703.

Gómez, E.B.; Santori, M.I.; Laria, S.; Engel, J.C.; Swindle, J.; Eisen, H.; Szankosi, P.; and Téllez-Iñón M.T. 2001. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**, p.97.

Gottesdiener, K.; Chung, H.M.; Brown, S.D.; Lee, M.G.S.; and Van der Ploeg, L.H.T. 1991. Characterization of VSG gene expression site promoters and promoter-associated DNA rearrangements events. *Mol. Cell. Biol.* **11**, p.2467.

Grant, P.T.; Sargent, J.R.; and Ryley, J.F. 1961. Respiratory systems in the Trypanosomatidae. *Biochem. J.* **81**, p.200.

Green, M.R. 1991. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-RNA splicing. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, p.559.

Gui, J. G.; Lane, W. S.; and Fu, X.-D. 1994. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature.* **369**, p.678.

Gui, J. G.; Tronchère, H.; Chandler, S. E.; and Fu, X.-D. 1994. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, p.10824.

Hajduk, S.L.; and Sabatini, R.S. 1996. RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. In Smith, D.F.; and Parsons, M. 1996. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.

Hastings, M.L.; and Krainer, A.R. 2001. Splicing in the new millennium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, p.302.

Hehl, A.; Vasella, E.; Braun, R.; and Roditi, I. 1994. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulate expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, p.370.

Hoare, C.A. 1972. *The Trypanosomes of Mammals: a Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Huang, J.L.; and Van der Ploeg, L.H.T. 1991. Maturation of polycistronic pre-mRNA in *Trypanosoma brucei*: analysis of trans-splicing and poly (A) addition at nascent RNA transcripts from the *hsp70* locus. *Mol. Cell. Biol.* **11**, p.3180.

Huang, J.L., and Van der Ploeg, L.H.T. 1991bis. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* **10**, p.3877.

Hug, M.; Carruthers, V.B.; Hartmann, C.; Sherman, D.S.; Cross, G.A.M.; and Clayton, C. 1993. A possible role for the 3'-untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, p.87.

Hug, M.; Hotz, H.-R.; Hartmann, C.; and Clayton, C. 1994. Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, p.7428.

Ismaili, N.; Pérez-Morga, D.; Walsh, P.; Mayeda, A.; Pays, A.; Tebabi, P.; Krainer, A.R.; and Pays, E. 1999. Characterization of a SR protein from *Trypanosoma brucei* with homology to RNA-binding cis-splicing proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **102**, p.103.

Ismaili, N.; Pérez-Morga, D.; Walsh, P.; Cadogan, M.; Pays, A.; Tebabi, P.; and Pays, E. 2000. Characterization of a *Trypanosoma brucei* SR domain-containing protein bearing homology to cis-spliceosomal U1 70 kDa proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **106**, p.109.

Janz, L.; Hug, M.; and Clayton, C. 1994. Factors that bind to RNA polymerase I promoter sequences of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**, p.99.

Jefferies, D.; Tebabi, P.; and Pays, E. 1991. Transient activity assays of the *Trypanosoma brucei* VSG promoter: control of gene expression at the posttranscriptional level. *Mol. Cell. Biol.* **11**, p.338.

Jefferies, D.; Tebabi, P.; Le Ray, D.; and Pays, E. 1993. The ble resistance gene as a new selectable marker for *trypanosoma brucei*: fly transmission of stable procyclic transformant to produce antibiotic resistance bloodstream forms. *Nucleic Acids Res.* **21**, p.191.

Jess, W.; Hammer, A.; and Cornelissen A.C.W.A. 1989. Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. *FEBS lett.* **249**, p.123.

Kadener, S.; Cramer, P.; Nogues, G.; Cazalla, D.; De la Mata, M.; Fededa, J.P.; Werbach, S.E.; Srebow, A.; and Kornblihtt, A.R. 2001. Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO J.* **20**, p.5759.

Kapotas, N.; and Bellofatto, V. 1993. Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **16**, p.4067.

Kataoka, N.; Bachorik, J.L.; and Dreyfuss, G. 1999. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol.* **145**, p.1145.

Kenan, D.J.; Query, C.C; and Keene, J.D. 1991. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci.* **16**, p.214.

Kim, Y.-J.; Zuo, P.; Manley, J.L.; and Baker, B.S. 1992. A *Drosophila* RNA binding protein RBP1 is localized to transcriptionally active sites of chromosomes and shows a functional similarity to human splicing factor ASF/SF2. *Genes Dev.* **6**, p.2569.

Köck, J.; Evers, R.; and Cornelissen, A.C.W.A. 1988. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* **16**, p.8753.

Koenig, E.; Delius, H.; Carrington, M.; Williams, R.O.; and Roditi, I. 1989. Duplication and transcription of procyclin genes in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **17**, p.8727.

Kohtz, J.D.; Jamison, S.F.; Will, C.L.; Zuo, P.; Lührmann, R.; and García-Blanco, M. 1994. Protein-protein interactions and 5' splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature.* **368**, p.119.

Kooter, J.M.; and Borst, P. 1984. α -Amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* **12**, p.9457.

Krainer, A.R.; and Maniatis, T. 1988. RNA splicing. In transcription and splicing. Hames, B.D.; and Glover, D.M. 1988. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.

Krainer, A.R.; Conway, G.C.; and Kozak, D. 1990. Purification and characterization of SF2, a human pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* **4**, p.1158.

Krainer, A.R.; Conway, G.C.; and Kozak, D. 1990bis. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell.* **62**, p.35.

Krainer, A.R.; Mayeda, A.; Kozak, D.; and Binns, G. 1991. Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K and *Drosophila* splicing regulators. *Cell.* **66**, p.383.

Krämer, A. 1993. Mammalian protein factors involved in nuclear pre-RNA splicing. *Mol. Biol. Rep.* **18**, p.93.

- Krause, M.; and Hirsh, D.** 1987. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell*. **49**, p.753.
- Lai, M.C.; Lin, R.I.; and Tarn, W.Y.** 2001. Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **98**, p.154.
- Lai, M.C.; Lin, R.I.; Huang, S.Y.; Tsai, C.W.; and Tarn, W.Y.** 2000. A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem*. **275**, p.7950.
- Laird, P.W.; Zomerdijk, J.C.B.M.; de Korte, D.; and Borst, P.** 1987. In vivo labeling of intermediates in the discontinuous synthesis of mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*. **6**, p.1055.
- Lamm, G.; and Lammond, A.I.** 1993. Non-snRNP protein splicing factors. *Biochim. Biophys. Acta*. **1173**, p.247.
- Laveran, A.; and Mesnil, F.** 1907. *Trypanosomes and trypanosomiasis*. Ballière, Tindall and Cox. London.
- Laviguer, A.; LaBranche, H.; Kornblihtt A.R.; and Chabot, B.** (1993) A splicing enhancer in the human fibronectin alternative EDI exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev*. **7**, p.2405.
- Layden, R.E.; and Eisen, H.** 1988. Alternative trans-splicing in *Trypanosoma equiperdum*: implication for a splice site selection. *Mol. Cell. Biol*. **8**, p.1352.
- LeBowitz, J.H.; Smith, H.Q.; Rusche, L.; and Beverly, S.M.** 1993. Coupling of poly(A) site selection and *trans-splicing* in *Leishmania*. *Genes Dev*. **7**, p.996.
- Lee, M.G.** 1996. An RNA polymerase II promoter in the hsp70 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol*. **16**, p.1220.

Mair, G.; Shi, H.; Li, H.; Djikeng, A.; Aviles, H.O.; Bishop, J.R.; Falcone, F.H.; Gavrilescu, C.; Montgomery, J.L.; Santori, M.I.; Stern, L.S.; Wang, Z.; Ullu, E.; and Tschudi, C. 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*. **6**, p.163.

Mardon, H.J.; Sebastio, G.; and Baralle, F.E. (1987) A role for exon sequences in alternative splicing of the human fibronectin gene. *Nucleic Acids Res.* **15**, p.7725.

Maslov, D.A.; Elgort, M.G.; Wong, S.; Peckova, H.; Lom, J; Simpson, L.; and Campbell, D.A. 1993. Organization of mini-exon and 5S rRNA genes in the kinetoplastid *Trypanoplasma borreli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, p.127.

Matthews, K.R.; Tschudi, C.; and Ullu, E. 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNAs in trypanosomes. *Genes Dev.* **8**, p.491.

Mayeda, A.; and Krainer, A.R. 1992. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell.* **68**, p.365.

Mayeda, A.; Zahler, A.M.; Krainer, A.R.; and Roth, M.B. 1992bis. Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, p.1301.

McConville, M.J.; and Fergusson, M.A.J. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* **294**, p.305.

Mermoud, J.E.; Cohen, P.T.W.; and Lammond, A.I. 1992. Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **20**, p.5263.

Mermoud, J.E.; Cohen, P.T.W.; and Lammond, A.I. 1994. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* **13**, p.3679.

Misteli, T.; and Spector, D.L. 1996. Serine/threonine phosphatase I modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factor. *Mol. Biol. Cell* **7**, p.1559.

Misteli, T.; Cáceres, J.F.; and Spector, D.L. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor. *Nature* **387**, p.523.

Molineux, D.H. 1997. Current Public Health Status of the Trypanosomiasis and Leishmaniasis. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. Hide, G.; Mottram, G.H.; and Holmes, P.H. p.39.

Morris, D.R.; Kakegawa, T.; Kaspar, R.L.; and White, N.W. 1993. Poly-pyrimidine tracts and their binding proteins: regulatory sites for posttranscriptional modulation of gene expression. *Biochemistry* **32**, p.2931.

Murphy, W.J.; Watkins, K.P.; and Agabian, N. 1986. Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans-splicing. *Cell*. **47**, p.517.

Myler, P.J.; Audleman, L.; deVos, T.; Hixson, G.; Kiser, P.; Lemley, C.; Magness, C.; Rickel, E.; Sisk, E.; Sunkin, S.; Swartzell, S.; Westlake, T.; Bastien, P.; Fu, G.; Ivens, A.; and Stuart, K. 1999. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, p.2902.

Nilsen, T.W. 1994. RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell*. **78**, p.1.

Okamoto, Y.; Onogi, H.; Honda, R.; Yasuda, H.; Wakabayashi, T.; Nimura, Y.; and Hagiwara, M. 1998. cdc2 kinase-mediated phosphorylation of splicing factor SF2/ASF. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **249**, p.872.

OMS, Organización Mundial de la Salud. 1991. Control de la enfermedad de Chagas, Serie de informes técnicos, p.811.

- Opperdoes, F.R.; and Borst, P.** 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *trypanosoma brucei*, the glycosome. *FEBS lett.* **80**, p.360.
- Papoutsopoulou, S.; Nikolakaki, E.; and Giannakourous, T.** 1999. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. *Biochem. Biophys. Res.Com.* **255**, p.602.
- Pays, E.; Coquelet, H.; Pays, A.; Tebabi, P.; and Steinert, M.** 1989. *Trypanosoma brucei*: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site. *Mol. Cell. Biol.* **9**, p.4018.
- Pays, E.; Coquelet, H.; Tebabi, P.; Pays, A.; Jefferies, D.; Steitnert, M.; Koenig, E.; Williams, R.O.; and Roditi, I.** 1990. *Trypanosoma brucei*: constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters. *EMBO J.* **9**, p3145.
- Pays, E.; Hanocq-Quertier, J.; Hanocq, F.; Van Assel, S.; Nolan, D.; and Rolin, S.** 1993. Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into the procyclic forms in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, p.107.
- Pays, E.** 1993bis. Genome organization and control of gene expression in trypanosomatids. In *The eukaryotic genome organization and regulation* (eds. Broda, S.G.; Oliver, S.G.; and Slims, P.F.G.). Cambridge University Press. p.127.
- Pellé, R.; and Murphy, N.B.** 1993. Stage-specific differential polyadenylation of miniexon derived RNA in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, p.277.
- Perriman, R.; and Ares, M. Jr.** 2000. ATP can be dispensable for prespliceosome formation in yeast. *Genes Dev.* **14**, p.97.
- Potashkin, J.; Kim, D.; Fons, M.; Humphrey, T.; and Frendewey, D.** 1998. Cell-division-cycle dependent defects associated with fission yeast pre-mRNA splicing mutants. *Curr. Genet.* **34**, p.153.

- Prasad, J.; Colwill, K.; Pawson, T.; and Manley, J.L.** 1999. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibits splicing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, p.6991.
- Priest, J.W.; and Hajduk, S.L.** 1994. Development regulation of cytochrome C reductase during bloodstream to procyclic differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**, p.291.
- Rajkovic, A.; Davis, R.E.; Simonsen, J.N.; and Rottman, F.M.** 1990. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, p.8879
- Reed, R.; and Maniatis, T.** 1986. A role for exon sequences and splice splice-site proximity in splice-site selection. *Cell.* **46**, p.681.
- Reed, R.; and Palandjian, L.** 1999. Spliceosome assembly. In Krainer, A. *Eukaryotic mRNA Processing*. 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.
- Reichenow, E.** 1940. Zur Frage der Bedeutung des Blepharoplasts der Trypanosomen. *Archivos do Instituto Biológico, Sao Paulo.* **11**, p.433.
- Revelard, P.; Lips, S.; and Pays, E.** 1993. Alternative splicing within and between alleles of the ATPase gene 1 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**, p.93.
- Rio, D.** 1993. Splicing of pre-RNA: mechanism, regulation and role in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, p.574.
- Rossi, F.; Labourier, E.; Forné, T.; Divita, G.; Derancourt, J.; Riou, J. F.; Antoine, E.; Cathala, G.; Brunel, C.; and Tazi, J.** 1996. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**, p.80.
- Roth, M.B.; Murthy, C.; and Gall, G.** 1990. A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle. *J Cell Biol.* **111**, p.2217.

- Roth, M.B.; Zahler, A.M.; and Stolk, J.A.** 1991. A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell. Biol.* **115**, p.587.
- Rudenko, G.; Bishop, D.; Gottesdiener, K.; and Van der Ploeg, L.H.T.** 1989. Alpha-Amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **8**, p.4259.
- Rudenko, G.; Lee, M.G.S.; and Van der Ploeg, L.H.T.** 1991. The PARP and VSG genes of *Trypanosoma brucei* do not resemble RNA polymerase II transcription units in sensitivity to the addition of Sarkosyl in nuclear run-on assays. *Nucleic Acids Res.* **20**, p.303.
- Rudenko, G.; Blundell, P.A.; Taylor, M.C.; Kieft, R.; and Borst, P.** 1994. VSG gene expression site control in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **10**, p3387.
- Saito, R.M.; Elgort, M.G.; and Campbell, D.A.** 1994. A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *EMBO J.* **13**, p.5460.
- Sanford, J. R.; and Bruzik, J.P.** 1999. SR proteins are required for nematode trans-splicing in vitro. *RNA.* **5**, p.918.
- Sanger, F.; and Coulson, A.R.** 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, p.441.
- Santori, M.I.; Laria, S.; Gómez, E.B.; Espinosa, I.; Galanti, N.; and Téllez-Iñón M.T.** 2002. Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **121**, p.225.
- Screaton, G.R.; Cáceres, J.F.; Mayeda, A.; Bell, M.V.; Plebanski, M.; and Jackson, D.G.** 1995. Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *EMBO J.* **14**, p.4336.
- Siebel, C. W.; Feng, L.; Guthrie, C.; and Fu, X.-D.** 1999. Conservation in budding yeast of a kinase specific for splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, p.5440.

Sherman, D.R.; Janz, L.; Hug, M.; and Clayton, C. 1991. Anatomy of the PARP promoter of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **10**, p.3379.

Sommer, J.M.; Bradley, P.J.; Wang, C.C.; and Johnson, P.J. 1996. Biogenesis of specialized organelles: glycosomes and hydrogenosomes. In *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Smith, D.F.; and Parsons, M. Oxford University Press, NY, USA.

Steitz, J.A. 1992. Splicing takes a holiday. *Science.* **257**, p.888.

Storino, R.; and Milei, J. 1994. *Enfermedad de Chagas*, Ed. Mosby.

Sureau, A.; Soret, J.; Vellard, M.; Crochet, J.; and Perbal, B. 1992. The PR264/c-myc connection: expression of a splicing factor modulated by a nuclear protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, p.11683.

Swindle, J.; and Tait, A. 1996. Trypanosomatid genetics. In *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Oxford University Press. NY. USA.

Sutton, R.E.; and Boothroyd, J.C. 1986. Evidence for trans-splicing in trypanosomes. *Cell.* **47**, p.527.

Tacke, R.; Boned, A.; and Goriadis, C. 1992. ASF alternative transcripts are highly conserved between mouse and man. *Nucleic Acids Res.* **20**, p.5482.

Takeuchi, M.; and Yanagida, M. 1993. A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase *dsk1* with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol. Biol. Cell* **4**, p.247.

Tang, Z.; Yanagida, M.; and Lin, R.-J. 1998. Fission yeast mitotic regulator is an SR protein-specific kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, p.5963.

Tang, Z.; Kuo, T.; Shen, J.; and Lin, R.-J. 2000. Biochemical and genetic conservation of fission yeast *Dsk1* and human SR protein-specific kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, p.816.

Teixeira, S.M.; Kirchhoff, L.V.; and Donelson, J.E. 1995. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **270**, p.22586.

Tessier, L.H.; Keller, M.; Chan, R.L.; Fournier, R.; Weil, J.-H.; and Imbault, P. 1991. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by *trans*-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* **10**, p.2621.

Tian, M.; and Maniatis, T. 1994. A splicing enhancer exhibits both constitutive and regulated activities. *Genes Dev.* **8**, p.1703.

Torri, A.F.; Bertrand, K.L.; and Hajduk, S.L. 1993. Protein stability regulates the expression of cytochrome C during the developmental cycle of *trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**, p.316.

Turco, S.J.; and Descoteaux, A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, p.65.

Tschudi, C.; and Ullu, E. 1990. Destruction of U2, U4 or U6 small nuclear RNA blocks *trans* splicing in trypanosome cells. *Cell.* **61**, p.459.

Ullu, E.; Matthews, K.R.; and Tschudi, C. 1992. Temporal order of RNA processing reactions in trypanosomes: rapid *trans-splicing* precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cell. Biol.* **13**, p.720.

Vanhamme, L.; Pays, A.; Tebabi, P.; Alexandre, S.; and Pays, E. 1995. Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, p.5598.

Vellard, M.; Sureau, A.; Soret, J.; Martinerie, C.; and Perbal, B. 1992. A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the *trans*-spliced c-myb exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, p.2511.

Vibe-Pedersen, K.; Kornblihtt, A.R.; and Baralle, F.E. 1984. Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing. *EMBO J.* **3**, p.2511.

Vickerman, K. Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature.* **208**, p.762.

Wahle, E.; and Keller, W. 1999. Capping, Methylation and 3'-end formation of pre-RNA. In Krainer, A. *Eukaryotic mRNA Processing.* 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.

Wang, H.Y.; Lin, W.; Dyck, J.A.; Yeakley, J.M.; Songyang, Z.; Cantley, L.C.; and Fu, X.-D. 1998. SRPK2 a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J.Cell Biol.* **4**, p.737.

Wenyon, C.M. 1926. *Protozoology.* Vol I. London.

Werbitzki, F.W. 1910. Ueber blepharoplastlose Trypanosomen. *Zentrblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene.* **1**, p.303.

Will, C.L.; and Lührmann, R. 1999. snRNP structure and function. In Krainer, A. *Eukaryotic mRNA Processing.* 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.

Woppmann, A.; Will, C.L.; Kornstadt, U.; Zuo, P.; Manley, J.L.; and Lührmann, R. 1993. Identification of an snRNP-associated kinase activity that phosphorylates arginine/serine rich domains typical of splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**, p.2815.

Wu, J.Y.; and Maniatis, T. 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell.* **75**, p.1061.

Xiao, S.-H.; and Manley, J.L. 1998. Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **21**, p.6359.

Yang, X.; Bani, M.R.; Lu, S.-J.; Rowan, S.; Ben-David, Y.; and Chabot, B. 1994. The A1 and A1^B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoparticles modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, p.6924.

Zahler, A.R.; Lane, W.S.; Stolk, J.A.; and Roth, M.B. 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* **6**, p.837.

Zahler, A.M. 1999. Purification of SR protein splicing factors. *Methods Mol Biol.* **118**, p.419.

Zhu, J.; and Krainer A.R. 2000. Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes Dev.* **14**, p.3166.

Zuc, P.; and Manley, J.L. 1993. Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **12**, p.4727.



Dr. Héctor N. Torres
Director



Lic. Daniel Portal
Tesisista

"So little done, so much to do"
Cecil Rhodes (1853-1902)