



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

*CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
EN TRIPANOSOMÁTIDOS:
LA RED DE PROTEÍNAS SR.*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Lic. Guillermo Sebastián Lobo

Director de tesis: Dra. Mirtha M. Flawiá

INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2007

Agradecimientos

Una tesis no podría llevarse a cabo sin el aporte de muchísima gente. Personas que tal vez ni siquiera se dan cuenta que están aportando al trabajo en si, tanto como a mi formación profesional y personal. Jamás podría haber pasado todos estos años sin la buena voluntad, consejos, retos, apoyo material y apoyo sentimental de todos ellos. Es muy difícil recordar todas las cosas y personas.

Muchísimas Gracias,

A mis viejos y mi hermana, por todo el apoyo incondicional, la confianza ciega y libertad con la que me educaron. Gracias a ellos hoy puedo estar escribiendo esta página. A mi abuela Elvira, por su fuerza, empuje, coraje y las incontables velas prendidas.

Al "Doc", Héctor N. Torres, por permitirme trabajar en el instituto y en el laboratorio desde abril del 2000, brindándome todo el apoyo necesario.

A Mirtha M. Flawiá, por permitirme trabajar con una libertad inimaginable.

A Claudio, por los miles de consejos, críticas, charlas picada de por medio, correcciones y proyectos.

A Dani, por enseñarme a trabajar en una mesada, por la confianza depositada en mí en los primeros años y enseñarme a redoblar el esfuerzo cuando las cosas pintan negras.

A Isa, por ser la que siempre estaba y está, corregirme el "ingliy", por "empujarme" a ir a USA, por los viajes, las cenas gourmet y los vinos, las sincronizaciones fallidas, Madrid, París y los gritos de colores, etc, etc, etc.

A Fede y Naty Berco, je, je, je... por ser dos grandes amigos y por toda las veces que me terminaron un western, sacaron una PCR, sacaron cultivos e inducciones, repicaron bacterias, levaduras y parásitos, prestaron mil cosas y no sigo, sino parece que hubieran hecho todo ellos.

A Cata, por crecer juntos adentro del 209, en épocas buenas, no tanto y difíciles, y por tener a mano siempre un consejo sabio, de los que brindan tranquilidad espiritual.

A León, por todos las soluciones y ayudas bioinformáticas que siempre aporta.

A Sole, por los primeros años compartidos y ser la culpable de llevarme al 209. (Que conste es culpa de ella que yo haya estado acá)

A Briar, por agitarme todos los días, tolerar mis retos y acompañar en el día a día.

Al 209 de ayer (Santi, Maxi, Hernán, Rodrigo), de hoy (Silvia, Pato, Ale, Salomé, Cristian) y de siempre (Cris y Guille), por todo: la ayuda, las críticas, las discusiones y risas.

A María Teresa, por tratarme como un par desde el primer día en el instituto, acompañarme en mis negociaciones con los proveedores y proyectos institucionales.

Al 211, en un agradecimiento casi clásico a través de los años, por todas las cosas que prestaron y aquellas que aún no saben que han prestado.

A los "papas", por asilarme en todos mis ratos de aburrimiento y prenderse en cuanto fiesta había.

A Maru Peper, por los mil y un favores, las charlas vocacionales y los incontables repiques celulares.

A los congresos, por las jornadas diurnas interminables y las nocturnas imperdibles.

A Eze y Luli por todo el apoyo en EEUU, los consejos y las traducciones!!!

Al rugby, por ser el escape y mi mejor terapia, permitiéndome llegar medianamente cuerdo al día de hoy

A Álvarez y Borges, por 3 años maravillosos detrás de una barra, y a los otros 10 años del otro lado de la barra!

A Jorge M y Fernando B. por los riquísimas discusiones científicas y las soluciones prácticas.

A Javier M, por la tranquilidad y experiencia que transmite en cada una de nuestras charlas.

A la viejos integrantes ingebianos, Mari Gallo, Paola, Sonia, Sergio, Vero, Vani, Juan, Guchi, Danielita, Vero, Pablo, Vivi, Agus, Julián, Diego, Tomás, Nico Voza, Manu, Diego W y Mer Rivero.

A la nuevos integrantes ingebianos, Tami, Tomi, Naty Módena, Flor Caro, María, Naty Feraso, Pau, Mauro, Euge, Silvia, Gaby, Cata A.

A Irma, Alicia, Cintia, Mariano, Marta, Mary y "Mala", por los trámites, favores, cartas, firmas, fotocopias, sobres, envíos, etc, etc, etc

A Mary, Francisco, Leonor, Gladis, José, Mario y los otros chicos de seguridad, por todo el apoyo en el día a día, los mates y las facturas en la cocina, etc, etc, etc.

A muchos otros por mostrarme lo que no quiero ser algún día, de esos también se aprende!

Finalmente a los amigos que todavía no nombré, Leandro, Luis, Juanjo, Javo, Gaby, Dami, Martín, Cynthia, Marlene, Meli, "el grupo fruta", Nacho Nojek, Ceci Colona, Ceci Tomé, Mariana Laura, Mora, María, Ceci, Naty, Nico, Mariana, Ceci L, Silvana, Kathya.

... y a todos los que me estoy olvidando en este momento, que seguramente cuando lean y no se encuentren me lo van a recordar!!!

A Papá, Mamá y Anita
A mis abuelos, José, Gregorio, Porota y Elvira

Índice

OBJETIVOS	3
INTRODUCCION	
1.- Introducción	4
1.1.- Ubicación taxonómica de los Tripanosomátidos.	4
1.2.- Importancia sanitaria de los Tripanosomátidos.	5
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma brucei</i>	
2.1.- El ciclo de vida	7
2.2.- Las Enfermedades: Mal de Chagas y Enfermedad del Sueño.	10
2.2.1.- Epidemiología e Infección.	10
2.2.2.- Definición de la enfermedad.	10
2.2.3.- Patología de las tripanosomiasis.	13
2.2.4.- Estrategias de control de la enfermedad.	16
3.- Aspectos Generales de la biología de los Tripanosomátidos.	
3.1.- El kinetoplasto; una organela característica.	18
3.2.- Los glicosomas.	19
3.3.- Evasión del sistema inmune.	20
3.4.- Glicosil-fosfatidilinositoles.	21
3.5.- Expresión génica en Tripanosomátidos.	22
3.6.- Organización genómica.	23
3.7.- La transcripción: Transcripción policistrónica, polimerasas, promotores.	24
3.8.- Regulación transcripcional.	29
3.9.- Regulación post-transcripcional.	31
3.10.- El "capping" por trans-splicing y la poliadenilación.	32
3.11.- Edición de RNA.	37
3.12.- Regulación traduccional.	38
3.13.- Estabilidad de proteínas.	39
4.- Splicing.	39
4.1.- Factores de splicing: proteínas ricas en dipéptidos serina arginina (Proteínas SR).	41
4.1.1.- Rol de las proteínas SR en el splicing constitutivo y alternativo.	42
4.1.2.- Actividades post-splicing de las proteínas SR.	44
4.1.3.- Regulación de la expresión de proteínas SR.	46
4.1.4.- Fosforilación de proteínas SR.	46
RESULTADOS PARTE I	
1. Introducción.	49
2. Arquitectura genómica: Conservación sinténica entre TSR1 y TcSR.	50
3. Estudios de la actividad de TSR1 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.	55
3.1.- Sobre-expresión de TSR1 en la cepa salvaje 1913, de <i>S. pombe</i> .	55
3.2.- Sobre-expresión de TcSR en las cepas 2A5 y B8, de <i>S. pombe</i> .	58
3.3.- Sobre-expresión de TSR1 en la cepa mutante doble 2D4, de <i>S. pombe</i> .	59
4.- Estudio de interacción de TcSR con factores auxiliares de la maquinaria de splicing (TcU2AF).	60
5.- Caracterización en Sistemas Homólogos: <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>.	62
5.1.- Sobre-expresión y silenciamiento de TcSR en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	63
5.2.- Depleción, silenciamiento y <i>tagging</i> de TSR1 en <i>Trypanosoma brucei</i>	65

5.2.1.- Modificaciones génicas en el locus de TSR1 en formas procíclicas de <i>T. brucei</i>	65
5.2.2.- Silenciamiento de TSR1 por RNA interferencia	71
5.2.2.1.- Estudio de los efectos originados en la viabilidad por el silenciamiento de TSR1 parásitos procíclicos de <i>Trypanosoma brucei</i>	72
5.2.2.2.- Estudio de la TSR1 en el procesamiento del pre-ARNm por trans splicing	73
5.2.2.3.- El silenciamiento de TSR1 afecta el cis-splicing del transcripto de la Poli-A Polimerasa	76
5.2.3.- Análisis de células TSR1 RNAi silenciadas: su relación con el ciclo celular	77
5.2.4.1.- Fenotipos morfológicos inducidos por la falta de TSR1 en <i>T. brucei</i>	78
5.2.4.2. – Análisis del fenotipo relacionado Paraflagellar Rod	81
5.2.4.3.- Distintas alteraciones originadas por la ausencia de TSR1.	83

RESULTADOS PARTE II

1.- Introducción	87
2. Arquitectura genómica: Conservación sinténica entre las SRPKs de tripanosomátidos.	88
3. Estudio de la conservación de la actividad constitutiva de las SRPKs de tripanosomátidos.	91
3.1.- Análisis de la estructura general proyectada de las SRPKs de tripanosomátidos.	91
3.2.- Diseño de proteínas mutantes de TcSRPK.	95
4.- Estudio de las TcSRPKs mutantes en ensayos de actividad quinasa <i>in vitro</i>.	96
5.- Estudio de la actividad de TcSRPKΔ652 y TcSRPKΔ588 <i>in vivo</i> en la levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.	97
5.1.- Sobre-expresión de TcSRPKmutantes en la cepa salvaje 1913, de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	98
5.2.- Sobre-expresión de TcSRPK mutantes en las cepas mutantes B8 y 2D4, de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	99
6. Estudio de la actividad de SRPKs de tripanosomátidos en Sistemas Homólogos.	101
6.1.- Sobre-expresión y silenciamiento de TcSRPK en epimastigotes de la cepa CL Brenner de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	101
6.2.- líneas celulares de parásitos procíclicos de <i>T. brucei</i> :	103
6.2.1.- Silenciamiento TbSRPK inducido por RNA interferencia en parásitos procíclicos de <i>T. brucei</i>	104
6.2.2.- Modificaciones Génicas de TbSRPK en parásitos procíclicos de la cepa Ytat de <i>T. brucei</i> .	105
7.- Caracterización de TcSRPK en un sistema homólogo de <i>T. brucei</i>	108

DISCUSIÓN

Las proteínas SR	110
Las proteínas quinasas de proteínas SR (SRPKs)	117

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Medios y soluciones.	122
2.- Técnicas Electroforéticas.	123
3. Parásitos: cultivo y preparación de extractos.	123

4.- Manipulación de ácidos nucleicos.	124
5.- Preparación de bacterias competentes, expresión heteróloga de genes y amplificación y purificación de plásmidos.	125
6. Anticuerpos: obtención y usos.	128
7. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.	129
8. Secuencias de genes utilizadas	131
9.- Ensayos <i>in vivo</i> con levaduras de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	131
10.- Desarrollo de líneas transgénicas en <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>	133
11.- Análisis del ARN por "primer extensión" y RT-PCR	136
12.- Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	136
13.- Fijación de parásitos e inmunofluorescencia (IFI).	137

Control de la Expresión Génica en Tripanosomátidos: La red de proteínas SR

Este trabajo presenta por primera vez la existencia de una Red de proteínas SR funcionalmente conservada en un parásito protozoario como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Esta "Red" tiene una estructura básica compuesta por una proteína rica en dipéptidos serina arginina (SR) y una proteína quinasa específica de proteínas SR (SRPK). La proteína SR, codificada por un gen esencial, cumple funciones vitales en las reacciones de trans-splicing y cis-splicing. Experimentos que afectan el nivel de la proteína SR de tripanosomátidos, evidencian alteraciones en el ciclo celular y la morfología, posiblemente originadas en un desarreglo a nivel del citoesqueleto. Las SRPKs mostraron intervenir en los mismos procesos. Aún sin ser esenciales en tripanosomátidos, niveles alterados de estas proteínas afectan tanto el procesamiento del pre-ARN, como el ciclo celular.

El alto grado de conservación a nivel estructural, bioquímico, y funcional observado, sugieren que la Red de proteínas SR posee funciones conservadas en el parásito, representando un aporte significativo para el entendimiento de la reacción de SL trans-splicing y por consiguiente al control de la expresión génica

Palabras claves: Trypanosoma, splicing, ARNm, procesamiento del ARN, TSR1, TcSR, SRPK

Control of Gene Expression in Trypanosomatids: The SR Network

This thesis work presents for the first time, the existence of a functionally conserved SR Network in protozoan parasites like *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. This network presents a basic structure composed by one Serine/Arginine-rich protein (SR) and one SR-protein kinase (SRPK). The SR protein, is codified by an essential gene and plays vital roles in both trans- and cis-splicing reactions. Disruption of the trypanosomatids SR protein level results in alterations of the cell cycle as well as cell morphology, likely originated by a major cytoskeleton disturbance. Although not essential in trypanosomatids, the SRPKs were shown to be involved in the same processes, adding new evidence for the crosstalk between the networks involved in controlling the cell cycle and pre-mRNA processing.

The high degree of conservation at structural, biochemical and functional levels, suggests that the SR Network possesses conserved functions in the parasite, being a major contribution to the understanding of SL trans-splicing, and consequently a better insight to the control of gene expression.

KEYWORDS: Trypanosoma, splicing, TSR1, TcSR, SRPK, pre-mRNA processing.

OBJETIVOS

Objetivos generales de esta Tesis.

El presente trabajo de Tesis, intentará presentar por primera vez la caracterización en tripanosomátidos, de una red de proteínas SR, conocida como "SR-network", con funciones en el procesamiento del pre-ARN.

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 funcionalmente en tripanosomátidos a TSR1 y TcSR como miembros de la red de proteínas SR.

Objetivos particulares de la Parte I:

1. Analizar la actividad de TSR1, como una proteína SR genuina, caracterizando los dominios funcionales importantes en reacciones de splicing.
 - 1.1. En levaduras de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Estudiar la interacción de TcSR con factores de splicing de tripanosomátidos.
3. Caracterización funcional de TSR1 y TcSR en sistemas homólogos.
 - 3.1. Estudiar la participación en el trans-splicing de pre-ARN.
 - 3.2. Estudiar la participación en el cis-splicing de pre-ARN.
 - 3.3. Estudiar la participación en otros procesos relacionados a la red de proteínas SR.

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*. Desarrollar un sistema de estudio para componentes de la red de proteínas SR.

Objetivos particulares de la Parte II:

1. Estudiar el mecanismo de activación constitutiva de TcSRPK.
 - 1.1. Desarrollo y caracterización *in vitro* de mutantes de TcSRPK.
 - 1.2. Estudio funcional de las proteínas mutantes en *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Manipular los genes de ambas SRPKs en los parásitos y analizar los procesos en los que intervienen.
3. Desarrollar un modelo de estudio para componentes de la red de proteínas SR, en un sistema homólogo, como *Trypanosoma brucei*.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1.- Ubicación taxonómica de los Tripanosomátidos.

Los parásitos protozoarios infectan millones de personas cada año y en conjunto son una de las causas sanitarias más importantes del deterioro de la calidad de vida en el tercer mundo. El orden Kinetoplastida incluye al género *Trypanosoma*, que agrupa algunas de las especies causantes de las enfermedades más desatendidas. Varias especies de tripanosomas infectan a la mayor parte de los vertebrados, mientras que otras especies causan importantes enfermedades veterinarias, pero sólo dos afectan significativamente la salud en humanos. En África Sub-Sahariana, *Trypanosoma brucei* causa la enfermedad del sueño o Tripanosomiasis Humana Africana, y en América, *Trypanosoma cruzi* causa el “Mal de Chagas”. Ambas enfermedades han sido considerablemente desatendidas, afectando desproporcionadamente a los sectores pobres y marginados de la población. A pesar de este abandono, la biología básica de los tripanosomas ha sido objeto de intenso estudio. Los Kinetoplástidos incluyen las especies del género *Leishmania* que causan un gran número de enfermedades tropicales y sub-tropicales. Estos organismos presentan un gran número de características bioquímicas y moleculares únicas e interesantes.

Los tripanosomátidos son parásitos protozoarios pertenecientes al subtipo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplástida. Los kinetoplástidos son organismos flagelados que se caracterizan por poseer una única mitocondria, llamada kinetoplasto (ver más adelante), situada cerca de la base del flagelo, que contiene gran cantidad de ADN. La mayoría de los kinetoplástidos flagelados son parásitos de vertebrados, invertebrados o plantas. En la Figura i1 se detalla la ubicación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* y *Crithidia fasciculata* (Hoare, 1972).

En el género *Trypanosoma* están comprendidos parásitos digenéticos que tienen en uno de sus estadios de desarrollo la forma tripomastigote. Este género se divide en dos secciones: Salivaria y Stercoraria (Hoare, 1972). En la primera están comprendidos tripanosomas patógenos que se multiplican en el estadio tripomastigote 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 tripanosomas que se multiplican en los vertebrados a través de etapas intracelulares, como es el caso de *T. cruzi*.

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

Figura i1. Clasificación taxonómica de los Tripanosomátidos más estudiados.

1.2.- Importancia sanitaria de los Tripanosomátidos.

En esta sección describiremos características de estas enfermedades fundamentales referentes a la salud pública. Debido a la gran dinámica de los datos de las áreas endémicas, se estableció una estrategia y criterio de selección para construir un perfil de la importancia sanitaria de estas patologías. La estrategia se centró en la búsqueda de aquellas revisiones bibliográficas que abarcaban gran parte de los trabajos publicados y conducen a la construcción de una idea general del estado de estas enfermedades. Por otro lado la mayoría de la información estadística y actualizada, se puede encontrar en los portales de la Organización Mundial de la Salud para la enfermedad del sueño (www.who.int/health-topics/trypanosomiasis_african/en/), para el Mal de Chagas (www.who.int/ctd/chagas.html) y del WHO/TDR (www.who.int/tdr). La información aquí presentada se basa entonces en los en los datos obtenidos de los portales anteriormente mencionados durante el mes de Diciembre de 2006 y además de los siguientes trabajos:

"The trypanosomiasis" Barret et al. *Lancet* 2003, 362: 1469-80.

"Weekly epidemiological record" WHO. *Wkly Epidemiol Rec*, No. 8, 2006, 81, 69–80.

"Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease, Buenos Aires, Argentina 17-20 April 2005.

"Possible cases of sexual & congenital transmission of sleeping sickness" Rocha et al. *Lancet*, 363, 247.

Lamentablemente, no hace falta destacar la importancia sanitaria de los tripanosomas. Con solo ver la 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, 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

ENFERMEDADES CAUSADAS POR <i>TRYPANOSOMAS</i>			
	Tripanosomiasis humanas africanas	Tripanosomiasis Americana	<i>Leishmaniasis</i>
Agente etiológico	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania spp.</i>
Vector (género)	Mosca tse-tse: <i>Glossina</i> .	Triatómicos: <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.
Área 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	60 millones en riesgo. 36 países. 0,5 millones de infectados (2004).	120 millones en riesgo. 19 países. 11-18 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. Maelarsoprol y eflornitina en casos de la 2 ^{da} etapa. Todos los tratamientos requieren internación. Efectos colaterales para todas las drogas, excepto eflornitina.	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 i1: Enfermedades causadas por tripanosomátidos.

humanos y animales en todo el mundo. Entre las enfermedades más importantes, se encuentran las tripanosomiasis africanas, como la enfermedad del sueño, producidas por el *Trypanosoma brucei*, y transmitida por la mosca tse-tse (*Glossina spp*), 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 (*Lutzomyia spp*).

A partir de los datos presentados en esta tabla se concluye que existen más de 130 millones de personas infectadas por tripanosomátidos 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.

2. *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*

En esta sección se introducirán algunos conceptos básicos sobre estas especies, sobre las cuales he trabajado para la realización de esta tesis, principalmente sobre el ciclo de vida de estos parásitos y las enfermedades que producen. Luego, se desarrollaran algunos aspectos de la biología de los tripanosomátidos en general, muchos de ellos no necesariamente conocidos y en algunos casos ni siquiera descritos en todas las especies comprendidas, pero que aportan al entendimiento básico del grupo.

2.1.- El ciclo de vida

Hay muchas similitudes en el ciclo de vida de estos dos tripanosomas y las enfermedades que causan (Tabla i1). Ambos son flagelados unicelulares transmitidos por insectos hematófagos. Comparten también fases de replicación en la zona de infección del hospedador mamífero, seguida por la diseminación y localización en los órganos blanco. Sin embargo existen también diferencias claves entre estos

organismos. Una de ellas es la existencia de una fase intracelular para *T. cruzi*, mientras que todo el ciclo de *T. brucei* es exclusivamente extracelular.

El ciclo de vida *T. cruzi* (figura i2) involucra su desarrollo dentro de un hospedador mamífero y un insecto vector intermediario. El insecto vector, en este caso, es un triatomínio 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 (E), replicativa y no infectiva, y

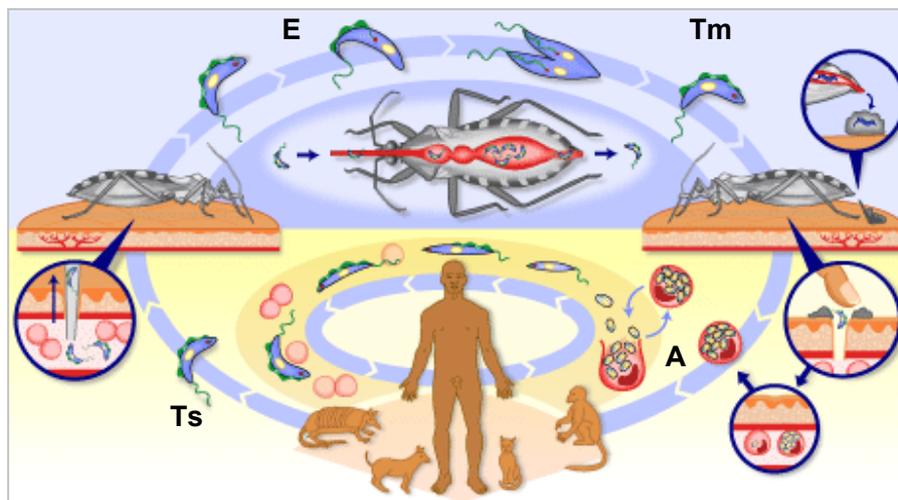


Figura i2: Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

el tripomastigote metacíclico (Tm) que es la forma infectiva pero no replicativa. El amastigote (A), que tiene capacidad replicativa, y el tripomastigote sanguíneo (Ts), que no la tiene, son formas presentes en el 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 tripomastigote 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 incorporada. Las heces que contienen los parásitos que se han diferenciado a la forma infectiva (tripomastigotes 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 tripomastigotes metacíclicos al torrente sanguíneo del nuevo huésped. Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos y se diferencian rápidamente a la forma amastigote. Los macrófagos juegan un importante rol en la reacción temprana a la infección y en la diseminación de

los amastigotes a otros sitios del cuerpo. Luego de varios ciclos de división determinados genéticamente, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo por ruptura de la célula huésped. Estos pueden infectar nuevas células o ser ingeridos por el insecto vector cuando éste se alimenta de la sangre del mamífero infectado. Dentro del insecto, los tripomastigotes sanguíneos provenientes del mamífero se diferencian a epimastigotes al llegar al intestino medio del insecto vector, completándose así el ciclo.

En el caso de *Trypanosoma brucei*, la mosca tse tse inocular en el hospedador mamífero tripomastigotes metacíclicos cuando pica y se alimenta de este (figura i3). Estos rápidamente se diferencian a tripomastigotes de la forma sanguínea alargada (Tsl: "slender"), los cuales comienzan a replicarse en los tejidos subcutáneos. Entre 6 y 10 días posteriores a la infección, los parásitos comienzan a diseminarse y replicarse

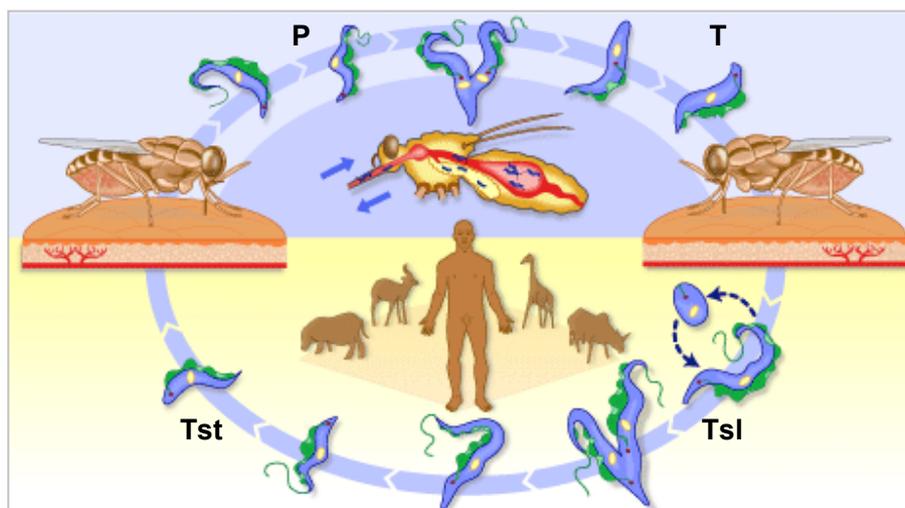


Figura i3: Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*

por todo el cuerpo a través del sistema circulatorio, alcanzando también la linfa y pudiendo alcanzar el sistema nervioso central al traspasar la barrera hematoencefálica. En el pico de parasitemia, algunos tripomastigotes alargados se diferencian a tripomastigotes de la forma sanguínea redondeada (Tst: "stumpy"), la cual no es replicativa pero está adaptada para sobrevivir en la mosca tse tse. Poco después del ingreso de los tripomastigotes redondeados, estos se diferencian a tripomastigotes procíclicos (P), la forma replicativa no infectiva. Los cuales se replican, alcanzan el tracto inicial del intestino medio y se diferencian a la forma mesocíclica (mas alargada).

Estos parásitos migran ahora hacia las glándulas salivales de la mosca donde rápidamente se transforman en epimastigotes, adheridos por el flagelo a la pared de las glándulas. Los epimastigotes continúan replicándose y eventualmente se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que serán transmitidos por la mosca al hospedador mamífero, completándose así el ciclo.

En <http://www.who.int/tdr/media/multimedia/lifecycle.htm> se pueden encontrar versiones animadas de los ciclos de vida de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania spp.*

2.2.- Las Enfermedades: Mal de Chagas y Enfermedad del Sueño.

La enfermedad del sueño y el mal de Chagas son enfermedades crónicas que presentan distintas etapas a lo largo de su curso natural. Ambas son potencialmente letales, no se adquiere inmunidad estéril posterior a la infección y no hay vacunas desarrolladas. La forma de evasión del sistema inmune también presenta características similares en ambos parásitos, los cuales poseen una densa cubierta de glicoproteínas, que les proveen una vía de escape de la respuesta inmune por la gran variabilidad antigénica que presentan.

2.2.1.- Epidemiología e Infección

Ambos parásitos son transmitidos por insectos hematófagos, pero como mencionamos anteriormente, una diferencia fundamental existente entre las formas de contagio ha sido incorporada a la clasificación de estos organismos. *T. cruzi* pertenece a la sección *stercoraria*, debido a su presencia en las heces del vector, en cambio *T. brucei* pertenece a *salivaria* porque es transmitido en la saliva de la mosca tse tse. Otras posibles vías de transmisión de la enfermedad son por transfusión sanguínea o transplantes, la vía congénita (trans-placentaria) y por accidentes de laboratorio con objetos contaminados, como ser el caso de agujas. Muy pocos casos de contagio han sido reportados por otras vías. Para *T. cruzi* existen reportes de contagio por alimentos contaminados y por amamantamiento (Prata, 2001). En el caso de *T. brucei* existen también reportes de contagio por transmisión sexual. (Rocha, 2006)

2.2.2.- Definición de la enfermedad

La **Tripanosomiasis Humana Africana**, también conocida como enfermedad del sueño, es una enfermedad parasitológica terminal dependiente del insecto vector. Los parásitos involucrados son protozoos pertenecientes al genero *Trypanosoma*,

transmitidos a los humanos por picaduras de la mosca tse tse (*Glossina* spp.) las cuales se infectan al alimentarse de humanos o animales que hospedan los parásitos patógenos.

Las moscas tse tse se encuentran en África sub-sahariana (entre los paralelos 14° Norte y 29° Sur – Figura i4). Solo ciertas especies transmiten la enfermedad. Diferentes especies tienen diferentes habitats, principalmente se encuentran en la vegetación costera de ríos y lagos (*G. palpais*), en selva en galería (*G. fusca*) y en la sabana (*G. morsitans*).

- La enfermedad del sueño se encuentra sólo en África sub-sahariana en regiones donde hay moscas tse tse que pueden transmitir la enfermedad. Por razones inexplicables hasta ahora, hay muchas zonas donde se encuentran las moscas pero no la enfermedad.
- Las poblaciones rurales que habitan en regiones donde ocurre la transmisión y las cuales dependen de la agricultura, pesca, cría o caza de animales son las mas expuestas a la picadura de la mosca y en consecuencia a la enfermedad.
- La enfermedad del sueño generalmente esta presente en áreas rurales remotas donde los sistemas de salud son precarios o inexistentes. La enfermedad se disemina en pequeños asentamientos. Los desplazamientos de poblaciones, guerras y pobreza son factores muy importantes que conducen a un aumento en la transmisión.
- La enfermedad progresa en áreas cuyo tamaño puede ir de una aldea a una región entera. Dentro de un área, la intensidad de la enfermedad puede variar de una aldea a la siguiente.

La tripanosomiasis humana Africana tiene dos formas dependiendo el parásito involucrado:

- El *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*) es encontrado en África Central y Occidental. Esta forma representa más del 90% de los casos reportados de enfermedad del sueño y causa una infección crónica. Una persona puede ser infectada por meses o incluso años sin mayores signos o síntomas de la enfermedad. Cuando los síntomas aparecen el paciente frecuentemente ya se encuentra en una etapa avanzada de la enfermedad, cuando el sistema nervioso central esta afectado.

- El *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r.*) se encuentra en África del sur y Oriental. Esta forma representa menos del 10% de los casos reportados y causa infección aguda. Los primeros signos y síntomas se aprecian después de unos pocos meses o semanas. La enfermedad progresa rápidamente e invade el sistema nervioso central.

Tripanosomiasis animales:

Otras especies y sub-especies del género *Trypanosoma*, son patogénicas a los animales y causan tripanosomiasis animales en muchas especies animales salvajes y domésticas. (En el ganado la enfermedad es conocida como *Nagana*, una palabra Zulú que significa “estar deprimido o alicaído”). Los animales pueden ser hospedadores del patógeno humano, especialmente *T.b. rhodesiense*; es por ello que los animales domésticos y salvajes son importantes reservorios de parásitos. Los animales pueden ser infectados también por *T.b. gambiense*, sin embargo el rol epidemiológico de estos reservorios no es claro. Esta enfermedad mata a los animales. En animales domésticos, particularmente en ganado, esta enfermedad es un obstáculo importante en el desarrollo económico de las áreas rurales afectadas.

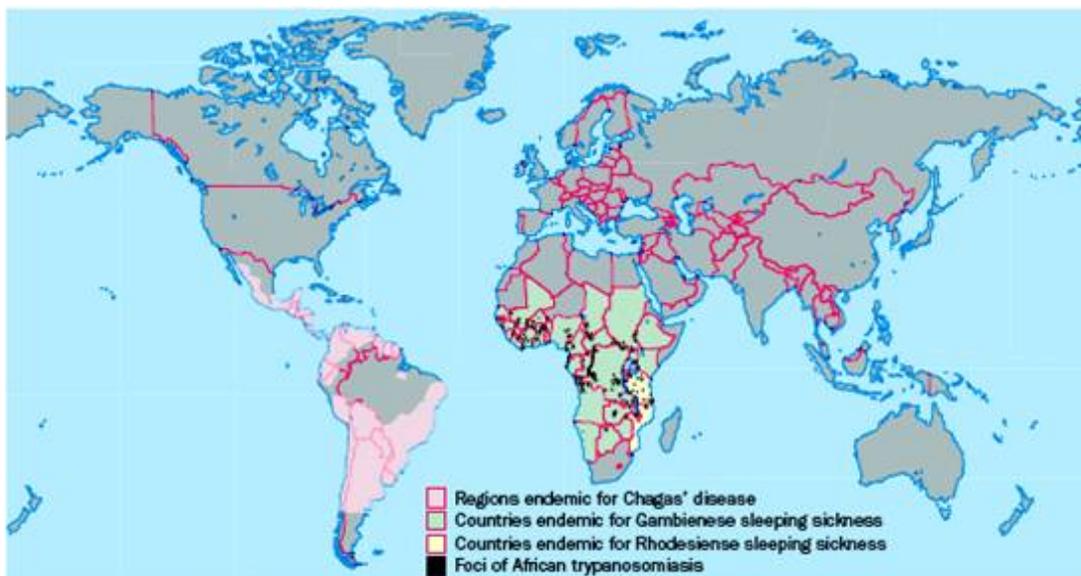


Figura i4: Distribución geográfica de las tripanosomiasis. Tomado de Barret et al. 2003

El **Mal de Chagas** es una parasitosis cuyo agente etiológico es el protozooario *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*. La infección con *T. cruzi* está esencialmente limitada al continente americano (figura i4). 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.

Sólo uno, de los dos linajes de *T. cruzi* distinguibles molecularmente, es causante del Mal de Chagas. El Tipo 1 está ampliamente distribuido en hospedadores mamíferos salvajes, mientras que el Tipo 2 está restringido a un grupo de hospedadores mamíferos en un hábitat peridoméstico. Los parásitos del Tipo 2 son los responsables del Mal de Chagas.

2.2.3.- Patología de las tripanosomiasis.

Tripanosomiasis Humana Africana.

ETAPA 1. La enfermedad es transmitida mediante la picadura de una mosca tse tse infectada. Al principio los tripanosomas se multiplican en los tejidos subcutáneos, sangre y linfa. En el 50% de los casos de *T.b.rhodesinse*, pero rara vez de *T.b.gambiense*, aparece una ulceración típica en el punto de entrada que sana entre 20 y 30 días más tarde, denominada Chancro Tripanosomiásico (figura i5). Los parásitos ahora se dispersan por la sangre y linfa, alcanzando todo el cuerpo y dando comienzo a la primera etapa de la enfermedad, conocida como **fase hemolinfática**. Esta etapa se

caracteriza por ataques de fiebre, jaquecas, dolores de articulaciones y picazón. En infecciones de *T. b. rhodesiense*, que presenta un desarrollo más agudo, pancreatitis conjuntamente con fallas cardíacas, coronarias y edema pulmonar causan víctimas fatales en este estadio temprano, mientras que la infección con *T. b. gambiense* no es evidente en su desarrollo, generalmente es mal diagnosticada o no reconocida. Un signo típico semanas después de la infección de *T.b. gambiense* es una linfadenopatía generalizada, comúnmente en el triángulo posterior de la nuca. Esta característica se conoce como Triángulo de Winterbottom (figura i5).

ETAPA 2. La segunda fase, conocida como **fase neurológica**, comienza cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central entre los demás los órganos. Este evento se produce dentro de unas pocas semanas en los casos de *T.b.rhodesiense* y puede llegar a tomar entre varios meses y más de un año con *T. b. gambiense*. Esta invasión esta acompañada por una inmunosupresión del hospedador. En esta etapa la enfermedad progresa, los signos característicos y síntomas se manifiestan: jaquecas severas, confusión, alteraciones de los sentidos y coordinación pobre y alteración del ciclo de sueño, principalmente por alteración del ritmo circadiano del sueño, lo que le da el nombre a la enfermedad. Toda la evolución de trastornos de comportamiento y personalidad son a causa del deterioro



Figura i5: Signos característicos de las trypanosomiasis: De izquierda a derecha se muestran: Chancro tripanosomiático, Signo de Romaña, y Triángulo de Winterbottom

del SNC. Se ha observado leucoencefalitis, demielinización entre otros signos. Sin tratamiento, la enfermedad del sueño deriva en la entrada en el estado de coma y posterior muerte del enfermo.

Mal de Chagas

ETAPA AGUDA. La enfermedad se manifiesta con un cuadro agudo, 6-10 días después de la infección inicial y se extiende por 1-2 meses. 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" (figura i5). 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. Los parásitos pueden ser detectados fácilmente en esta fase en la sangre periférica. Esta etapa termina cuando se alcanza un equilibrio inmunológico, resultando en la reducción de tripomastigotes en sangre a un número tal que no resulta posible su detección. 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).

ETAPA CRONICA. Después de la etapa aguda, el paciente entra en una fase asintomática, la forma indeterminada de la etapa crónica del mal de Chagas. El 70-85 % de los pacientes permanecerán en esta etapa por el resto de su vida. 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 15 o 25 años después de haber contraído la enfermedad. En la Argentina, la manifestación clínica más frecuente es la cardiopatía (figura i6), 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. Mayormente, estos casos aparecen en varones de entre 20-45 años de edad. Frecuentemente se registra dolor de

pecho, mareos, palpitaciones y edemas periféricos. Arritmia, tromboembolismo, fallas cardíacas y muerte súbita son otras consecuencias frecuentes de esta etapa.

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.

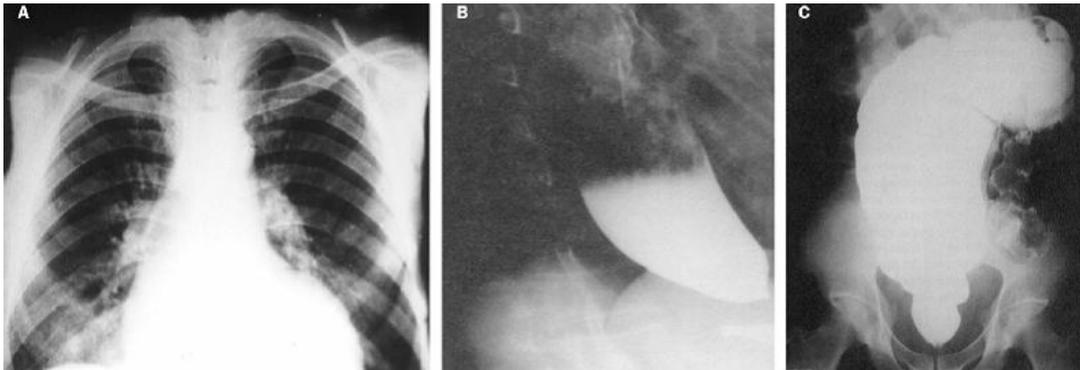


Figura i6: Radiografías de patologías causadas por el Mal de Chagas: A) Cardiopatía, corazón agrandado, B) megaesófago, y C) megacolon

2.2.4.- Estrategias de control de la enfermedad.

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 mediante el control del vector, la prevalencia de la infección se redujo más del 75 % en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. En 1997, Colombia Ecuador Perú y Venezuela comenzaron acciones similares, limitadas un año después por El Salvador, Guatemala, Honduras, México y Nicaragua. Ambos programas lanzaron también iniciativas de diagnóstico universal de dadores y bancos de sangre.

Actualmente, el Mal de Chagas en etapa aguda ha sido eliminado de varias áreas rurales y el balance costo-beneficio de estas iniciativas es altamente positivo. El contagio por vector ha sido eliminado en Chile, Uruguay y grandes zonas de Argentina y Brasil, sin embargo se han registrado brotes de esta enfermedad como por ejemplo el de marzo de 2005 en el estado de Santa Catarina, Brasil.

En el caso de la tripanosomiasis africana, el control del vector es una de las grandes esperanzas para un manejo efectivo de la enfermedad, tanto humana como veterinaria. Grandes áreas de vegetación y varios mamíferos salvajes que podían ser reservorios de la forma rhodesiense de la enfermedad, fueron eliminados. En el caso de

la forma gambiense de la enfermedad, durante mediados del siglo 20 campañas de tratamiento masivo, para reducir el número de reservorios humanos, tuvieron una efectividad importante en la disminución de la transmisión en África oriental.

Actualmente, estrategias más sutiles son empleadas en el control de la mosca tse tse. Debido a consideraciones ecológicas, las fumigaciones, tanto generales como dirigidas a partes específicas de los árboles, han sido limitadas pese a la efectividad demostrada. Las trampas para moscas tse tse han sido muy útiles, dependiendo de la ecología y comportamiento de las diferentes especies de mosca. Las trampas más exitosas fueron aquellas impregnadas de insecticida, que presentaban un estímulo químico o de color (azul o negro). Incluso ganado recubierto de insecticida como trampa viviente ha sido utilizado con gran éxito en el control del vector.

La estrategia de macho estéril es actualmente la mas conocida, debido al éxito en la erradicación de *Glossina austeni* de la isla de Unguja (Zanzíbar). En 2002, la Agencia internacional de Energía Atómica, declaró su intención de liberar machos estériles en 37 países endémicos.

Muchos obstáculos científicos y técnicos limitan la probabilidad de éxito del proyecto. Sin embargo es alentadora la toma de conciencia de la clase política africana respecto al problema sanitario que representa la tripanosomiasis y a la predisposición de contribución de las agencias internacionales. Además, el éxito conseguido en el control de los insectos vectores en el caso del Mal de Chagas, funcionó como estímulo de la comunidad de la Enfermedad del sueño, para que se reestablezcan los programas de control de vector en África.

Pese al optimismo generado por la efectividad de los programas de control, estas enfermedades siguen siendo un desafío para la comunidad científica, los equipos médicos de regiones endémicas y los diseñadores de campañas de salud. Se necesita rápidamente más conocimiento y un mayor entendimiento de las enfermedades y sus patofisiologías, así como también nuevas drogas y planes de cooperación entre organizaciones públicas y privadas a largo plazo.

Mucho se ha avanzado, particularmente en los últimos años, a tal punto que el Consejo Científico Internacional para la Investigación y Control de la Tripanosomiasis en septiembre de 2005, recomendó el lanzamiento de un programa de eliminación de la enfermedad del sueño, adoptar estrategias hacia este objetivo y recomendar a todos los colaboradores, quienes permanentemente han provisto apoyo, a mantener su esfuerzo y asistencia. Entonces habiendo alcanzado la situación donde puede pensarse en la

erradicación de la enfermedad, el mayor desafío a futuro es conservar la actitud alerta, reforzar la vigilancia y seguimiento y continuar esforzándose para alcanzar la eliminación.

Por encima de todo, las tripanosomiasis son enfermedades íntimamente relacionadas a la condición socio-económica de la población y los avances en su control van a depender tanto de los avances médicos como de una mejora en las condiciones de vida de la población. En el caso de África, una mayor estabilidad, desarrollo y crecimiento serán los factores principales para el control de esta enfermedad. En América, el Mal de Chagas mayoritariamente sigue afectando a las poblaciones rurales menos privilegiadas, por lo que el principal factor va a estar ligado a la prosperidad y mejora de la economía.

3.- Aspectos Generales de la biología de los Tripanosomátidos.

3.1.- El kinetoplasto; una organela característica.

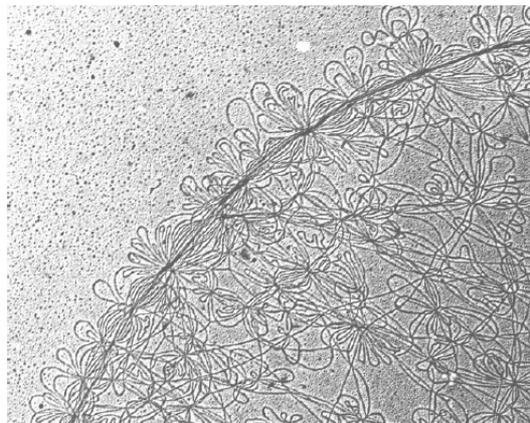


Figura i7. Micrografía electrónica de una parte de un "network" de ADN de un kinetoplasto de *C. fasciculata*. Los pequeños "loops" son minicírculos, moléculas de aproximadamente 2.5 Kb. Tomada de "Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication" Protist 154 (4), 255.

Una de las características más curiosas de los tripanosomátidos, es la presencia de una única red de ADN mitocondrial, conocida como ADN del kinetoplasto (ADNk). Luego de muchos años e investigaciones acerca del metabolismo energético en tripanosomátidos se demostró que el kinetoplasto posee funciones mitocondriales. El metabolismo respiratorio de la forma presente en el insecto es el mecanismo clásico (Grant 1961), mientras que la forma sanguínea presenta un sistema de oxidación de glicerofosfatos, con una glicólisis incompleta desde glucosa hasta piruvato.

La red de ADNk (figura i7) está compuesta por varios miles de minicírculos (moléculas de aproximadamente 2,5Kb) concatenados junto a unas decenas de maxicírculos (30-40 Kb aproximadamente). La función de los maxicírculos, como el ADN mitocondrial en los eucariotas convencionales, es codificar para unos pocos genes como los ARNr y las subunidades de los complejos respiratorios. Sin embargo el mecanismo de expresión génica no es en absoluto convencional, ya que los transcriptos de los maxicírculos deben ser editados para formar un ARNm funcional. La edición ("*Editing*") es una asombrosa forma de procesamiento del ARN, donde residuos de uridina son insertados o deletados de sitios precisos dentro del transcripto del maxicírculo, generando los marcos abiertos de lectura. Los minicírculos codifican los ARNs guía, que son templados para la edición de los transcriptos de los maxicírculos. Actualmente los esfuerzos de los distintos grupos se centran en el estudio de la replicación del ADNk. (Para una revisión acerca del *Editing* ver Madison-Antenucci, 2002; y para una discusión acerca de la evolución del ADNk Lukes, 2002)

3.2.- Los glicosomas.

Mientras que diversos estudios profundizaban en el conocimiento sobre el metabolismo energético de los tripanosomátidos 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 kinetoplástidos flagelados) se localizaban en organelas especializadas unidas a la membrana a las cuáles se las denominó glicosomas (Opperdoes, 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 del kinetoplasto (mitocondriales). Mediante la compartimentalización de las siete primeras enzimas glicolíticas y dos enzimas del metabolismo de glicerol (en otros organismos comúnmente citosólicas), las formas sanguíneas incrementan notablemente la tasa de glicólisis y pueden sobrevivir con la energía proveniente del pasaje de glucosa a piruvato.

3.3.- Evasi3n del sistema inmune.

Se sabe desde hace muchos a1os que en el ganado infectado, en el caso de *Trypanosoma brucei*, existe gran variaci3n c3clica en el n3mero de par3sitos (Bruce, 1895). Con los a1os se demostr3 que esto responde a una estrategia de los par3sitos en su forma sangu3nea para evadir el sistema inmunol3gico del hu3sped. La estrategia consiste en modificar de manera peri3dica todas las glicoprote3nas variables de superficie (VSGs) del par3sito que son blanco del sistema inmunol3gico. Cada tripanosoma sangu3neo expresa un tipo de VSG, la cu3l es reemplazada de manera espont3nea por otra diferente con una frecuencia cercana a $10^{-2/4}$ por generaci3n. La respuesta inmune contra estas VSGs es suficiente para matar a la gran mayor3a de los par3sitos en unos pocos d3as. Sin embargo, el surgimiento de nuevas variantes permite la propagaci3n de la infecci3n. El n3mero total de par3sitos en la sangre se mantiene relativamente constante en el tiempo m3s all3 de las fluctuaciones y logran evadir el ataque y sobrevivir mientras permite que el hu3sped contin3e vivo. De esta forma una proporci3n de la poblaci3n de par3sitos escapan a la respuesta inmune pudiendo propagar la infecci3n y recuperando el nivel de parasitemia nuevamente.

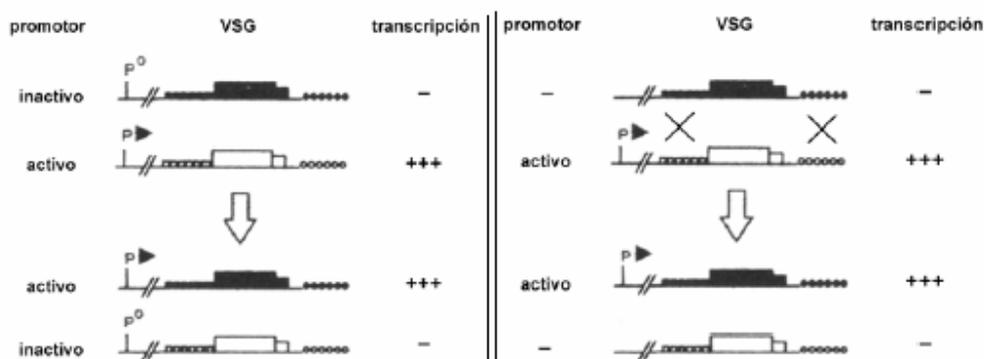


Figura i8. Mecanismos moleculares responsables de la variaci3n antig3nica de las VSGs. Panel izquierdo. Este modelo propone que la variaci3n en la expresi3n se debe a la activaci3n diferencial de distintos tipos de promotores. Por lo tanto, si en primer lugar se encuentra activo el promotor de la VSG blanca y la negra est3 inactiva (P⁰), 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 casete por otro. En este modelo, no hay activaci3n/inactivaci3n 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 variaci3n se basa en dos mecanismos gen3ticos bien descriptos: la activaci3n de distintos sitios de expresi3n de VSGs y variaci3n de la VSG que ocupa el sitio de expresi3n activa. Los genes de VSG se encuentran dispuestos en arreglos policistr3nicos subtelom3ricos, y alcanzan m3s de 800 genes, de los cuales una gran proporci3n son pseudogenes que pueden ser usados para generar por recombinaci3n

ectópica, genes mosaicos (Berriman, 2005). No describiremos en detalle los mecanismos moleculares que permiten esta variación, pero se puede consultar la extensa bibliografía disponible (Curotto de la Faille, 1992, Maslov, 1993, Aksoy, 1992, Rudenko, 1998, Cross, 1998), La figura i8 esquematiza 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 (panel derecho).

3.4.- Glicosil-fosfatidilinositales.

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 tripanosomátidos 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 glicoinositol fosfolípidos (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 Tripanosomátidos.

Una de las grandes diferencias que existen entre una célula eucariota superior y un tripanosomátido es a nivel de la expresión génica, donde se dan el mayor número de disimilitudes. Entre ellas se incluyen la organización genómica, el control de la transcripción, la transcripción policistrónica, la aparente falta de división de trabajo entre las ARN polimerasas, la carencia de promotores para ARN polimerasa II, el procesamiento de los ARNm 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 tiempo. Quizás su modo de vida parasitaria haya presionado selectivamente para que varios de estos mecanismos se conserven en la evolución. Algunos de estos fenómenos, como el trans-splicing y la edición de ARN, han sido descritos posteriormente en otros taxones, permitiendo la generalización de estos mecanismos.

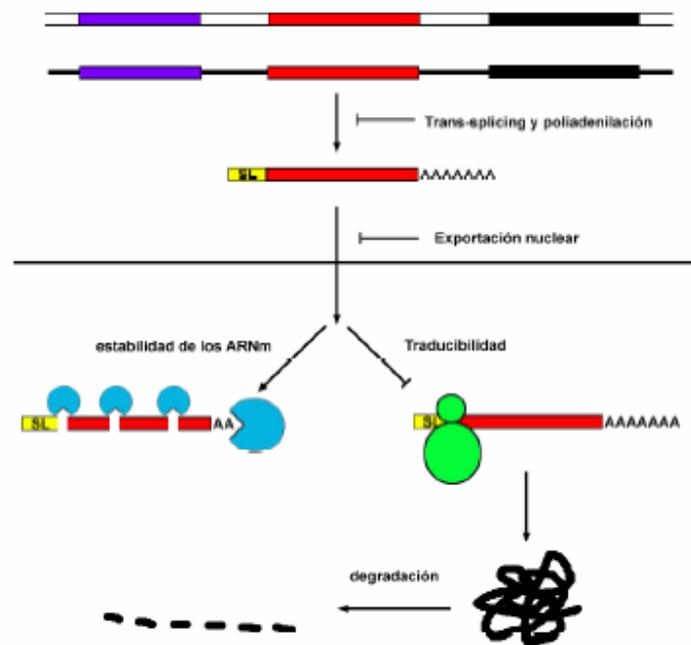


Figura i9. Esquemas de posibles puntos de control post-transcripcional de la expresión génica. Al no haber un control transcripcional evidente de la expresión génica, la mayoría de los marcos abiertos de lectura llegan a expresarse como unidades policistrónicas. Entonces los tres genes (azul, rojo y negro) pasan de ADN (arriba, doble cadena) a pre-ARNm (simple cadena). El primer punto de control se ejerce sobre el 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). En el citoplasma, los mensajeros pueden ser degradados (estabilidad de los mensajeros) por una serie de exo y endonucleasas (en celeste) o bien ser traducidos por los ribosomas (verde). La capacidad de ser traducido de cada 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.

3.6.- Organización genómica.

Los proyectos genoma de los TryTryps (*L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi*) mostraron de manera incuestionable la presencia de una organización general en grupos direccionales de genes (DGCs, Direccional Gene Clusters) en donde las secuencias codificantes comparten una misma orientación transcripcional, sobre la misma hebra de ADN. Estos grupos están conformados en su mayoría por genes ortólogos, que se agrupan entre los compartidos por los tres organismos, por solo dos de ellos o aquellos específicos de cada especie. Excepto casos excepcionales, los genes no contienen intrones de clase II, es decir, poseen un solo exón por gen y están arreglados en grandes grupos de repeticiones contiguas del mismo (o muy similar) marco abierto de lectura. Además, se encuentran separados por pequeñas regiones de secuencia no relacionada, o regiones intergénicas que aportan las secuencias necesarias para el procesamiento de los pre-ARNm. Los genes de copia única se encuentran en relativamente baja frecuencia en tripanosomátidos y los genes multicopias arreglados en repeticiones continuas. Existen dos explicaciones para esta disposición de genes: primero, como un mecanismo seleccionado para evitar la pérdida de genes esenciales dada la tendencia de estos organismos a translocar y amplificar secuencias génicas. Segundo, como un mecanismo para regular la abundancia de un ARNm determinado dada la aparente falta de regulación transcripcional en estos organismos (ver más adelante).

Por sobre todas las cosas pareciera existir una presión selectiva muy fuerte para preservar el orden génico y mantener intactos los DGCs a pesar de la extensa divergencia de secuencias entre los genes, resultado de esto es la gran conservación de la arquitectura genómica donde la sintenia (conservación del orden de los genes) surge como característica destacada de estos organismos. Interesantemente, el 43% de los puntos de ruptura de sintenia ocurren muy cerca o en las regiones de “cambio de hebra” que separan grupos direccionales de genes DGCs.

La correlación frecuente entre los bloques de sintenia conservados y los gran DGCs característicos de los TryTryps puede también reflejar su acoplamiento único de la transcripción con el subsiguiente procesamiento del ARN por trans-splicing y poliadenlación. Se ha postulado que la transcripción de los genes codificantes de proteínas tiene inicio en solamente algunos sitios en cada cromosoma (Clayton, 2002, Worthey, 2003, Martínez-Calvillo, 2003), sugiriendo que puede haber presión selectiva contra la rotura de la sintenia dentro de los grupos policistrónicos río abajo de estos

sitios. Es también posible (y no necesariamente sin relación) que las rupturas de la sintenia asociadas a regiones de “cambio de hebra” puedan reflejar índices más altos de la recombinación en estos sitios, posiblemente como resultado de acoplamiento con procesos de replicación. Por lo tanto, esta organización genómica permite explicar dos hechos distintivos de los tripanosomátidos: la transcripción policistrónica de grandes unidades codificantes y la escasez de promotores identificados hasta el presente.

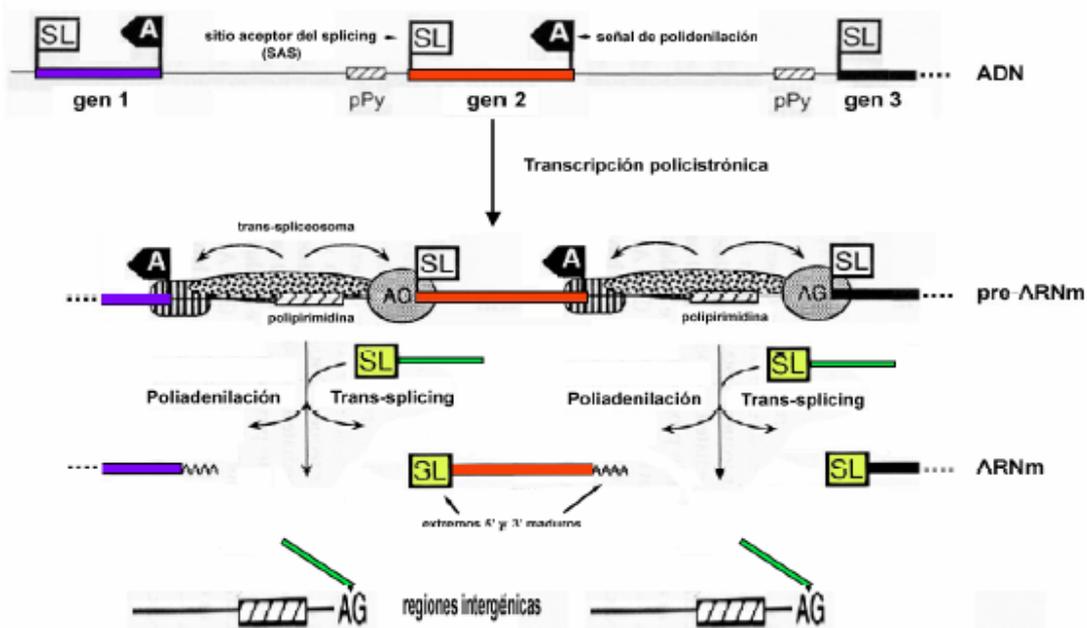


Figura i10. Esquema simplificado de los mecanismos de expresión génica y procesamiento de los ARN mensajeros en tripanosomátidos. A nivel del ADN, los genes se encuentran como copias consecutivas del mismo o muy similar marco abierto de lectura (gen 1 azul, 2 rojo, 3 negro, etc., etc.). Cada marco abierto 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-ARNm). 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 procesados. Ver texto para mayores detalles. Figura basada en "Molecular Biology of Parasitic Protozoa" (1996, Smith D.F. y Parsons M., eds.)

3.7.- La transcripción: Transcripción policistrónica, polimerasas, promotores

La transcripción policistrónica en tripanosomátidos ha dejado de ser tema de debate hace mucho tiempo para ser considerado un hecho ampliamente demostrado (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 ARNm maduros

monocistrónicos que darán lugar a las proteínas a partir el transcripto inmaduro?, y, ¿Como se define una unidad transcripcional?

Poco se sabe acerca del mecanismo de inicio de la transcripción en tripanosomátidos y solo unos pocos promotores han sido funcionalmente analizados (Clayton, 2002). Los cromosomas se caracterizan por sus arreglos de DGCs como antes mencionamos. Estos grupos pueden abarcar hasta más de 1,2 Mb ubicadas de forma convergente o divergente, y están separados por regiones de cambio de hebra de 0,9 – 14 Kb (Tosato, 2001). La evidencia experimental sugiere que la transcripción policistrónica por ARN polimerasa II (RNAP II) inicia de manera bidireccional en las regiones de cambio de hebra divergentes, (Worthey, 2003, Martinez-Calvillo 2003, 2004) y termina dentro de las regiones de cambio de hebra convergentes, las cuales frecuentemente contienen los genes para tARN (ARN de transferencia), rARN (ARN ribosomales), y/o snARN (ARN nucleares pequeños) (Martinez-Calvillo, 2004). Varios DGCs largos contienen genes de snARN o tARN (los cuales son transcritos por la RNAP III), sugiriendo que los DGCs pueden representar más de un policistrón. En la mayoría de los extremos de los cromosomas, la transcripción esta direccionada hacia el telómero, y algunos casos, el DGC más cercano al telómero es muy corto (incluyendo de uno a tres genes). Aparentemente la pregunta más relevante es como se define el final de la transcripción. De esta manera, un mismo marco abierto de lectura es transcripto en unidades policistrónicas de distinta longitud incluyendo un número variable de copias de dicho gen. Sorprendentemente, el resultado final es siempre el mismo, un ARNm monocistrónico maduro.

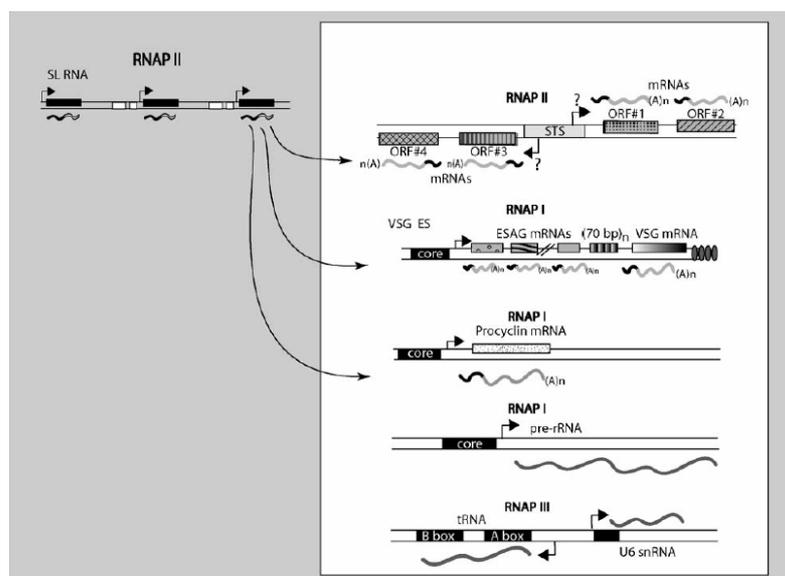


Figura i11. Representación esquemática de la transcripción en tripanosomátidos. Todos los elementos promotores, representados por una caja negra, incluyen 2-4 repeticiones cortas, ~10pb. Los elementos del promotor del SL ARN figuran en bloques blancos. El área gris STS puede contener sitios de inicio de la transcripción de pre-ARNm. El SL ARN (línea negra ondeada) comprende los primeros 39 nt. De cada ARNm (línea ondulada gris seguido por (A) que significa la cola de poli-A). En los ARNm maduros el SL es seguido por una región no traducida 5', de longitud gen-específica, un marco abierto de lectura (ORF), una región 3'UTR, también de longitud específica de cada gen, y la cola de poli-A. Para un mismo ARNm frecuentemente las regiones 5' y 3' UTR son heterogéneas, significando que se utilizaron distintos sitios de trans-splicing y poliadenilación durante la maduración del ARNm. El pre-ARNr, que codifica para los ARNr 18S, 5.8S y 28S, los genes acoplados de ARNt y snARN, están como líneas onduladas gris oscuro. Los óvalos representan las regiones subteloméricas.

Los tripanosomas tienen copias altamente conservadas de las tres ARN polimerasas (RNAP) descritas en eucariotas. La figura i11 ejemplifica en una forma genérica los roles de las 3 RNAPs en tripanosomas. La ARN polimerasa I (RNAP I) de *T. brucei* característicamente transcribe el pre-ARNr (18S, 5.8S y 28S). Sorprendentemente RNAP I transcribe dos ARNm de genes que codifican para proteínas y son específicos a una etapa del ciclo de vida: VSGs y las prociclinas (EP y GPEETs) (Gunzl, 2003, Pays, 2005). RNAP II transcribe los ARNm, así como el gen del Splice Leader (SL) ARN [Bangs, 1992, Gilinger, 2001). Finalmente, la RNAP III transcribe los trans, 5S ARN y los snARNs, ricos en uridinas (Nakaar, 1994).

Las RNAPs de tripanosomas son comparables con sus homólogos eucariotas en cuanto a la actividad transcripcional y estructura, sin embargo han adquirido características específicas posiblemente debido a dominios funcionales exclusivos de tripanosomátidos y/o factores proteicos con los que interactúa. Las búsquedas en base de datos y los experimentos bioquímicos demuestran que los tripanosomas poseen entre 12 y 15 factores proteicos homólogos con las 3 RNAP de *S. cerevisiae* y humanas. [Archambault, 1993, Huang, 2001, Ishihama, 1998, Kelly, 2005) Se destacan algunas desviaciones hacia particularidades específicas de los TryTryps, La subunidad mayor de RNAP I tiene un dominio amino terminal único, La subunidad mayor de RNAP II tiene un dominio carboxi terminal (CTD) único y radicalmente distinto al caracterizado en las RNAP II de otros eucariotas, y hay dos isoformas de las subunidades del RPB5 y RPB6, que usualmente están representadas por sólo una isoforma y forma parte de las tres RNAPs en otras células eucariotas.(Evers, 1989, Kelly, 2005, Shimanski, 2003, Smith, 1989, Walgraffe, 2005).

Al igual que los otros ARNm eucariotas, los de tripanosomas presentan modificaciones en los extremos 5' y 3'. Simultáneamente a la obtención de mRNAs individuales a partir de marcos abiertos de lectura (ORFs) co-transcriptos en un precursor policistrónico, hay un conjunto de reacciones coordinadas de poliadenilación y "capping". Para convertir el pre-ARNm policistrónico en unidades estables y traducibles monocistrónicas, los tripanosomas presentan una gran cantidad de transcriptos del SL

ARN, que posee en su extremo 5' un "cap" presintetizado altamente modificado, (cap 4 m7Gpppm6,2AmpAmpCmpm3Um) derivado de los transcritos del gen de SL ARN. Un abundante stock de SL ARNs, "pre-capeados" le permite al parásito sintetizar mensajeros estables y por consiguiente, maduros. Específicamente, dos ARNm en tándem están separados por una región intergénica y la poliadenilación del primer gen ocurre luego de que el segundo gen recibe el SL ARN pre-capeado en su extremo 5', en una reacción conocida como SL trans-splicing (la cual veremos mas adelante). Mientras que las regiones intergénicas son variables, la poliadenilación y capping tienen lugar a aproximadamente 200 pb uno del otro (LeBowitz, 1993, Ullu, 1993) (figura i11)

Este grupo de reacciones inusuales permite producir una gran cantidad de ARNm funcionales en una sola ronda de transcripción de la RNAP II. Los tripanosomas evitan el proceso de capping cotranscripcional presente en otros eucariotas, el cual requiere de una actividad pausada de la RNAP II, el reclutamiento de tres actividades enzimáticas relacionadas al capping, y la formación de un CTD especialmente modificado dentro de la subunidad mayor de RNAP II. La transcripción policistrónica le permite a los tripanosomas evitar el reinicio repetitivo de la transcripción requerido en los eucariotas de vida libre.

Distintos experimentos han permitido identificar unos pocos promotores, como el caso de los promotores de RNAP I para VSG (Clayton, 1990; Jefferies, 1991; Sherman, 1991; Gottesdiener, 1991; Janz, 1994), promotores de RNAP II, como los de los genes para el Splice Leader (Saito, 1994) y los promotores de U6 y U3 así como de los tARN, que han sido descritos para RNAP III

Sin embargo, la búsqueda de promotores RNAP II para genes codificantes para proteínas ha sido infructuosa. Surge entonces una pregunta clara: ¿Qué significa la falta de promotores para RNAP 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. En segundo lugar, talvez estos promotores no existan y en tal caso la transcripción se inicia aleatoriamente en cualquier región intergénica, o de cambio de cadena.

La transcripción debe ser considerada desde el objetivo primordial del parásito: sobrevivir en un ambiente hostil. Esto implica la replicación en este ambiente, la capacidad de adaptación a los cambios bruscos al pasar de la mosca al hospedador mamífero, la evasión del sistema inmune y cierto grado de autonomía respecto del

hospedador. Tal vez la gran incorporación de glucosa de la sangre del mamífero es el costo del alto nivel de expresión génica constitutiva, al menos en la forma sanguínea del parásito. La provisión continua de transcritos en cambio, puede promover una rápida respuesta a cambios en el entorno, incluyendo el eventual retorno del parásito al insecto vector. Mientras que esta transcripción a gran escala aparenta ser un derroche energéticamente hablando, puede asegurar la supervivencia del parásito en el advenimiento de fluctuaciones en el ambiente. De la misma forma se puede analizar la utilización de la RNAP I en la transcripción de las VSGs, lo cual le permite al parásito contar con una gran cantidad de transcritos para VSGs dado que este promotor sólo utiliza una RNAP abocada exclusivamente a la síntesis de pre-rRNA. Asimismo podría estar permitiendo la expresión de los ARNm de VSG en una "fábrica transcripcional" compartimentalizada, como con los pre-rARN. (Navarro, 2001)

Entre los promotores que se conocen están los que dirigen la expresión de los antígenos VSG, prociclinas, 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, como es el caso de los promotores de los genes de rARN, que recuerdan a un promotor de SL básico (RNAP II). Es posible que los promotores de los genes de rARN y SL ARN, que se expresan constitutivamente compartan factores de transcripción comunes, mientras que los genes estadios específicos como VSG y EP/GPEETs requieren de un alto grado de regulación dirigida por un grupo particular de complejos de inicio de la transcripción.

El promotor del Splice Leader ARN (SL) es el único identificado para RNAP II. Este promotor se caracteriza por no poseer elementos similares a la caja TATA, ni a BRE (B-recognition element), pero si presenta un elemento bipartito PSE (Proximal Sequence Element). Este promotor se asemeja notablemente al promotor humano del U1 snARN, el cual requiere del complejo proteico activador de snARN (SNAPc), junto con TBP, TFIIA-B-F-E junto a la RNAPII. Los tripanosomas presentan una versión del SNAPc, de sólo 3 subunidades, las cuales interactúan con las subunidades de TFIIA y con TRF4 (TBP). A su vez TRF4 se asocia con el promotor del SL así como también con regiones 3' de varios genes codificantes de proteínas (Ruan, 2004). Así también una forma particular del factor de transcripción general TFIIIB interactúa con el promotor del gen de SL. (Palenchar, 2006). Esta proteína esencial de tripanosomátidos presenta

muchas de las características de los extensamente estudiados TFIIBs eucariotas, e incluso pese a su gran similitud interacciona con un factor exclusivo de *Trypanosomas*. El rol preciso de SNAPc, TRF4, TFIIA y TFIIB de tripanosomátidos, así como las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, todavía son desconocidos.

Los conocimientos en el área de la transcripción todavía no son suficientes para determinar si la ausencia de una regulación transcripcional se debe a la aparente falta de factores basales de transcripción.

Actualmente el mayor incremento se dio a nivel de la comprensión de la transcripción del gen de SL ARN, el cual nos recuerda el sistema dependiente de RNAP II de los snARNs. Claramente existen aspectos distintivos de la transcripción del gen SL ARN. Dándole una visión evolutiva a los sistemas de transcripción los tripanosomas nos permiten ver como se gestaron un conjunto de factores basales de transcripción ubicado entre los modelos básicos de Archaea con una única RNAP similar a la RNAP II eucariota y los modelos eucariotas ampliamente estudiados.

Finalmente, RNAP III transcribe los genes de los tARN y snARN. En tripanosomas los promotores de los genes de tARN presentan elementos en cis-intragénicos, denominados caja A y B, recordando a ciertos promotores de otros eucariotas. Un subgrupo de promotores de los genes de tARNs tienen una función secundaria, sus cajas A y B sirven como elementos del promotor de los genes U3, U6 y 7SL, ubicados río arriba, opuestos y en la cadena complementaria. Estos dos elementos junto a un tercero en la región intragénica del gen de U-snARN, conforman el promotor para la transcripción por RNAP III. Incluso en el caso de U2, el cual no tiene genes de tARN opuestos, se conservan los elementos A y B.

Una revisión de la transcripción de tripanosomátidos, destaca la naturaleza única de estos parásitos en su expresión génica, como los promotores compartidos de RNAP III, la utilización de RNAP I para la expresión proteica y las características inusuales de la RNAP II incluyendo su dominio C- terminal. Notoriamente, vale la pena resaltar que aún siguen sin respuestas las preguntas iniciales, como ser la expresión diferencial de los ARNm de VSGs y el inicio de la transcripción de los pre-ARNm dependientes de RNAP II.

3.8.- Regulación transcripcional.

En los sistemas mas estudiados de eucariotas, el inicio de la transcripción es el punto clave en el control de los niveles de expresión génica. En el paradigma eucariota,

la producción de los ARNm, tanto de genes regulados como de los "housekeeping" esta controlada por proteínas de unión al ADN específicas de elementos en cis. Estos factores se dividen en factores basales y activadores que funcionan juntos reclutar a RNAP II e iniciar la síntesis del ARNm. El inicio de la transcripción es entonces la culminación de una serie de eventos coordinados que incluye remodelación de la cromatina, modificaciones proteicas, interacciones directas proteína-ADN y el ensamble de co-activadores.

En la transición de *T. brucei*, desde la mosca tse tse al hospedador mamífero, uno podría imaginar que un gran número de genes son activados a nivel transcripcional, siguiendo el paradigma eucariota. Sin embargo, la transcripción policistrónica junto a la ausencia de promotores clásicos de RNAP II indica que el inicio de la transcripción no es un factor significativo en la producción de ARNm. En cambio la expresión génica constitutiva parece ser la regla en estos organismos. Como consecuencia, los complejos de iniciación multi-proteicos y limitantes y las complejidades asociadas simplemente parecen estar ausentes. Esta idea tiene soporte en la falta de identificación de factores de transcripción activadores, co-activadores y basales en estos parásitos.

En lugar de la expresión diferencial de genes con promotores de RNAP II los tripanosomas tienen un genoma plástico que les permite usar la amplificación génica para afectar la producción de ARNm, y consecuentemente la cantidad de proteína. Por ejemplo, la característica estructura "subpellicular" que le brinda su forma ahusada, es dependiente de la expresión de una numerosa cantidad de genes de alfa y beta tubulina ordenados en tándem. El requerimiento de grandes cantidades de SL ARN para brindar el cap a cada ARNm se alcanza por la repetición a nivel cromosomal de los genes de SL ARN (63 en *L. major*, 96 en *T. cruzi* y 28 en *T. brucei*).

Un hecho importante hizo de los promotores de VSG y prociclina los más 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.

Se 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 la 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 ARN, 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 tripanosomátidos 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.

3.9.- Regulación post-transcripcional.

Podría creerse erróneamente que, en vista de la organización genómica de los Tripanosomátidos 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 pre-ARNm policistrónicos, la estabilidad de los mARNs, el transporte de los mARNs maduros al citoplasma, la estabilidad y la traducibilidad de tales mARNs, 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 i9).

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

La transcripción policistrónica requiere que los transcritos primarios inmaduros sean procesados a transcritos 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 mARNs de la degradación y de permitir una traducción adecuada de los mismos (figura i10). En los Tripanosomátidos el agregado del cap ocurre mediante una reacción de trans-splicing (que también podríamos llamar trans capping) (Agabian, 1990) (figura i12).

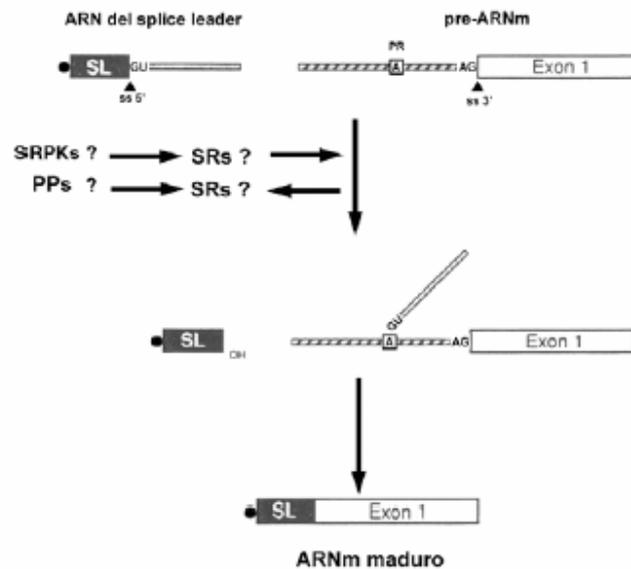


Figura i12. Esquema de la reacción de trans-splicing. La reacción bimolecular, une dos moléculas de RNA transcritas independientemente, el SL RNA, y el RNA codificante (pre-mRNA), esquematizado como exón 1, en la figura. La formación de un intermediario con forma de "Y", gracias al ataque del grupo fosfato 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 acceptor, 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 quinasas 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 ARNs transcritos por separado (figura i12). Existen dos formas descritas de esta reacción, pero aquí nos ocuparemos solamente de la que se encuentra en protozoarios, entre otros. Básicamente, la reacción consiste en el agregado de un pequeño transcrito denominado SL ("splice leader"), a otro transcrito. La reacción fue descubierta en *Trypanosoma brucei*, (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 vio que clones de DNA copia (cADN) y genómicos eran idénticos, excepto por una secuencia invariable de 39 nucleótidos encontrada en los extremos 5' de los clones de cADN. 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 ARN del "splice leader" (SL ARN). Además, en el SL ARN, 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 revisión Agabian, 1990).

La evidencia definitiva de tal reacción se obtuvo cuando se demostró la existencia de los intermediarios de la reacción, *in vivo* (figura i12, Murphy, 1986, Sutton, 1986, Laird, 1987). Como se verá mas adelante (figura i13), 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 vio que todos los transcriptos mRNA de Tripanosomátidos 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 Drs. E. Ullu y C. Tschudi (Mair, 2000), se describió el único caso de un intrón en una secuencia de *Trypanosoma brucei* y *cruzi* a nivel del gen de la Poli (A) Polimerasa (PAP). Esto obliga, por definición, a que exista la maquinaria capaz de procesarlo, sin recurrir al trans-splicing.

Finalmente, cabe decir que el trans-splicing no es exclusivo de tripanosomátidos, 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-ARN y el pre-ARNm? 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). Está 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 13). Debido a la gran homología existente entre los U-snRNPs de vertebrados y los de Tripanosomátidos, se cree que podrían cumplir funciones similares en ambas reacciones. Durante el cis-splicing, estos snRNAs establecen complejas interacciones RNA-RNA, incluyendo snARN-pre-ARNm y snARN-snARN (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-ARN provee a los ARNm de estos organismos la estructura cap, que en protozoos es del tipo 4. No se conocen señales consenso de poliadenilación en Tripanosomátidos 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 mARNs. Esta variabilidad podría ser importante para la regulación de la expresión génica (Layden, 1988, Revelard, 1993). Es claro que el monto final de mARN 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, 1993). 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 i12). 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 tractos 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.

Esta maquinaria estaría compuesta por todos los elementos necesarios para llevar a cabo tanto el trans-splicing como la poliadenilación. De entre los factores no-snRNPs, en 1999 se describe por primera vez en tripanosomátidos, una proteína con grandes similitudes a las proteínas de unión a ARN de cis-splicing, TSR1, definiéndola como una proteína SR en *Trypanosoma brucei* (Ismaili, 1999). Posteriormente, en una serie de detallados estudios el mismo grupo describe que TSR1 interactúa con TSR1IP, una proteína similar a U1 70K del complejo U1 (Ismaili, 2000) 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 tripanosomátido. 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. Particularmente, este grupo nunca 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.

Posteriormente, nuestro grupo describe y caracteriza por primera vez una proteína SR genuina en *Trypanosoma cruzi*, denominada TcSR, (Portal, 2003), la cual era activa en distintos ensayos de splicing, tanto *in vitro* como *in vivo*, en sistemas heterólogos. Paralelamente presentamos la caracterización de la proteína quinasa específica de proteínas SR (SRPK) de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. (Portal, 2003bis). Ambas quinasas regulan la actividad de varias proteínas SR, incluyendo a TcSR, en distintos ensayos de splicing. De esta forma se describió, por primera vez, la existencia de los componentes básicos de una red de proteínas SR a este nivel evolutivo, sugiriendo la intervención de dicha red en el procesamiento de los pre-ARNm.

3.11.- 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 Tripanosomátidos 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 (ARNg) 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 delección 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 ARNg 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 ARNg 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 ribonucleoprotéico 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).

3.12.- 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 alcanzan para justificar los enormes cambios en la cantidad de estas proteínas. Resultados de arreglos de genes (gene arrays) de los TryTryps, indican que el 1% de los ARNm (detectables) difieren en al menos 2 veces en su abundancia entre etapas del ciclo de vida. El análisis de las mil proteínas solubles más abundantes, indica que 3% están reguladas a lo largo del ciclo de vida. Nuevamente, la regulación del ARNm reportada no es suficiente para explicar las diferencias vistas a nivel de proteínas (Priest and Hajduk, 1994; Saas, 2000). La regulación de la

traducción, la clasificación y degradación de proteínas podrían todas estar contribuyendo.

3.13.- 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 i13). Como resultado de esto, los RNA transcriptos maduros están 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

Los genes eucariotas están interrumpidos por secuencias intermedias o intrones, los cuales son removidos por una maquinaria macromolecular, denominada spliceosoma para formar el ARNm maduro. El spliceosoma consiste de cinco snRNPs (small nuclear Ribonucleoproteins), llamadas U1, U2, U4, U5 y U6, y una gran cantidad de factores de splicing no-snRNPs, que incluyen a las proteínas SR (Kramer, 1996, Jurica, 2003). El spliceosoma se ensambla *de novo* en cada intrón a través de un proceso secuencial altamente coordinado. El inicio del ensamblado del pre-spliceosoma o formación del complejo E (temprano) ocurre mediante el reconocimiento de los sitios 5' y 3' de splicing (5'ss y 3'ss) por U1 snRNP y el factor de splicing heterodimérico U2AF (factor auxiliar del U2 snRNP) respectivamente. U2AF recluta a U2 snRNP al sitio de ramificación en una forma ATP-dependiente, generando el complejo A. Finalmente el complejo B es formado por el reclutamiento de U4/U6·U5 tri-snRNP al spliceosoma.

Posteriormente, un rearrreglo de interacciones proteína-proteína, proteína-ARN y ARN-ARN resulta en la liberación de los snRNPs U1 y U4 y la formación del complejo catalíticamente activo C (revisión en Nilsen, 2003). Mientras los snRNPs están en el corazón de esta maquinaria, un gran número de factores de splicing asociados non-snRNPs, como las proteínas SR, juegan importantes roles en la regulación y ensamblado del spliceosoma.

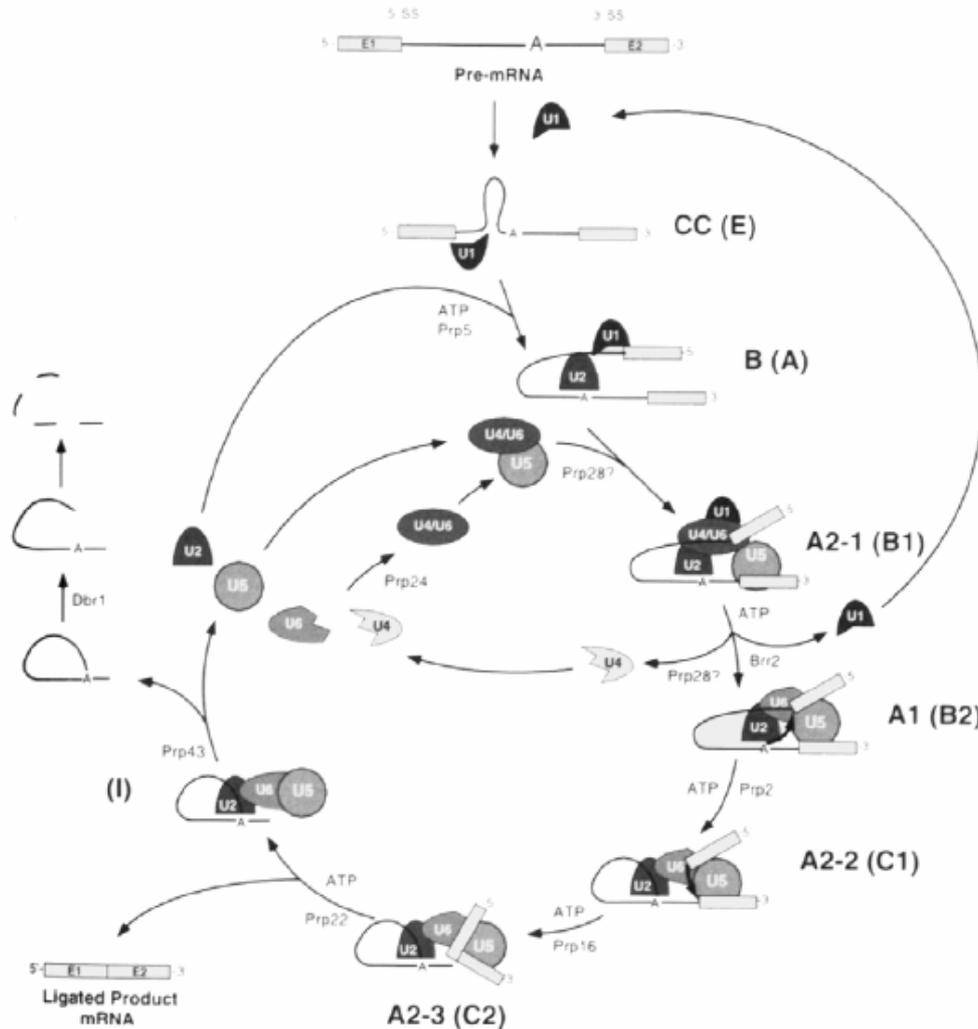


Figura i13. El ciclo del spliceosoma. Se muestra el procesamiento de un pre-RNA conteniendo dos exones y un intrón a la forma de dos exones ligados (abajo a la izquierda) y un intrón con la forma "lazo" (izquierda, al medio). Se resaltan las funciones cumplidas por las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (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 non-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 serina arginina (Proteínas SR)

Las proteínas SR son una familia, relacionada estructuralmente, de factores de splicing esenciales que juegan roles duales en el splicing del pre-ARNm. Las SRs son requeridas para el splicing constitutivo, pero también influyen en la regulación del splicing alternativo (Fu, 1995, Graveley, 2000, Bourgeois, 2004). 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 miembros de la familia SR tienen una estructura modular que consiste de uno o dos dominios de unión a ARN (RRM, RNA recognition motif) hacia el extremo N-terminal y un dominio C-terminal rico en residuos alternados serina-arginina, conocido como dominio RS. Los RRMs determinan la especificidad de unión al ARN, mientras que el dominio RS funciona como un módulo de interacciones proteína-proteína, reclutando los componentes del núcleo del spliceosoma, promoviendo la unión de los sitios de splicing. (Wu, 1993). Recientemente ha sido demostrado que los dominios RS interactúan directamente con el pre-ARNm, contactando de manera directa el punto de ramificación y el 5'ss (Shen, 2004). Dentro de la célula, el dominio RS de las proteínas SR actúa como una señal de localización nuclear, interactuando con un receptor de importación nuclear de proteínas SR (Caceres, 1997, Kataoka, 1999, Lai, 2000), y determina el movimiento entre núcleo y citoplasma de algunas proteínas SR (Caceres, 1998). La fosforilación extensiva del dominio RS juega un importante rol en la regulación de las actividades y localización de las proteínas SR (mas adelante veremos en más detalle, una revisión en Sanford, 2003).

Una clase de proteínas que contienen dominios RS (proteínas relacionadas a SR, SRrp) tienen una estructura de dominios diferente a la de las SR y pueden tener o no RRMs. Este grupo de proteínas incluye entre otras a la proteína específica de U1 snRNP, U1 70K, ambas subunidades de U2AF y otros factores co-activadores de splicing (Blencowe, 1999). Un sondeo reciente de proteínas con dominios RS en genomas de metazoos, mostró una gran cantidad de proteínas con dominios RS con funciones no sólo en el procesamiento del ARN, sino implicadas en remodelación de la cromatina, transcripción por RNAP II y progresión del ciclo celular (Boucher, 2001)

4.1.1.- Rol de las proteínas SR en el splicing constitutivo y alternativo.

Las señales de splicing en eucariotas están menos conservadas, en comparación a los eucariotas simples. Por ejemplo, 5'-ss y 3'-ss están definidas en la mayoría de los intrones por la presencia de dinucleótidos GU y AG respectivamente. Adicionalmente se encuentra un tracto de polipirimidinas (pPy) entre el 3'-ss y el punto de ramificación, una adenosina, ayudando a definir el sitio 3' de splicing. La definición del intrón es complementada por un amplio rango de elementos en *cis*, presentes dentro de los intrones y exones, y un igualmente amplio espectro de proteínas de unión a ARN (factores *trans*). Se cree que las proteínas SR cumplen un doble rol como factores de splicing constitutivo y alternativo. Esta idea se basa en las observaciones de las proteínas SR participan en múltiples pasos durante el ensamblado del spliceosoma. La selección de los sitios de splicing recae en la interacción de proteínas SR (así como en otras proteínas de unión a ARN) con elementos intrónicos o exónicos en *cis*. Interesantemente, los efectos de los elementos en *cis* dependen de su posición. Los sitios de unión para las SR en los exones (ESEs, enhancers de splicing exónicos) ejercen un efecto positivo en la selección del sitio de splicing, mientras que la unión de las proteínas SR en sitios intrónicos reprime la elección del sitio de splicing (Kanopka, 1996). Una complicación adicional para la maquinaria de splicing es el gran tamaño de los intrones, por eso la selección de los sitios de splicing en muchos pre-ARNm de metazoos ha sido descrito como un intento por encontrar una pequeña isla en un océano de ARN (Black, 1995). Los exones son generalmente cortos, y la interacción con las proteínas SR unidas a ESEs, recluta y estabiliza la unión de U1 snRNP y U2AF, a los sitios 5' y 3' de splicing respectivamente en un proceso definido como definición del exón (Robberson, 1990, Boukis, 2004) (figura i14 A). Las SR estarían formando una red de interacciones proteína-proteína a través del intrón para yuxtaponer los sitios de splicing 5' y 3' en un evento temprano durante el ensamblado del spliceosoma, denominado "Intron Bridging" (Figura i14 B). Este acercamiento está mediado por interacciones simultáneas de proteínas SR con U1 70K en el 5'ss y con la subunidad U2AF35 en el 3'ss, vía sus dominios RS. Adicionalmente, siguiendo a la formación del complejo E, las SR facilitan el reclutamiento de U4/U6-U5 tri-snRNP al pre-spliceosoma (figura i14 C) (Roscigno, 1995). Dos SRrp humanas son esenciales para el reclutamiento del tri-snRNP (Makarova, 2001), por lo que interacciones a través de los dominios RS, entre las proteínas SR y SRrp que son componentes del tri-snRNP probablemente medien esta actividad.

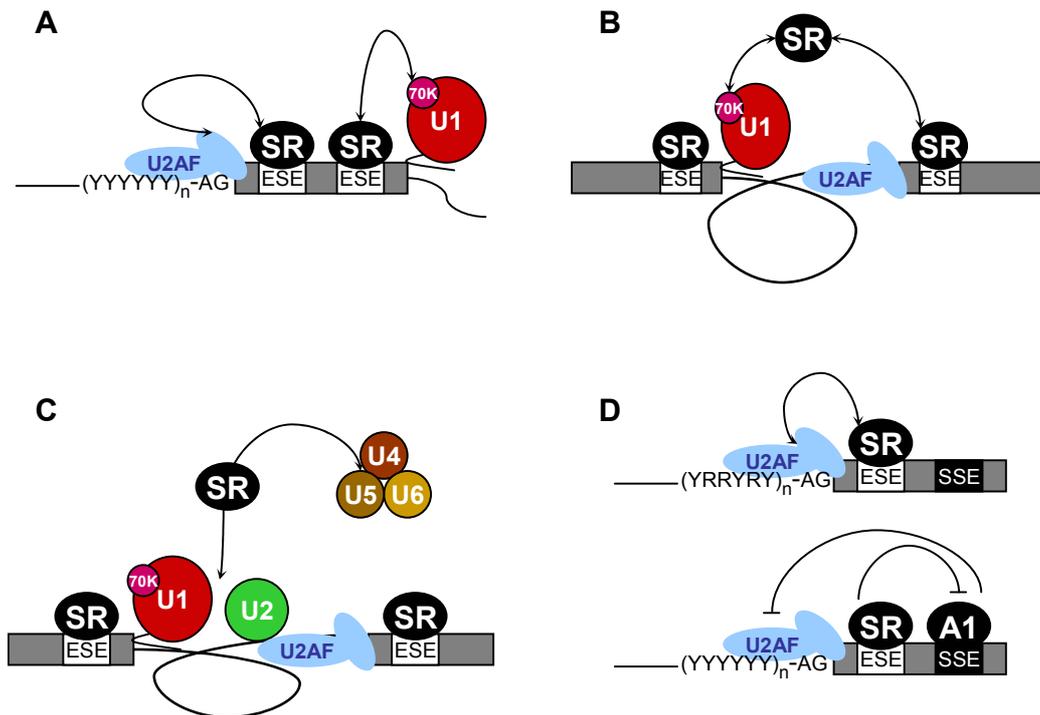


Figura i14 Roles de las proteínas SR en el ensamblado del spliceosoma constitutivo y alternativo. (A) la definición del Exón, por U2AF en un 3'ss ríó arriba y por U1 snRNP en un 5'ss ríó abajo, es facilitada por proteínas SR unidas a ESEs. Hay que destacar el tracto de pPy fuerte junto al 3'ss. (B) 5'- y 3'-ss pueden ser yuxtapuestos tempranamente en la reacción de splicing por interacciones entre las proteínas SR y las subunidades con dominios RS de U1 snRNP y U2AF. (C) Proteínas SR pueden reclutar a U4/U6 U5 tri-snRNP al pre-spliceosoma. (D) SRs unidas a ESEs pueden promover la selección de un 3'ss alternativo reclutando U2AF al 3'ss sub-óptimo. El tracto de pPy es débil. Alternativamente, Silenciadores exónicos de splicing pueden reclutar represores de splicing, como hnRNP A1, y bloquear la selección por U2AF de un sitio 3'ss fuerte. Las proteínas SR pueden contrarrestar los efectos del represor, promoviendo la selección del sitio de splicing

El splicing alternativo juega un papel importante expandiendo la complejidad proteómica codificada por el genoma. Los metazoos han desarrollado un amplio arreglo de mecanismos regulatorios para controlar los patrones de splicing alternativo. Debido a su rol prominente en la selección de los sitios de splicing, las proteínas SR son factores claves en el control del splicing alternativo. Muchos exones son definidos por señales de splicing débiles, por ejemplo, muchos 3'ss alternativas presentan tracts de pPy pobres, ineficientemente reconocidos por U2AF resultando en el salteo del exón. Sin embargo, SRs unidas a ESEs pueden compensar el tracto de pPy débil, reclutando a U2AF (figura i14 D, panel superior). Alternativamente, esta misma unión de proteínas SR a ESEs puede promover la inclusión de un exón alternativo por antagonizar la actividad negativa de Ribonucleoproteínas heterogéneo-nucleares (hnRNP), como hnRNP A1, unidas a elementos silenciadores de splicing. (Figura i14 D, panel inferior, revisión en Blencowe, 2000 y Hastings, 2001). La actividad de las proteínas SR en la regulación del splicing alternativo es antagonizada por proteínas hnRNP de una manera dependiente de la

concentración de cada una (Mayeda, 1992, Caceres, 1994, Yang, 1994). Entonces el nivel relativo y la actividad de los miembros de las familias SR y hnRNP A/B pueden representar un determinante importante en la regulación del splicing alternativo, modulando los patrones de splicing alternativo de una forma tejido-específica ó desarrollo-específica. Adicionalmente, las proteínas SR a veces pueden tener efectos opuestos en la selección de sitio de splicing alternativo, como es el caso de los efectos antagónicos de ASF/SF2 y SC35 en la regulación de la β -tropomiosina (Gallego, 1997) o de ASF/SF2 y SRp20 en la regulación del splicing alternativo del pre-ARNm de SRp20 (Jumaa, 1997). A pesar de la expresión ubicua de las proteínas SR, se han observado variaciones tejido-específicas en la cantidad total y relativa de estas proteínas (Zahler, 1993) Además, la relación ASF/SF2 respecto de su antagonista, hnRNP A1, varía considerablemente en distintos tejidos (Hanamura, 1998). Esto sustenta la idea que cambios en la relación de esas proteínas puede afectar el splicing alternativo de una variedad de pre-ARNm *in vivo*.

4.1.2.- Actividades post-splicing de las proteínas SR

Muchas de las proteínas que se depositan sobre el pre-ARNm, permanecen unidas al ARNm concluido el splicing y pueden influenciar eventos río debajo de este punto. E particular, un complejo multiprotéico denominado EJC (Complejo de la unión exónica) se deposita en forma temporal sobre el ARNm como consecuencia de la reacción de splicing, de una forma dependiente de posición pero no de secuencia. El EJC sirve como plataforma de unión para factores involucrados en la exportación del ARNm y en el NMD (Degradación mediada por mutaciones Non-sense) (Le Hir, 2001, Lykke-Andersen, 2001). Las proteínas SR están localizadas primariamente en reservorios nucleares, llamados speckles (Lamond, 2003), sin embargo, de forma similar a las hnRNP, un subgrupo de proteínas SR migra continuamente entre el núcleo y el citoplasma (Pinol-Roma, 1992, Boucher, 2001]. Para las SR que no migran, como SC35, se ha visto que son retenidas en el núcleo debido a la presencia de una señal de retención nuclear dominante (Cazalla, 2002). Entonces se cree que dichas proteínas SR migratorias pueden tener roles adicionales en el transporte del ARNm y/o eventos citoplasmáticos como la localización, estabilidad y regulación de la traducción de los ARNm (Caceres, 1998). Concordantemente con esto se ha visto que dos proteínas SR migratorias, SRp20 y 9G8, promueven la exportación del ARNm de ARNs sin intrones (Huang, 2001) y también actúan como adaptador de proteínas para la exportación de

ARNm mediante TAP (Huang, 2003). Las proteínas SR están implicadas en la estabilidad y control de calidad del ARN. ASF/SF2 promueve activamente la degradación del ARNm de PKCI-1 (proteína de interacción con la quinasa C) en fibroblastos de pollo, mediante la unión a un elemento rico en purinas dentro de la región 3' no traducida del ARNm de PKCI-1 (Lemaire, 2002). Una función novedosa es la potenciación del NMD, por sobre-expresión de proteínas SR. Esta actividad es dependiente de la presencia del dominio RS pero no correlaciona con las proteínas migratorias (Zhang, 2004). Esto sugiere que de alguna manera las SRs potencian los pasos nucleares del NMD. Finalmente, ASF/SF2 (una SR migratoria) se ha observado asociada a poli-ribosomas en extractos citoplasmáticos y fomenta la traducción de genes reporteros en una forma dependiente de enhancers, tanto *in vivo* como *in vitro* (Sanford, 2004). Una posible explicación es que las proteínas SR migratorias están involucradas en regular la traducción de ciertos ARNm específicos. Elucidar cuales son los ARNm blanco de las proteínas SR migratorias ayudará a entender como estas proteínas influyen los procesos citoplasmáticos de la expresión génica.

En la tabla i2, puede verse que las SR participan en diversos puntos y de diversas formas en procesos de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Las varias funciones atribuidas a las proteínas SR, sugiere que los miembros de esta familia de proteínas son reguladores multifuncionales del metabolismo del ARNm con diversos roles que acoplan los procesos de splicing, exportación de ARNm y traducción, haciendo muestra del impacto a nivel fisiológico de la actividad de las proteínas SR en el control post- transcripcional de la expresión génica.

Tabla i2: Roles a nivel post-transcripcional de las proteínas SR en la expresión génica									
ND, not determinado; +, rol experimentalmente demostrado en el procesamiento de ARN; -, No demostrado									
	splicing constitutivo	splicing alternativo	represión del splicing	migración núcleo- citoplasmática	Exportación ARNm	Estabilidad del ARNm	NMD	traducción	
SRp20	+	+	-	+	+	ND	-	-	
9G8	+	+	-	+	+	ND	-	+	
SRp30c	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	
SF2/ASF	+	+	+	+	-	+	+	+	
SC35	+	+	+	-	-	ND	+	-	
SR38	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	
SRp40	+	+	-	-	ND	ND	+	-	
SRp46	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	
SRp54	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	
SRp55	+	+	-	ND	ND	ND	+	ND	
SRp75	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	

4.1.3.- 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-ARNm. En ese sentido, es interesante que los pre-ARNm de ASF/SF2, 9G8, SC35 y SRp40 sean procesados por splicing alternativo, y que haya isoformas sin el dominio RS. Se desconoce si esos ARNm 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). La actividad de las proteínas SR se modifica en respuesta a factores de crecimiento (Blaustein, 2005).

4.1.4.- 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

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 la

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). Una característica distintiva de estas

quinasas, es que son constitutivamente activas, sin la necesidad de ser modificadas de forma alguna (ver mas adelante en resultados parte II)

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

Los tripanosomátidos poseen sólo un miembro de la familia SRPK, sin identificarse hasta la fecha nuevos miembros de esta u otra familia de quinasas (Portal, 2003bis). TcSRPK y TbSRPK presentan una alta conservación de secuencia, bioquímica y funcional respecto a sus homologas en eucariotas superiores. Las SRPK de tripanosomátidos regulan la actividad de las proteínas SR, tanto *in vitro* como en ensayos de splicing, independientemente del origen de estas últimas. .

RESULTADOS

1. Introducción.

Los trabajos de nuestro laboratorio previos a esta tesis, describieron una proteína en *Trypanosoma cruzi*, llamada TcSR (*T. cruzi* Serine/Arginine-Rich Protein), que guardaba gran homología con miembros de familia de proteínas SR de distintos organismos. Utilizando TcSR en distintos ensayos de splicing, se la clasificó como una proteína SR genuina, que junto a la proteína quinasa específica asociada (TcSRPK) conforman un SR Network. En *T. brucei*, el grupo del Dr. Pays, reporta la existencia de una proteína SR-like, TSR1, la cual presentaba todas las características de las proteínas SR pero no había sido probada su función en el procesamiento de pre-ARNm, y paralelamente nuestro grupo caracteriza inicialmente la TbSRPK. Hasta aquí habíamos llegado en la caracterización de componentes del SR-Network en *T. cruzi* y *T. brucei*, en la tesis del Dr. Portal.

En esta sección de la tesis, se exponen los resultados obtenidos en el estudio de las proteínas SR, TSR1 y TcSR. En primer lugar, junto al análisis de los datos aportados por los proyectos genomas, se establecerán en sistemas heterólogos la caracterización funcional de TSR1 como una verdadera proteína SR y nuevas evidencias respecto a la participación de TcSR en la maquinaria de procesamiento del pre-ARNm en tripanosomátidos. En una segunda parte nos centraremos en la caracterización de las proteínas SR en el marco de la biología de los tripanosomátidos, para finalmente evaluar los efectos originados por alteraciones en el patrón de expresión de las mismas. En Materiales y Métodos se encuentra una versión detallada los distintos experimentos.

2. Arquitectura genómica: Conservación sinténica entre TSR1 y TcSR.

Los kinetoplastidos pertenecen a un marcado linaje evolutivo dentro de los eucariotas (Baladauf, 2000). *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major* están incluidos dentro de este linaje y compartieron un ancestro común hace 400-600 Millones de años, una divergencia que precede a la de los mamíferos por 165 millones de años (O'Brian, 1999, Overath, 2001, Stevens, 1999, Stevens, 2001). Si bien los tres patógenos comparten varias características comunes, también presentan diferencias mayúsculas como las estrategias de evasión inmunológica, *L. major* altera el funcionamiento de los macrófagos que infecta, *T. cruzi* expresa una compleja variedad de antígenos de superficie desde adentro de las células que infecta, y *T. brucei* permanece en formas de vida extracelular pero varía periódicamente su cubierta antigénica. Como vemos, la arquitectura genómica, el contenido génico, la composición y organización de los dominios proteicos van a estar relacionados con evolución respecto de las similitudes y diferencias en el modo de vida y metabolismo de estos parásitos.

La sintenia es la conservación del orden de los genes. El análisis de la sintenia permite estudiar las fuerzas mutacionales y selectivas que actúan en la arquitectura cromosómica y genómica de los organismos. Adicionalmente, la anotación de genes comparativa provee una gran ayuda en la asignación de genes ortólogos entre las especies comparadas, dado que los genes encontrados en posiciones similares frecuentemente son ortólogos.

A grandes rasgos, los resultados que se desprenden de los proyectos genomas de estos tres organismos (TriTryp) pueden apreciarse en la figura R1 y la tabla R1, donde todos las secuencias proteicas predichas por todos los putativos genes

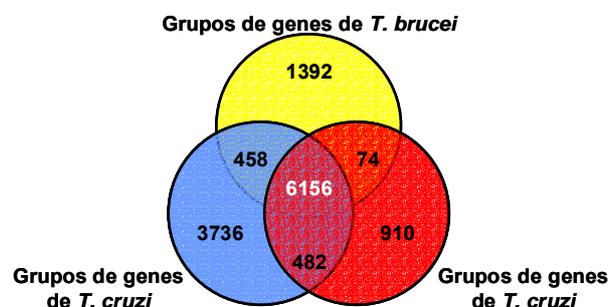


Figura R1. Distribución de genes entre los tripanosomátidtripanosomátidos. Distribución de los genes, calculada con el uso de los COG's curados manualmente. La intersección de cada círculo representa los COGs presentes y compartidos entre las especies involucradas. Tomado de El-Sayed *et al.* Science 309, 404 (2005)

modificantes de proteínas se compararon en una matriz “todos contra todos” diseñada para agrupar los genes parálogos íntimamente relacionados. Finalmente, curados manualmente, los resultados fueron agrupados como COGs (grupos de genes ortólogos –clusters of orthologous genes) entre los 3 genomas o de tres vías, entre dos en particular (de dos vías) o bien exclusivos de la especie.

Tabla R1. Características generales de los genomas Trytryps. Se encontraron 5812 COGs de tres vías sinténicos y 346 no sinténicos. Mpb, Mega pares de bases; CDS, Secuencias Codificantes; ND, No Determinado.

	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. major</i>
Tamaño del genoma haploide (Mpb)	25*	55	33*
Nro. De cromosomas (por genoma haploide)	11*	~28†	36
Nro. De genes (por genoma haploide)	9068‡	~12000§	8311
Total de regiones con bloques sinténicos (Mpb)	19,9	ND	30,7
Tamaño promedio (pb) de CDS en COGs de tres vías sinténicos	1511	1457	1731
Tamaño promedio (pb) inter-CDS en COGs de tres vías sinténicos	721	561	1431

* Excluyendo ~100 intermedios y minicromosomas (total ~10 Mpb). †El número exacto no se conoce y los pares homólogos pueden diferir sustancialmente en tamaño. ‡ Incluye 904 pseudogenes. § El número exacto de genes haploides no ha sido determinado en *T. cruzi*. || Incluye 34 pseudogenes

Los genomas de los tripanosomátidos presentaron un alto nivel de sintenia, donde el 68% de los genes de *T. brucei* y el 75% de los de *L. major* permanecen en un mismo entorno génico. Adicionalmente, casi la totalidad de los COGs (94%) que forman el “core” proteico pertenecen a regiones de sintenia conservada. Por otro lado, los puntos de ruptura de la sintenia se corresponden con la expansión de familias multigénicas, retroelementos y/o RNA estructurales. Interesantemente el 43% de los puntos de ruptura ocurren muy cerca o en las regiones de “cambio de hebra”, las que separan grupos direccionales de genes (DGCs – Direccional Genes Clusters), característicos y exclusivos de los genomas de tripanosomátidos, íntimamente relacionado con su transcripción. Lo llamativo de esta conservación sinténica es que pareciera existir una presión selectiva muy fuerte para preservar el orden génico y mantener intactos los DGCs, a pesar de la extensa divergencia de secuencias entre los genes mismos. A partir de estos estudios nuevas hipótesis que relacionan la funcionalidad de las proteínas codificadas por los genes y la conservación del entorno génico. Este aporte “funcional” es de gran uso para el estudio de familias multigénicas, donde los integrantes de dichas familias presentan mayor similitud entre ellos, que con la isoforma correspondiente en otra de las especies. De esta manera el entorno génico de una isoforma brinda una evidencia de la función de dicha isoforma respecto una familia multigénica identificada en otra especie. De una forma no absoluta ni

concluyente, pero hipotéticamente, un mismo orden génico, representaría una misma función.

Para ver si TSR1 y TcSR respondían a esta conservación sinténica, procedimos a analizar los datos derivados de los proyectos genomas de los TryTryps. El proyecto mas avanzado es el de *Trypanosoma brucei* y es el que utilizamos como referencia para generar los mapas en *Leishmania major* y en *Trypanosoma cruzi*, especie para la cual trabajamos con los “contigs” encontrados, dado que no existe un ordenamiento físico de estos.

Tabla R2. Características generales de los genes de TSR1, TcSR y LmTSR. Mpb, Mega pares de bases; kpb, kilo pares de bases; pb, pares de bases

	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>Nombre</i>	pTSR1	Factor de splicing pTSR1 (TcSR)	Factor de splicing tipo pTSR1
<i>Nombre Sistemático</i>	Tb927.8.900	Tc00.1047053509607.30 Tc00.1047053503715.10	LmjF07.0870
<i>Estatus</i>	Caracterizada experimentalmente	Rol inferido por homología	Función inferida por homología
<i>Tamaño</i>	987 pb	906 pb. 912 pb.	1119 pb
<i>Cromosoma</i>	8 (2,48 Mpb)		7 (596,3 kbp)
<i>Localización cromosómica</i>	(270276-271262) complementaria	Contig 5748 Contig 4716	(442454..443572)

Haciendo uso de los datos obtenidos de la base de datos de GeneDB (www.genedb.org) la primera conclusión del análisis es que se registra un COG de tres vías para las proteínas SR. Es decir que TSR1 y sus ortólogos están presentes en las 3 especies. Como podemos apreciar en la tabla R2, TSR1 se encuentra localizada en el cromosoma 8 de *T. brucei* y basándonos en su localización dentro del mismo, se ubica en el bloque sinténico Tb8.1 de la región de cadena complementaria, de los mapas generados por el proyecto genoma de los TryTryps (Figura R2). Este bloque se corresponde con el bloque Lm7.3 de *L. major*, que refiere al cromosoma 7 bloque 3 de dicha especie. Para el caso de TcSR, los “contigs” con los que nos encontramos no son únicos, debido a la naturaleza híbrida del genoma de dicho organismo, y a la dificultad en el ensamblado de los mismos por la alta frecuencia de regiones de secuencias repetitivas, motivo por el cual no se ha desarrollado un mapa físico único y completo para este proyecto.

En la figura R3 puede observarse un esquema simplificado de la conservación del entorno génico para TSR1 y TcSR. Así mismo, resulta evidente la conservación del

gen ortólogo en *Leishmania major*, pTSR1-like, el cual no había sido reportado hasta el momento. De esta forma queda demostrado que TSR1 pertenece a uno de los COGs sinténicos identificados a partir de los datos del proyecto genoma, y de esta forma aportamos una evidencia mas que apunta a que TcSR, TSR1 y LmSR, intervendrían en las mismas funciones en cada uno de los parásitos.

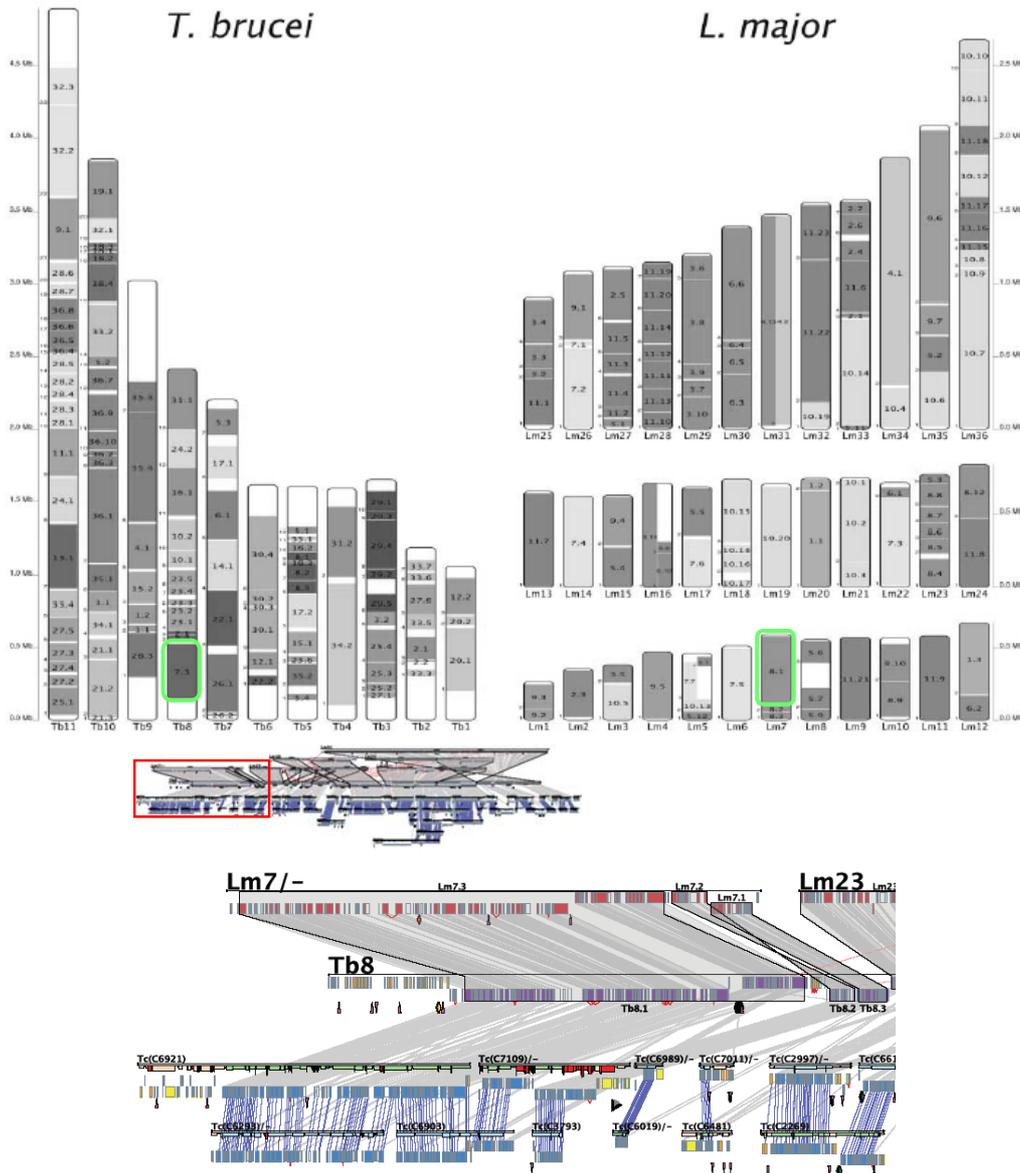
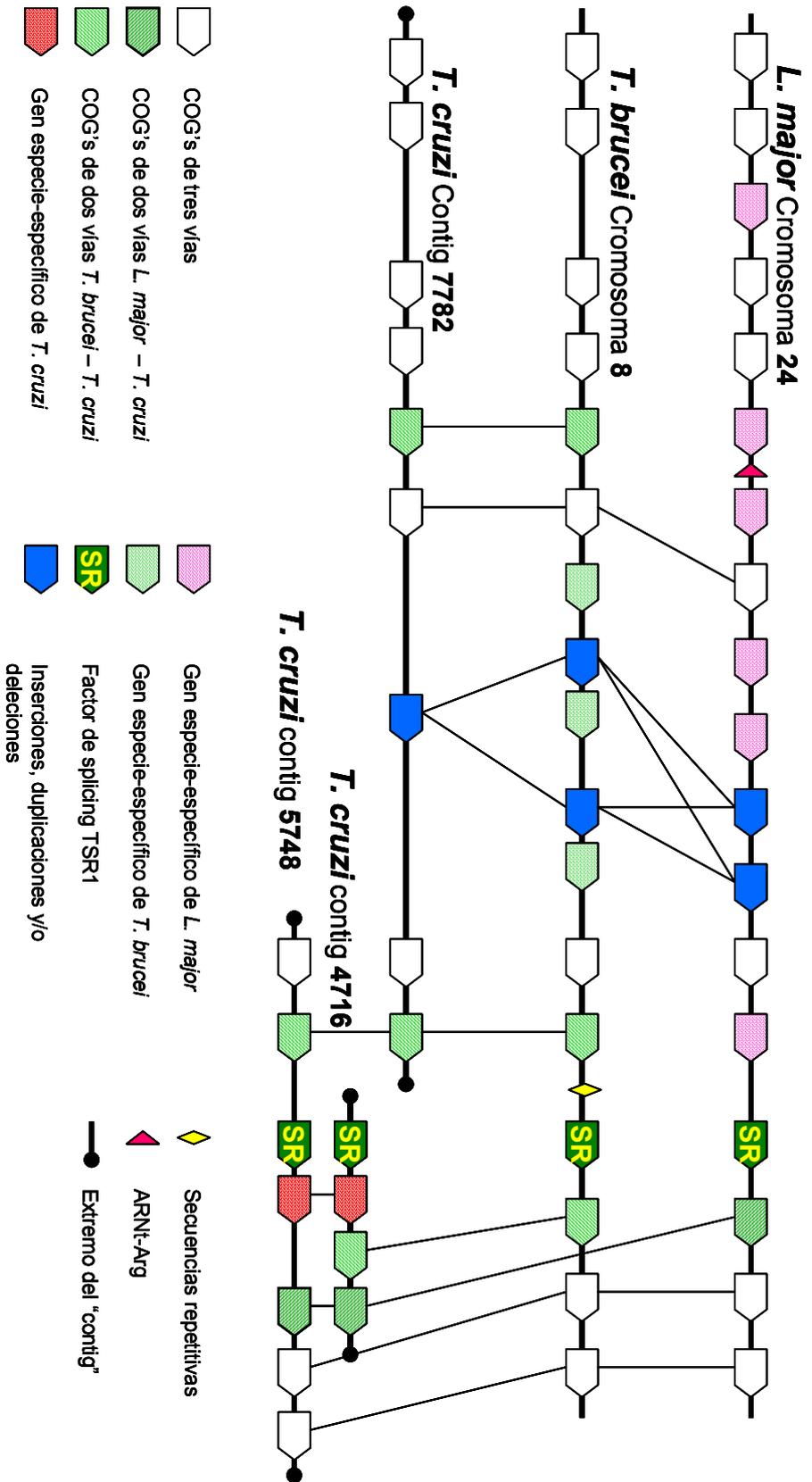


Figura R2. Mapas de Sintenia. Panel superior: Los bloques en el panel de *T. brucei* (izquierda) representan las posiciones indicadas en los bloques sinténicos de los 36 cromosomas de *L. major*, los bloques en el panel de *L. major*, representan las posiciones de los bloques sinténicos en los 11 cromosomas de *T. brucei*. Cada bloque se denomina con una doble nomenclatura que refiere a la localización cromosómica del bloque correspondiente en la otra especie. Los números en la izquierda del margen de los bloques indican el número de bloque en el genoma de referencia, y los números dentro refieren a la localización en el otro genoma. En verde se destacan los bloques Tb 8.1 y Lm7.3 **Panel inferior:** Detalles del mapa físico del cromosoma 8 de *T. brucei* apareado a los cromosomas y contigs que presentan bloques sinténicos, de *L. major* y *T. cruzi*. **Figura R3:** Página siguiente



Esquema del mapa sinténico para la región de TSRI. Este diagrama está basado en los datos provistos por los proyectos genomas, sin respetar la escala en función de los tamaños de los genes, así como de las regiones intergénicas. Los COG's de tres vias están representados por bloques sólidos los de dos vias por bloques rayados y los genes especie-específicos bloques puntuados. Los números de acceso brindados son para *T. brucei* con excepción de los COG's de dos vias de *T. cruzi* y *L. major* y los genes especie-específicos. Los números de acceso son de izquierda a derecha los siguientes: Tb927.8.1030, Tb927.8.1020 (Fructosa-2,6-bi-fosfatasa), Tb927.8.1010, Tb927.8.1000, Tb927.8.990, Tb927.8.980 (N-acetilglucosamina-fosfato mutasa, putativa), Tb927.8.970, Tb927.8.960, Tb927.8.950, Tb927.8.940, Tb927.8.930, Tb927.8.920, Tb927.8.910, Tb927.8.900 (**TSRI**), Tb927.8.890, Tb927.8.880, Tb927.8.870. COG's *L. major* - *T. cruzi*: LmjF07.0880 - Tc00.1047053509607.50 (Proteína Quinasa Ser/Tre, Tipo Mapkk). Para los genes específicos de *L. major* son: LmjF07.0770 (Proteína tipo Chaperona DnaJ), LmjF07.0800 (Flavoproteína - subunidad), LmjF07.0802, LmjF07.0810 (proteína tipo citocromo b5), LmjF07.0820, LmjF07.0860. Para el gen específico de *T. cruzi*: Tc00.1047053503715.20 - Tc00.1047053509607.40 (Proteína hipotética)

3. Estudios de la actividad de TSR1 en *Schizosaccharomyces pombe*.

Quisimos caracterizar a TSR1 como una proteína SR genuina. Para ello faltaba estudiar la actividad de TSR1 en reacciones de splicing, y decidimos utilizar un sistema *in vivo*, en el que pudiéramos evaluar y comparar de una forma rápida y sencilla la actividad de distintas proteínas SR mediante la observación de un fenotipo en particular. Utilizamos la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, en la que existen varios fenotipos asociados a problemas en el procesamiento de ARNm (Potashkin, 1998; Fantes, 1989) y en la que este procesamiento se realiza de manera similar a la de eucariotas superiores, razón por la cual ha sido utilizada como modelo para el estudio del mismo.

A su vez este sistema ya lo habíamos utilizado en la caracterización de ASF/SF2 y TcSR (Portal, 2003). La intención de esta serie de experimentos es comprobar que TSR1 es funcional y que su actividad está enmarcada dentro del "SR-network". La levadura nos permite utilizar cepas mutantes y con este "background" genético, analizar los distintos fenotipos producidos por la expresión de TSR1. Los experimentos que siguen han sido realizados en paralelo con la proteína TcSR de *Trypanosoma cruzi*, incluida principalmente a modo de control positivo.

3.1.- Sobre-expresión de TSR1 en la cepa salvaje 1913, de *S. pombe*.

La levadura de fisión *S. pombe*, tiene un ciclo de vida relativamente sencillo. La figura R4 muestra un esquema del ciclo de vida de la levadura. 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 "checkpoint" de G₂ a M (ver figura R4), 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 R4).

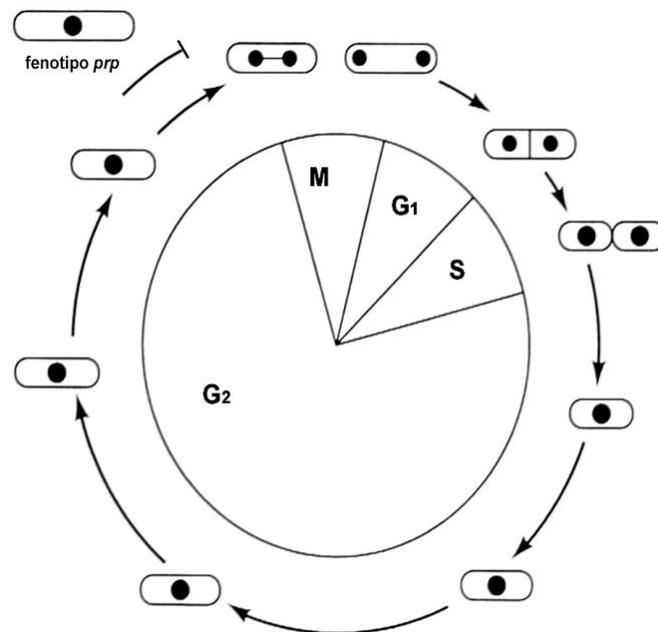


Figura R4. Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*. Se muestra un esquema del ciclo de vida de la levadura, en el ciclo haploide. La levadura crece elongándose en el eje longitudinal. Al entrar en la fase G₁, comienza la citocinesis, que dará lugar a las dos células hijas. Interrupciones del ciclo 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).

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 *tsr1*, *tcsr*, y la versión mutante carente de dominio RS, *tsr1Δrs*. 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 R3 muestra los resultados obtenidos con distintas cepas. Las primeras 4 líneas muestran los resultados obtenidos en la cepa salvaje 1913, al sobre-expresar el control negativo hecho con el vector sin inserto, TcSR, TSR1 y TSR1ΔRS. Puede verse que el largo

celular aumentó al expresar TcSR y TSR1, mientras que TSR1 Δ RS no produjo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$, ANOVA). Los resultados de TSR1 Δ RS eran esperados, basados en los resultados obtenidos previamente para TcSR Δ RS, donde el dominio RS es necesario para interacciones proteína-proteína y proteína-RNA.

Transformante	Cepa	Largo celular promedio (μm) \pm SEM	n
pREP1/-	1913 (wt)	7.40 \pm 0.21	110
pREP1/TSR1	1913 (wt)	8.95 \pm 0.29 (*)	109
pREP1/TSR1 Δ RS	1913 (wt)	8.33 \pm 0.22	114
pREP1/TcSR	1913 (wt)	9.01 \pm 0.29 (*)	117
pREP1/-	2A5 (Δ kic1)	5.24 \pm 0.27	69
pREP1/TSR1	2A5 (Δ kic1)	6.11 \pm 0.23	122
pREP1/TcSR	2A5 (Δ kic1)	5.30 \pm 0.22	78
pREP1/-	B8 (Δ dsk1)	4.56 \pm 0.14	95
pREP1/TSR1	B8 (Δ dsk1)	5.91 \pm 0.17 (*)	102
pREP1/TcSR	B8 (Δ dsk1)	5.95 \pm 0.30 (*)	79

Tabla R3. Efecto en el largo celular al sobre-expresar TSR1 (y otras proteínas SR y mutantes) en diferentes cepas de *Schizosaccharomyces pombe*. Se transfectaron TSR1, TSR1 Δ RS o TcSR en diferentes cepas de *S. pombe* (TSR1 Δ RS, se transfectó exclusivamente en la cepa salvaje 1913). Luego de 20-25 hs en condiciones desreprimidas, cosechamos, fijamos las células y medimos los largos celulares. Las significancias estadísticas se calcularon para cada cepa, de manera independiente. El n, es el número total de células medidas en 3 experimentos independientes. Los largos se indican en $\mu\text{m} \pm$ la media del error estándar (SEM).

Anteriormente habíamos reportado que la sobre-expresión de ASF/SF2 Δ RS induce el arresto celular en este mismo sistema, no así TcSR Δ RS (Portal, 2003). ASF/SF2 Δ RS es capaz de inducir la inclusión de un exón *in vitro* (Hastings, 2001; Zhu, 2000), siendo atribuible 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. Así mismo están comprobadas las funciones independientes del dominio RS como antagonistas de los inhibidores de splicing unidos a los silenciadores de splicing exónicos (ESS) interrumpiendo el efecto de estos factores. De cualquier forma, no parece ser el caso para TSR1, donde aunque puede verse una leve

tendencia hacia un aumento en el largo celular, no llega a ser significativa, estadísticamente (ver Tabla R3 y figura R5).

Cuando se grafica el porcentaje de células en función del largo celular, se observa que TcSR y TSR1 tienen una distribución similar, sugiriendo que ambas están actuando de forma similar.

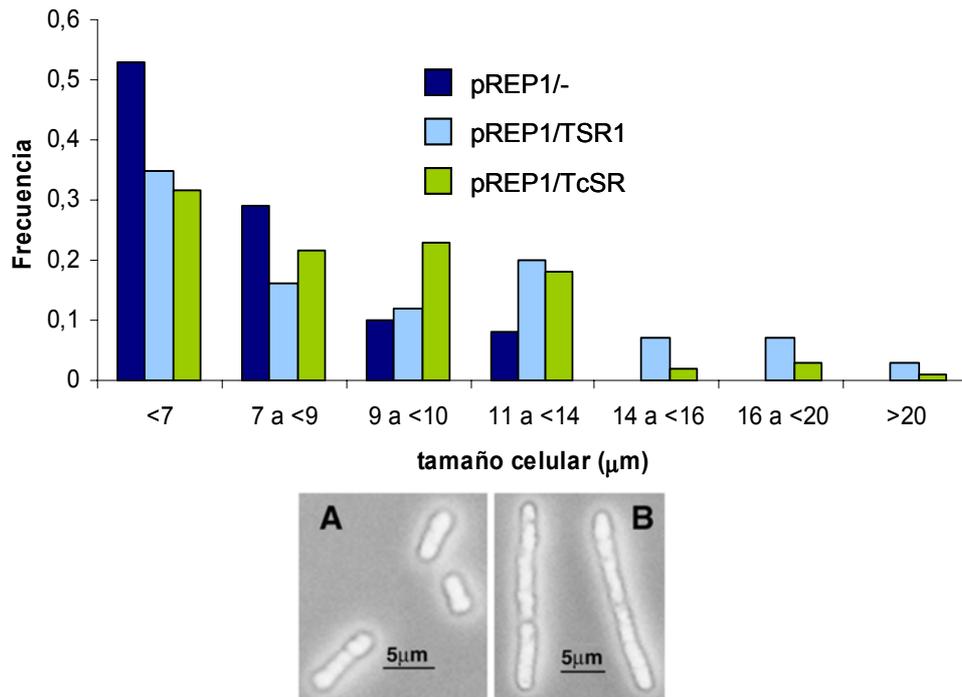


Figura R5. Distribución de frecuencias del tamaño celular de células de *S pombe* (cepa 1913) sobre-expresando TcSR o TSR1. Panel superior. La sobre-expresión de TSR1 muestra un patrón prácticamente idéntico al de la sobre-expresión de la proteína SR de *T. cruzi*. Se observa claramente un corrimiento hacia células de gran tamaño, comparado con el control de vector solo, sin inserto. En la leyenda se indican las construcciones utilizadas. **Panel inferior.** Ejemplos de levaduras elongadas al sobre-expresar una SR de trypanosmátidos (B) en comparación al control (A). 400X.

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

Para demostrar que la actividad "elongadora" de TSR1 es producto de una interacción entre dicha proteína 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 2A5 ($\Delta kic1$) (Tang, 2000) en la que se ha deletado el gen que codifica para la quinasa de proteínas SR de la familia Clk/Sty en *S. pombe* (ver Introducción), no produce el fenotipo elongado, mientras que la sobre-expresión de TSR1 en la cepa B8 ($\Delta dsk1$) (Tang, 2000), en la que ha sido deletado el gen de la quinasa de proteínas SR de la familia SRPK (ver Introducción), sí produce elongación (Tabla R3).

Nuevamente como control positivo de esta interacción se transfectó TcSR en paralelo. Estos resultados sugieren que ambas proteínas SR actúan a través de quinasas de proteínas específicas, en particular las de la familia SRPK. Este resultado era esperado ya que existen quinasas de proteínas SR que interactúan específicamente con estas proteínas, y constituyen un "SR-Network" básico en tripanosomátidos. Del estudio de estas quinasas nos ocuparemos en la siguiente parte de "Resultados". (Ver Parte II).

3.3.- Sobre-expresión de TSR1 en la cepa mutante doble 2D4, de *S. pombe*.

Para confirmar que TSR1 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 y TcSR funcionan en el marco de dicho network. Varios trabajos han demostrado que estas proteínas son fosforiladas 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 (Δ dsk1, Δ kic1, Tang, 2000), que tiene la particularidad de prácticamente no crecer en medio mínimo, pero que al ser complementadas con proteínas SR o las quinasas específicas de estas se restituye el crecimiento de una manera normal. El experimento planteado, entonces, es el rescate del crecimiento de esta cepa, mediante la transformación de dicha cepa con las proteínas SR de tripanosomátidos. Como se ve en la figura R6, la expresión de TcSR y TSR1 reestablecen el crecimiento en medio mínimo EMM2, indicando que han podido complementar la falta de las quinasas. Estos resultados sugieren que la expresión de TSR1 en la cepa mutante 2D4 es "funcional", mientras que la sobre-expresión en la cepa salvaje, y simple mutantes bloquea el ciclo celular.

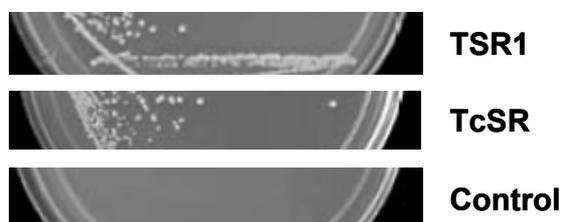


Figura R6. TSR1 rescata el fenotipo de la cepa mutante 2D4 de *Schizosaccharomyces pombe*. La expresión (no sobre-expresión) de las proteínas SR de tripanosomátidos en la cepa mutante doble 2D4 rescata el fenotipo mutante (formación de microcolonias en medio mínimo EMM2). Como control se utilizó el vector vacío pREP1/-

En conclusión, por primera vez se aportan evidencias funcionales de la proteína TSR1, como una proteína rica en dipéptidos SR genuina.

4.- Estudio de interacción de TcSR con factores auxiliares de la maquinaria de splicing (TcU2AF)

Quisimos estudiar si existe interacción entre TcSR y alguno de los factores de splicing recientemente caracterizados en trypanosomas. Como mencionamos anteriormente en esta tesis, distintos estudios han demostrado que la función de las

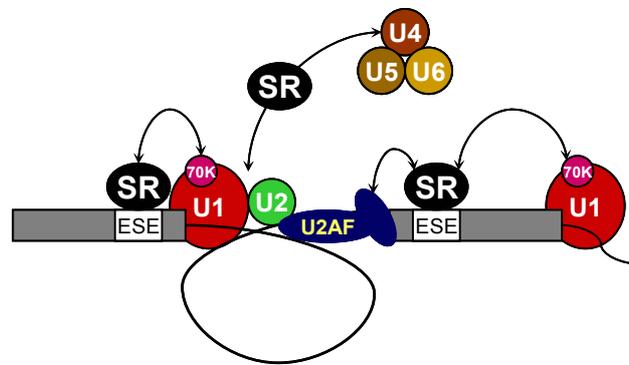


Figura R7. Interacciones de las proteínas SR en el ensamblado del spliceosoma. (A) Definición exónica, junto a U2AF (ovalo azul) en el sitio 3' rio arriba y U1 snRNP (rojo) en el sitio 5' rio abajo, define los exones mediante SRs unidas a los ESEs (Exonic Splicing Enhancer). (B) los sitios 5' y 3' pueden ser superpuestos tempranamente en la reacción de splicing por lo que se conoce como "Intron Bridging" entre las proteínas SR y el dominio RD de U1 70K y U2AF. (C) Las proteínas SR proteins pueden reclutar a U4/U6 U5 tri-snRNP al spliceosoma..

proteínas SR depende de su capacidad para mediar una red de interacciones (Figura R7) entre las proteínas SR y/u otros factores de splicing (Kohtz, 1994, Wu, 1993, Zhang, 1996). TSR1 interactúa con los factores de splicing humanos U2AF35 y U2AF65, que involucra el reconocimiento del sitio 3' y el de ramificación. Esta interacción fue demostrada en un sistema de doble híbrido *lexA* en levaduras (Zervos, 1993). Así mismo interactúa con el SL ARN, con TSR1IP, una proteína homóloga a U1-70, y no se reportó interacción alguna con ella misma. El grupo del Dr. Martín Vázquez estudia los componentes de la maquinaria de procesamiento del pre-ARNm en trypanosmátidos. En colaboración con este grupo, incluimos a TcSR dentro del "interactoma" en estudio y nos centramos en el análisis de la interacción de TcSR versus los factores asociados a U2, TcU2AF35 y TcU2AF65, recientemente caracterizados en *Trypanosoma cruzi* por el grupo antes mencionado.

Se utilizaron dos sistemas de doble híbrido en levaduras basados en *lexA*. El primer sistema que se utilizó fue uno de expresión fuerte. En este sistema solamente ensayamos la interacción TcSR/TcU2AF35 (Figura R8). Esta combinación evidenció una interacción fuerte entre estos dos factores, en función de los análisis para expresión de beta-galactosidasa líquidos (no mostrado). El segundo sistema utilizado fue el Matchmaker, que presenta niveles de expresión más bajos. En este caso analizamos la interacción de TcSR con los dos factores auxiliares de U2. Para la combinación TcSR/TcU2AF35 se obtuvo una interacción suave, mientras que no se registró interacción alguna entre TcSR/TcU2AF65. En este último caso es posible que los niveles de expresión no hayan sido suficientes como para evidenciar la interacción, considerando los resultados reportados para TSR1, donde la interacción con hU2AF35 es 10-15 veces mas fuerte que con hU2AF65.

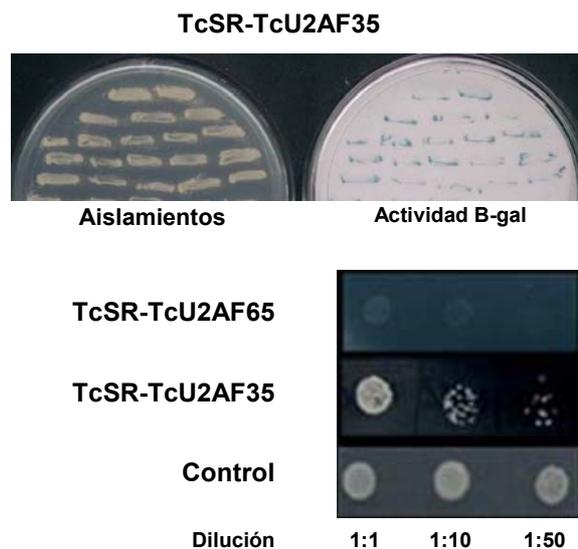


Figura R8. Interacción entre TcSR y TcU2AF en sistema de doble híbrido en levaduras. **Panel superior:** En la placa izquierda se puede ver el crecimiento de aislamientos independientes para esta combinación. La tinción de la placa derecha surge de la actividad beta-galactosidasa e indica la interacción de las proteínas codificadas por los plásmidos, pero no refleja la fuerza de la interacción. Para esto realizamos ensayos cuantitativos líquidos de actividad beta-galactosidasa de varios aislamientos (Luthy, 1992). **Panel inferior** se observa la interacción débil de TcSR con TcU2AF35 y negativa con TcU2AF65, en el sistema Proquest (Invitrogen).

Estos resultados se corresponden con las interacciones reportadas para distintas SR y factores de splicing de U2 del cis-spliceosoma y aportan mas evidencias de la homología de las SR de tripanosomátidos con las SR de la maquinaria de cis-splicing de eucariotas superiores.

5.- Caracterización en Sistemas Homólogos: *T. cruzi* y *T. brucei*

Tomando los resultados de trabajos previos junto a los hasta aquí presentados, podemos afirmar que TcSR es un factor de splicing involucrado en ensayos de splicing constitutivo y alternativo en células HeLa, así como en *S. pombe*. De la misma manera, TSR1 forma parte del metabolismo de procesamiento de pre-ARNm como vimos anteriormente en el sistema de levaduras. A su vez, TSR1 y TcSR son capaces de interactuar con factores de splicing involucrados en el reconocimiento del sitio 3' de splicing (3'ss). Adicionalmente, TSR1 comparte un 61,2% de identidad con TcSR, a lo que se suma la conservación sinténica compartida por los genomas de los tripanosomátidos que forman parte del TryTryps. Posibilitándonos plantear que los resultados de los experimentos con estas proteínas son extrapolables de un organismo a otro.

Todos estos datos nos permiten sugerir que estas proteínas SR estarían involucradas en el procesamiento de pre-ARNm en tripanosomátidos, particularmente en el trans-splicing.

Teniendo una buena caracterización de las proteínas en sistemas heterologos, centramos los esfuerzos en ver la función de estas proteínas en los trypanosomas. Para ello desarrollamos sistemas donde los niveles de expresión de TcSR o TSR1 estuvieran por encima (sobre-expresión) de los endógenos, por debajo (Knock-down) y nulos (Knock-out). Nuestro trabajo en *T. cruzi* se centró en la construcción de líneas estables que sobre-expresasen el marco abierto de lectura (ORF: open reading frame) de TcSR de forma constitutiva tanto en la orientación sentido (sobre-expresión) como en la anti-sentido (silenciamiento, knock-down). La dificultad de realizar Knock-Out por recombinación homologa junto a la imposibilidad de realizar ARN interferencia en *T. cruzi*, nos llevo a establecer líneas similares en *T. brucei*, donde la cantidad de herramientas moleculares desarrolladas y características biológicas del organismo nos brindan mayores posibilidades de estudio. Incluso en *T. brucei*, establecer líneas K.O. y el "tagging" de genes endógenos por recombinación homologa es una mucho mas sencilla y casi 100% eficiente en contraposición a *T. cruzi*.

En resumen, en función de los resultados obtenidos previamente en sistemas heterologos y de las limitantes técnicas, desarrollamos entonces las líneas de parásitos

destinadas principalmente a estudiar la participación de las proteínas SR en el procesamiento de pre-ARNm en trypanosomas.

5.1.- Sobre-expresión y silenciamiento de TcSR en epimastigotes de *T. cruzi*

Como mencionamos anteriormente, el ORF de TcSR fue subclonado en orientación sentido y antisentido, en el vector pTREX-A (figura R9). Este vector posee el promotor ribosomal de *T. cruzi*, que brinda una expresión constitutiva fuerte y el sitio de recombinación para la inserción del vector en el ADN genómico. En forma paralela se transfectan parásitos con la construcción que lleva la secuencia codificante para la

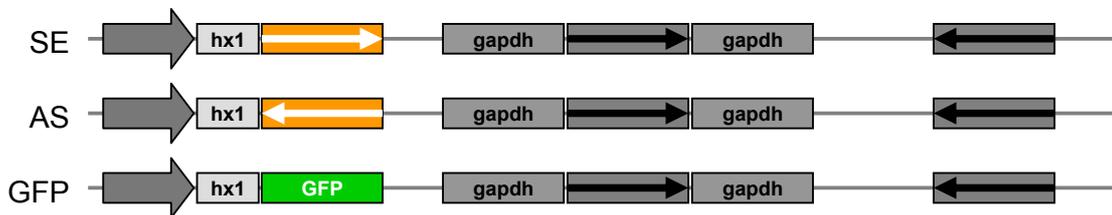


Figura R9. Construcciones transfectadas en epimastigotes de *T. cruzi*. Utilizando el vector pTREX-A, subclonamos bajo el control del promotor ribosomal *T. cruzi* el ORF de TcSR (bloque naranja) en orientación sentido para la sobre-expresión (SE) o antisentido (AS) para el silenciamiento. Las secuencias flanqueantes del gen de gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (gapsh) aportan los sitios necesarios para la poliadenilación del ORF río arriba y el trans-splicing y poli adenilación del marcador de resistencia, neomicina, ubicado entre ellas. pTREX-GFP, lleva la secuencia para la proteína verde fluorescente (GFP) en orientación sentido. Hx1: región de procesamiento.

proteína verde fluorescente (pTREX-GFP). Esta línea se utiliza como indicador para finalizar el periodo de selección, el cual se da por concluido cuando todas las células de esta población son positivas para la señal de GFP al observarse al microscopio de fluorescencia. Una vez transfectados los parásitos y pasado el período de selección, procedimos a corroborar que efectivamente presenten una reducción o aumento considerable en la expresión de TcSR.

Para las líneas **AS** (figura R10), no se obtuvieron descensos de los niveles de ARNm, ni de proteínas. Si bien hoy sabemos que no es posible generar un silenciamiento por RNAi en *T. cruzi*, en los tiempos en que estos experimentos fueron realizados, no habían indicios en contra de este mecanismo de silenciamiento. Independientemente de esto, la expresión de ARN complementarios en *T. cruzi* genera, en algunos casos, descensos en los niveles del ARNm y/o la proteína en cuestión. Sin embargo, no es una técnica que haya demostrado gran efectividad.

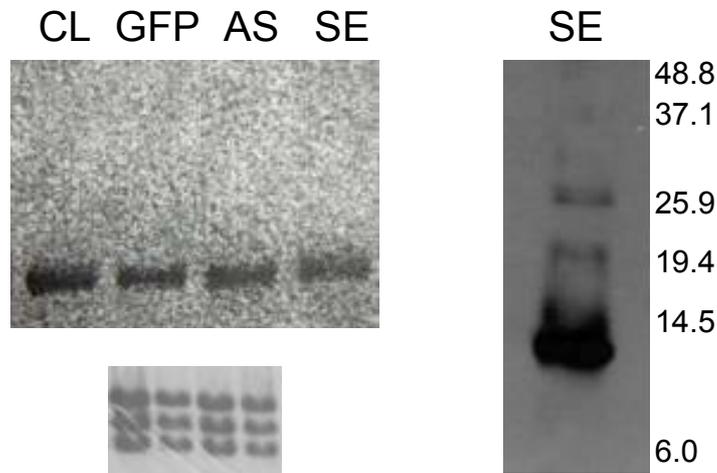


Figura R10. Análisis de control de las líneas AS y SE de TcSR. **Panel izquierdo:** Northern blot realizado a partir de ARN total de epimastigotes de la cepa CL Brenner (CL), y las líneas control (GFP), silenciamiento (AS) y sobreexpresión (SE). Puede verse que no varía la cantidad de ARNm de TcSR. En el panel inferior se observa los ARN ribosomales como control de carga. **Panel derecho:** Western blot de la línea SE seleccionada que expresa la versión truncada de TcSR. Como puede observarse, el peso del polipéptido sobre-expresado es cercano a los 12,5 kDa estimados por la secuencia. En la derecha se destacan los pesos moleculares del marcador utilizado. Anticuerpo 1° Anti-his 1:1000.

En lo que respecta a las líneas de Sobre-expresión (**SE**), posteriormente a la selección de las poblaciones, estudiamos los niveles de expresión de TcSR. Como puede apreciarse en la figura R10, los niveles de ARNm son similares para todas las líneas. Sorpresivamente en el único caso que pudimos obtener una sobre-expresión fue cuando transfectamos con una versión mutada de pTREX-TcSR. En este caso, el transcripto presentaba una mutación que generaba el cambio del residuo aminoacídico E93 por un codón stop prematuro. De esta manera la sobre-expresión de TcSR no se registraba en los Western blots, pero si se observaba una gran señal de bajo peso molecular (12,5 kDa) que coincidía con el polipéptido generado por la versión mutante transfectada. A pesar de que repetimos las transfecciones con las construcciones para TcSR salvaje, nunca logramos seleccionar parásitos que presentasen sobre-expresión de dicha proteína.

Si bien los resultados negativos de estos experimentos no nos brindan mucha información, que el único caso de sobre-expresión obtenido haya sido el de un polipéptido que alcanzaba solo al primer dominio de unión a RNA, nos sugiere que altos niveles de expresión de TcSR pueden ser tóxicos para el parásito. La sobre expresión de proteínas SR en *S. pombe* conduce al arresto del ciclo celular como vimos

anteriormente. Siendo TcSR la única proteína SR descrita en *T. cruzi* y potencialmente involucrada en el procesamiento de pre-ARNm, alteraciones en sus niveles expresión pueden resultar en un desarreglo no solo del procesamiento de pre-ARNm sino del metabolismo celular en general.

5.2.- Depleción, silenciamiento y *tagging* de TSR1 en *Trypanosma brucei*

A fin de determinar el posible rol de TSR1 en trans- y cis-splicing, se siguió con dos estrategias paralelas para disminuir los niveles de TSR1: a) Knock-out y tagging por recombinación homóloga y b) silenciamiento mediante ARN interferencia.

5.2.1.- Modificaciones génicas en el locus de TSR1 en formas procíclicas de *T. brucei*

Sabiendo que TSR1 se encuentra representada en un único locus en *T. brucei*, decidimos desarrollar una línea de parásitos *single* knock-out para TSR1 (+/-) que posteriormente se utilizará para generar la línea knock-out para ambas copias del gen (-/-), o bien para generar las versiones *taggeadas* de TSR1 (tag/-).

Estas modificaciones las realizamos utilizando un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la delección de genes dirigida y la generación de proteínas fusionadas a un epítoto-tag. (Arhin, 2004). El método se basa en metodologías desarrolladas en *S. cerevisiae* e involucra la amplificación por PCR de un casete-selección/reportero utilizando oligonucleótidos que poseen las secuencias flanqueantes específicas al gen blanco. Posteriormente el producto de PCR es transfectado directamente en parásitos procíclicos, y los recombinantes homólogos que llevan el gen blanco delecionado o fusionado al epítoto son identificados. Los casetes utilizados para el *tagging* de proteínas (figura R11) en el extremo amino poseen en dirección 5'→3' (a) un gen de resistencia que sirve como marcador de selección para transfectantes estables; (b) secuencia de la región intergénica que separa los marcos abiertos de lectura de los genes de alfa- y beta-tubulina de *T. brucei* (En *T. brucei*, estas secuencias son necesarias para la poliadenilación del gen de resistencia y el trans-splicing del gen blanco río abajo); (c) un codón de inicio ATG; (d) la secuencia del epítoto. Para los casetes de fusión carboxi-terminales los elementos son los mismos salvo que el orden relativo de los mismos esta invertido y se prescinde del ATG de inicio. A su vez, Los casetes son amplificados utilizando dos oligonucleótidos, Tag-Forward y Tag-Reverse, cada uno de 115 a 130 nt de largo. Para las fusiones amino-

terminales, Tag-Forward es un oligonucleótido compuesto de 90 nucleótidos de la región no traducida 5' (UTR de sus siglas en inglés) del gen de interés inmediatamente río arriba del codón de inicio, más 24-30 nt que aparean con el extremo 5' del casete. Tag-Reverse esta compuesto de 90 nt complementarios a la región codificante inmediatamente río abajo del codón de inicio del gen de interés, más 24-30 nucleótidos apareando el extremo 3' del casete. Tag-reverse esta diseñado de manera tal que la secuencia del epítipo esté en marco con el gen de interés. La secuencia del epítipo está precedida por un codón de inicio agregado al oligonucleótido. De forma similar, Tag-Forward para las fusiones carboxi-terminales esta constituido por aproximadamente 90 nt del extremo 3' del gen de interés (excluyendo el codón stop, y en marco con la secuencia del epítipo), más 24-30 nt que aparean con el extremo 5' del casete. Tag-Reverse posee cerca de 90 nt de la región no traducida 3' inmediatamente río abajo del codón stop, más 24-30 nt complementarios al extremo 3' del casete.

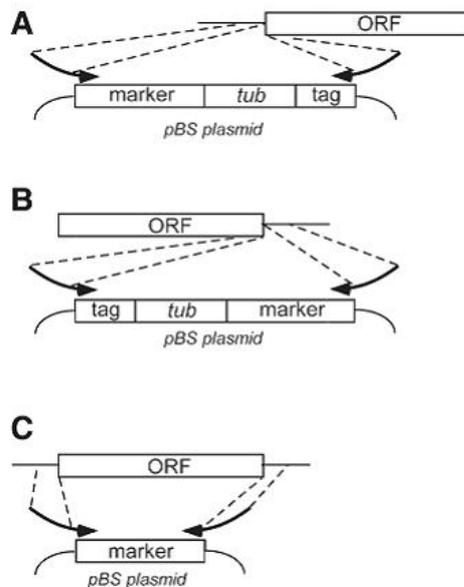


Figura R11. Estrategias para la fusión de epítipes y deleción de genes por recombinación homóloga. (A) Fusión N-terminal. El marcdor de selección (marker) utilizados mas adelante en esta tesis son, NEO, BSR, y HYG que confieren resistencia a G418, blasticidina, e hirgomicina, respectivamente. Los epítipes (tag) utilizados serán BB2 y HA. (B) Fusión C-terminal. El epítipo utilizado en esta tesis es HA, con el marcador de selección BSR. tub, region intergénica de α/β -tubulina. (C) Estrategia de Deleción de genes. Los Oligonucleotidos estan indicados por flechjas gruesas. Los esquemas no son a escala. Tomado de " Parasite Genomics Protocols" Humana Press (2004)

Generar un alelo nulo por delección del ORF, es un método conveniente para el análisis funcional de genes endógenos. En nuestro diseño experimental, un gen de interés es inactivado mediante el reemplazo del ORF con un gen que codifica para un marcador de resistencia, donde el intercambio se produce por recombinación homóloga en el locus cromosomal del gen.

Como describimos anteriormente para la fusión de epítopes, la estrategia se basa en un producto de PCR obtenido oligonucleótidos híbridos. El oligonucleótido forward está compuesto de 90-110 nucleótidos inmediatamente río arriba del ORF a ser reemplazado más 24-30 nucleótidos correspondientes al extremo 5' del gen del marcador de resistencia, mientras que el oligonucleótido reverse está compuesto de 24-30 nt que aparean el extremo 3' del gen de resistencia seguido por 90-110 nt correspondientes a la región inmediatamente por debajo del ORF a ser delecionado.

Para prevenir la aparición de mutaciones originadas por la PCR, es altamente recomendable utilizar una Taq polimerasa de alta fidelidad con actividad "proof-reading" para la amplificación de los casetes a ser insertados en el genoma de *T. brucei*. Para amplificar moldes cuyos extremos son ricos en CG, es recomendable utilizar kits ad-hoc, como el Advantage-GC Kit (BD Clontech)

En el caso de los casetes de fusión de proteínas los transformantes pueden ser identificados mediante Western Blot utilizando el anti-"tag", como anticuerpo primario y verificar así la síntesis del producto de fusión del tamaño esperado.

Sin embargo, este ensayo no puede ser utilizado para el caso de la delección de un gen, y se verifica entonces la integración apropiada del marcador de selección mediante análisis del ADN geonómico por PCR. A tal efecto se diseñan oligonucleótidos complementarios a secuencias por fuera de la región donde la recombinación pudo haber ocurrido, con uno de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia dentro del ORF o a secuencias en el casete de fusión. Cualquiera de las elecciones es válida siempre que uno pueda diferenciar los productos obtenidos.

Para el caso de TSR1 utilizamos los marcadores de resistencia a higromicina (HYG) y blasticidina (BSR) para las delecciones, mientras que usamos el de HYG para la delección y el de BSR-HAn y cHA-BSR para las fusiones del epítope de hemoaglutinina (HA) del virus de influenza (figura R12)

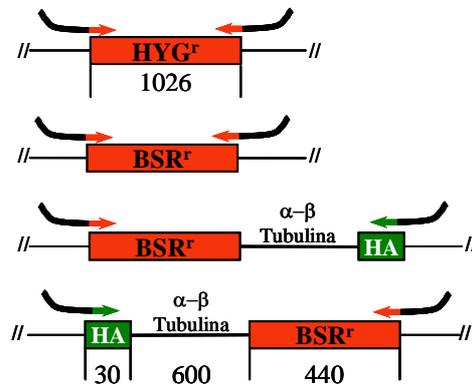


Figura R12. Estrategias para la fusión de epítopes y delección de genes por recombinación homóloga. Los Oligonucleótidos (flechas gruesas), están divididos en dos partes, la punta está representadas en el mismo color de la porción del casete con la que aparea, mientras que la cola negra representa la parte homóloga a las secuencias de *tsr1* o las flanqueantes al mismo. Para las fusiones N-terminal y C-terminal utilizamos el mismo epítope y marcador, HA con el marcador de selección BSR. Los esquemas no son a escala, los números indican el tamaño aproximado de cada módulo en pares de bases.

Una vez que realizamos la transfección de los parásitos procíclicos de la cepa YTat con los productos de PCR y ya seleccionados los transformantes estables procedimos a analizar si el reemplazo o la fusión habían sido correctos. En todos los casos, posteriormente a la selección de las poblaciones se procedió a la selección de clones por el método de diluciones sucesivas.

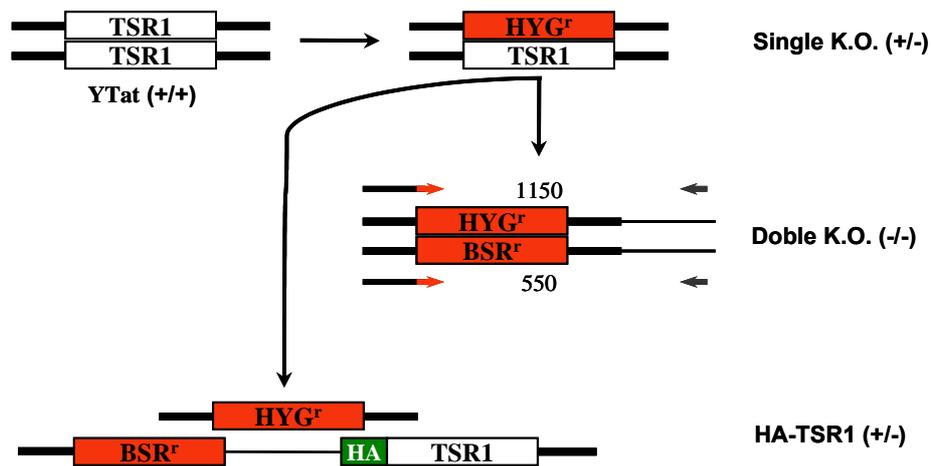


Figura 13. Estrategia de transfecciones para TSR1. Parásitos de la cepa salvaje YTat, son transfectados y se reemplaza la primera copia de un alelo por el marcador BSR. Luego esta línea se utiliza como parental para generar las versiones fusionadas a epítope de TSR1 o bien la línea carente de TSR1, mediante el reemplazo del segundo alelo con el marcador HYG. Los números indican el tamaño de los productos de amplificación para control del reemplazo. Los oligos utilizados son representados por flechas negras pequeñas los oligos "control" y rojas y negras los Tag-Forward.

Como puede observarse en la estrategia descrita en la figura R13, La línea que presenta un alelo de TSR1 deletado, se obtuvo dentro de los plazos esperados. En primera instancia, las células seleccionadas no presentan ninguna diferencia respecto a las células sin transfectar, como veremos mas adelante. Realizamos los controles sobre estos parásitos mediante PCR (figura R14), como mencionamos anteriormente. TSR1 y el casete de higromicina, generan productos de similar tamaño con los oligos utilizados. En vista de esto, aprovechando que sólo HYG presenta un sitio de corte para Nde I, digerimos los productos de amplificación con esta enzima, y posteriormente resolvimos las digestiones en un gel de agarosa. (Fig. R14). Esta nueva línea, denominada single-KO (*tsr1^{+/-}*), es la que utilizamos para transfectar los productos de PCR para deletar el segundo alelo de TSR1, así como de los casetes de fusión de HA.

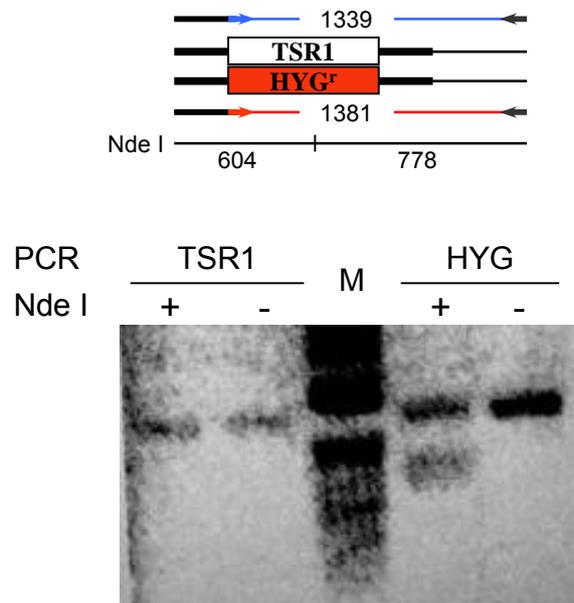


Figura R14 Análisis pro PCR utilizando oligos flanqueantes al gen de TSR1. Utilizando como templado ADN genómico de células donde uno de los alelos del gen fue reemplazado con el casete de HYG. El oligo reverse es el mismo, cambiando el oligo forward según el alelo a amplificar, los productos obtenidos se digirieron o no, con Nde I y resolvieron en un gel de agarosa 1%. M, 1 kb plus DNA ladder

En el caso de la línea doble-KO (-/-), posteriormente a la transfección con el segundo marcador de selección, nunca pudimos obtener poblaciones con ambas copias del gen de TSR1 reemplazadas por los marcadores. Para descartar que este efecto se debiera a un efecto inherente al producto de PCR o al marcador utilizado propiamente,

repetimos las transfecciones varias veces más, con este mismo y otros marcadores de selección. En todos los casos, los intentos por obtener el doble KO fueron fallidos.

La primera línea con un epítipo fusionado a TSR1 (TSR1-HAc) que obtuvimos fue la que presentaba la fusión en el extremo carboxi-terminal. A diferencia de la línea parental, los parásitos TSR1-HA presentaban una tasa de crecimiento reducida (figura R16). Por lo cual descartamos esta línea y transfectamos con el producto de PCR destinado a la fusión en el extremo amino de TSR1. Así establecimos la línea nHA-TSR1 (+/-), cuyas células no presentan diferencias respecto a la línea parental, ni la cepa salvaje. (Figuras R15 y R16)

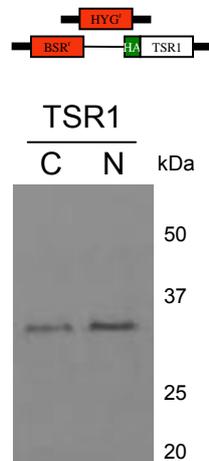


Figura R15. Análisis por Western Blot de las líneas celulares fusionadas de TSR1. Extractos totales preparados de células de las líneas celulares expresando la proteína con fusión C-terminal (C) y la proteína TSR1 con la fusión N-terminal (N) los corrimos en un SDS-PAGE 10%, transferimos a una membrana de PVDF activada e incubados con el anticuerpo monoclonal anti-HA (3F10, Roche)

Todos los clones presentaron un patrón de crecimiento similar, tanto los single-KO como los nHA-TSR1. Tenemos entonces tres resultados generales que apuntan en una misma dirección: Primero, la fusión de un epítipo-tag en el extremo carboxilo de TSR1 puede estar generando una alteración de sus funciones, que repercute negativamente en la tasa de crecimiento, segundo, la imposibilidad de obtener una línea doble Knock-out de TSR1, y finalmente, los resultados de la línea de sobre-expresión en *T. cruzi*, donde solo se obtuvo un producto truncado prematuramente. Todos estos resultados nos permiten sugerir que los genes que codifican para estas proteínas SR en tripanosomátidos son potencialmente esenciales.

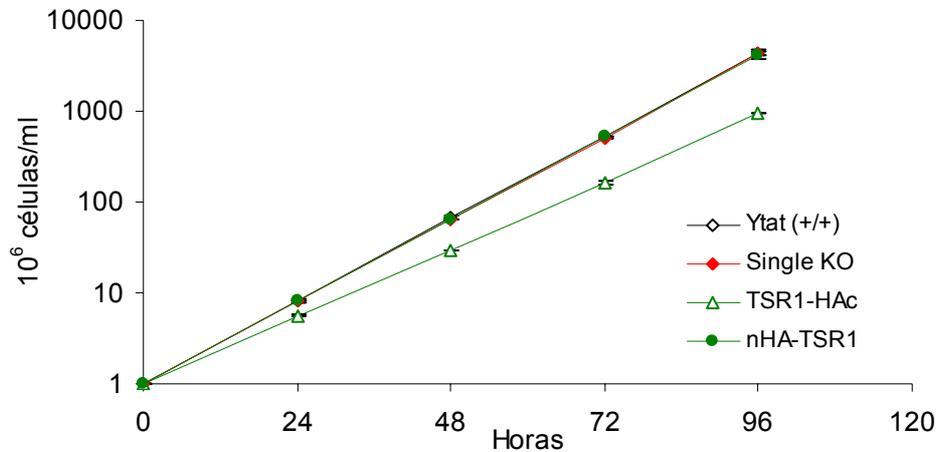


Figura R16. Curva de crecimiento de las líneas celulares fusión y single KO de TSR1. Parásitos procíclicos fueron crecidos durante 6 días, contados en cámara de Neubauer cada 24hs y mantenidos siempre en fase exponencial. Puede verse que la fusión en el extremo carboxi de TSR1 genera una reducción de la tasa de crecimiento.

5.2.2.- Silenciamiento de TSR1 por RNA interferencia.

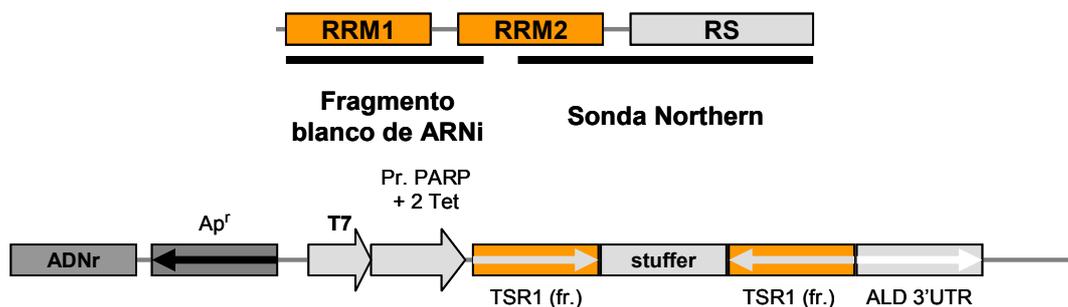


Figura R17. Esquema de la construcción utilizada para el silenciamiento de TSR1. **Panel superior,** esquema de la secuencia de TSR1 donde se aprecian los dominios de unión s a ARN (RRB) y el dominio rico en dipéptido arginina serina (RS), las barras negras representan la porción del gen utilizadas para la construcción detallada debajo y la región utilizada como sonda en los análisis de Northern blot subsecuentes. **Panel inferior,** En el vector pLew100-stuffer, se subclonó en orientación sentido y antisentido la porción del ORF de TSR1 (bloques naranja) indicada en el panel superior. En presencia de tetraciclina, el promotor T7 se libera pudiendo transcribir libremente el ARN que generará la estructura de horquilla gatillando el RNAi. ADNr: secuencia de precombinación en el genoma de *T. brucei*, Ap, resistencia a ampicilina, ALD 3'UTR, región no traducida de la aldolasa de *T. brucei*.

Frente a la imposibilidad de obtener una línea doble-KO para TSR1 y a fin de investigar el posible rol esencial de TSR1 en el procesamiento de pre-ARNm, el gen fue silenciado mediante un sistema inducible de ARN interferencia. Un fragmento del ORF de TSR1 fue clonado en direcciones opuestas en el vector pLEW100-Stuffer (figura R17) y transfectado en parásitos procíclicos de la cepa inducible de *T. brucei* 29-13. Esta construcción genera una estructura de horquilla que desencadena el proceso de ARNi.

El agregado de tetraciclina libera la represión sobre el promotor T7, permitiendo la expresión de la construcción antes mencionada.

Pasado el período de selección y clonado, trabajamos con cuatro clones, que crecimos durante 5 días en presencia o ausencia de tetraciclina. Para evaluar la eficiencia de silenciamiento, purificamos ARN total de estos cultivos y analizamos los niveles de ARNm de TSR1 mediante Northern Blot. Como puede observarse en la figura R18, el ARNm de TSR1 es degradado en presencia de tetraciclina. Debido a que cada clon dio esencialmente el mismo resultado, para los análisis siguientes, sólo los resultados de un clon son utilizados.

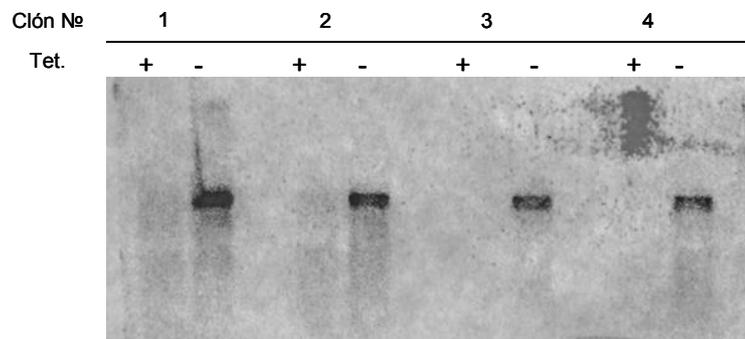


Figura R18. Análisis de Northern blot de la línea celular TSR1 RNAi. ARN total de 4 clones crecidos durante 24hs. en presencia o ausencia de tetraciclina, fue separado en un gel de agarosa 1.2% y analizado mediante Northern blot utilizando una sonda específica de TSR1.

5.2.2.1.- Estudio de los efectos originados en la viabilidad por el silenciamiento de TSR1 parásitos procíclicos de *Trypanosoma brucei*.

A fin de determinar si la reducción de TSR1 influenciará la viabilidad de los parásitos, monitoreamos la tasa de crecimiento de los parásitos TSR1 RNAi cada 24 horas durante seis días consecutivos en presencia de tetraciclina. Si consideramos que hasta el momento TSR1 es la única proteína SR descrita y por lo tanto potencialmente esencial para el procesamiento del pre-ARNm y varios otros procesos, la ausencia de esta originaría severos desarreglos en distintos niveles que desembocarían en la inviabilidad de las células, como vemos en la figura R19. Las células silenciadas muestran un descenso significativo de su tasa de crecimiento, incluso ya a las 48 horas post-inducción (h.p.i.). Este fenotipo de crecimiento lento es acompañado por varios cambios morfológicos que analizaremos mas adelante en esta sección. El efecto de la

depleción de TSR1 es aún mas drástico para el día 5 post-inducción, donde las células silenciadas se encuentran muriendo o ya están muertas.

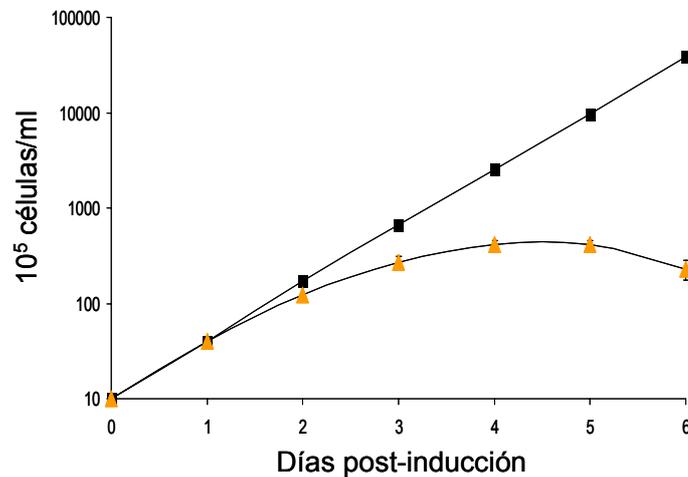


Figura 19. Curva de crecimiento de la línea TSR1 RNAi. TSR1 fue silenciada por ARN interferencia, mediante el agregado de tetraciclina en el medio. Monitoreamos el crecimiento celular en presencia (▲) o ausencia (■) de tetraciclina, contando la cantidad de parásitos cada 24 horas y manteniéndolos constantemente en fase exponencial de crecimiento. Los resultados surgen de 4 experimentos independientes.

De esta manera los resultados obtenidos en sistemas homólogos, nos permiten concluir que TSR1 es un gen esencial para células procíclicas de *Trypanosoma brucei*. Y siendo esta la única proteína SR descrita en este organismo, así como TcSR en *T. cruzi*, muy probablemente, sean factores esenciales en el procesamiento de los pre-ARNm.

5.2.2.2.- Estudio de la TSR1 en el procesamiento del pre-ARNm por trans splicing.

Como recién presentamos, TSR1 es una proteína SR codificada por un gen esencial en *T. brucei*. Siendo la única proteína SR descrita, y en función de la esencialidad de las proteínas SR en el splicing constitutivo en sistemas eucariotes, es lógico pensar que sea esencial para el procesamiento de pre-ARNm en estos parásitos.

Los tripanosomátidos son organismos que llevan a cabo ambas formas de splicing, trans-splicing como proceso general de maduración para todos los mensajeros y cis-splicing para el procesamiento de intrones en casos excepcionales (Mair, 2000). Para examinar si TSR1 esta involucrada en el trans-splicing, analizamos el nivel de SL

ARN, que es uno de los sustratos de trans-splicing, en células TSR1 RNAi silenciadas o no. A tal efecto, realizamos un ensayo de *Primer extension*, utilizando un oligonucleótido complementario a la región intrónica del SL ARN (figura R20). Este ensayo también detecta la estructura intrónica Y, la contraparte de la estructura intrónica “lazo” del cis-splicing. Si se produce alguna alteración inhibitoria en la reacción de trans-splicing, comúnmente se evidencia como una acumulación de los sustratos, en nuestro caso el SL ARN y dependiendo en que punto la reacción se ve afectada, los intermediarios

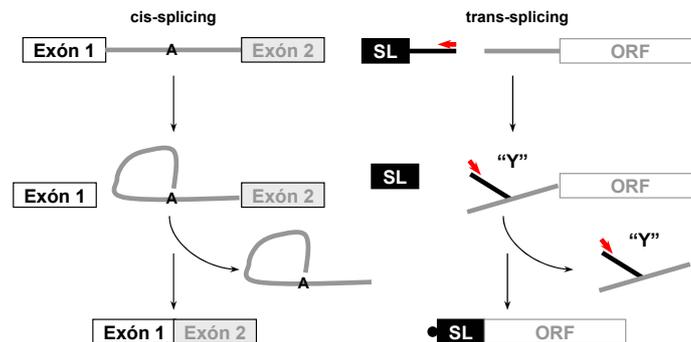


Figura R20. Esquema comparativo de las reacciones de cis- y trans-splicing. La reacción unimolecular de cis-splicing o la bimolecular de trans-splicing pueden ser homologadas compartiendo productos finales y contrapartes intermediarias. El oligo (flecha roja) utilizado en la reacción de primer extensión del mini-intrón del splice leader (SL) detecta el SL inmaduro, así como la estructura intermedia Y (“Y”)

pueden subir o bajar sus niveles, así como también permanecer inalterados, en nuestro caso la estructura “Y”.

Como puede observarse en al figura R21, existe inhibición del trans-splicing en las células TSR1 silenciadas. Esto queda evidenciado por un aumento de los niveles de SL ARN post-inducción de la interferencia, el cual aumenta al doble dentro de las 48 h.p.i. Este efecto se puede observar incluso 12 h.p.i. respecto las células sin inducir. Este incremento de 2,3 veces en la cantidad de SL es comparable a la acumulación detectada en las líneas celulares que poseen silenciados genes del complejo de “*capping*” (Li, 2005). Al mismo tiempo, los niveles de la estructura Y permanecen iguales a los que encontramos en las células sin inducir, indicando que TSR1 estaría involucrada antes del primer paso de trans-esterificación, de acuerdo a lo publicado por Liang (2006).

Este es primer reporte de una proteína SR, TSR1, involucrada en el procesamiento de pre-ARNm en tripanosomátidos. Adicionalmente, esta proteína es esencial para el trans-splicing, incrementando aún mas su importancia al no registrarse redundancia en la representación de este tipo de proteínas en el genoma. Respecto a la sucesión de los efectos observados, cabe destacar que la acumulación (12 h.p.i.) y por consiguiente alteración del trans-splicing precede temporalmente a la reducción de la tasa de crecimiento (figura R19), que se hace evidente a las 48 h.p.i.

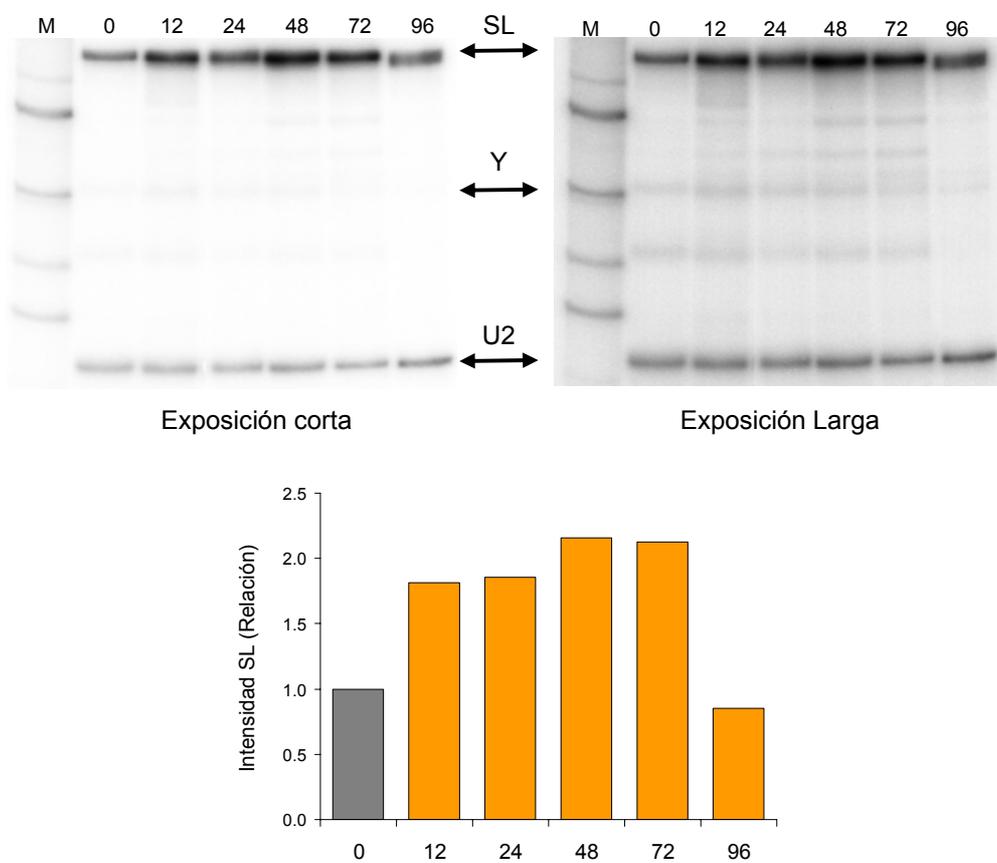


Figura R21. Análisis del proceso de trans-splicing en células TSR1 RNAi silenciadas. Panel superior: Acumulación del SL ARN a causa del silenciamiento de TSR1. El ensayo de "Primer extension" se llevó a cabo para detectar los niveles del SL ARN y la estructura intrónica Y utilizando un oligo que aparea en el intrón del SL ARN. ARN total preparado de células inducidas o no a diferentes tiempos se sometieron a la extensión. Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida 6% - Urea 7M. Como control se determine la cantidad del U2 snRNA. **Panel inferior:** Cuantificación del nivel de SL ARN a distintos tiempos, relativo a las células sin inducir. M, marcador de peso molecular; Y, estructura intrónica Y.

5.2.2.3.- El silenciamiento de TSR1 afecta el cis-splicing del transcripto de la Poli-A Polimerasa

El primer reporte de cis-splicing en tripanosomátidos corresponde al gen de la poli-A polimerasa (PAP), siendo el primer ORF interrumpido por un intrón, caracterizado en tripanosomátidos (Mair, 2000). Para evaluar si TSR1 participa también del cis-splicing en *T. brucei*, realizamos ensayos de RT-PCR sobre el transcripto de PAP. De esta forma analizamos los niveles de precursor de PAP (pre-ARNm), así como de la forma madura (ARNm). Para ello utilizamos distintos juegos de oligonucleótidos que originan productos específicos para cada forma y de tamaños similares (figura R22). Cabe destacar que como es un ensayo semi-cuantitativo es necesario establecer el rango de linealidad de los ciclos de amplificación. Una vez obtenidos los productos de amplificación se corren en un gel de agarosa 2-3% y se cuantifica la intensidad de cada banda mediante el software acoplado al equipo de captación de imágenes. Como puede observarse en la figura R22, el silenciamiento de TSR1 reduce el nivel de ARNm maduro. Al mismo tiempo, el nivel de pre-ARNm de PAP se incrementa en los parásitos silenciados. Por lo tanto la falta de TSR1 afecta el proceso de cis-splicing en *T. brucei*.

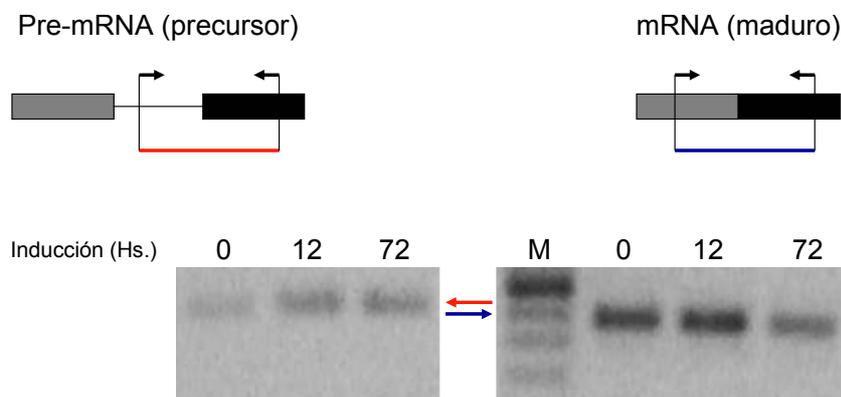


Figura R22. Análisis del proceso de cis-splicing de PAP en células TSR1 RNAi silenciadas. ARN total de células no inducidas o inducidas durante 12 y 72 hs, se sometió a una reacción de transcripción reversa (oligo: poli-T) seguida de una PCR con los juegos de oligos específicos para amplificar el pre-ARNm ó el ARNm maduro del gen de PAP. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa 2% y se cuantificó la intensidad de las bandas. En la izquierda se puede apreciar los productos correspondientes al precursor (rojo) y en la derecha al ARNm maduro.(azul). M marcador de peso molecular.

5.2.3.- Análisis de células TSR1 RNAi silenciadas: su relación con el ciclo celular

Con la idea de estudiar si el fenotipo de crecimiento observado esta restringido a una etapa específica del ciclo celular, monitoreamos el estado del ciclo celular de cultivos inducidos versus no inducidos mediante microscopia y tinción con DAPI para visualizar el núcleo (N) y kinetoplasto (K) de cada célula. En tripanosomas (figura R23), el número de núcleos y kinetoplastos son marcadores del ciclo celular, es decir correlacionan con la etapa en la que se encuentran. En efecto, una configuración un-kinetoplasto un-núcleo (1K1N) representa células en G1/S, las células en estadios tempranos de G2 se identifican con una configuración 2K1N y las células G2/M o mitóticas presentan una configuración 2K2N. De esta manera tomamos muestras de parásitos TSR1 RNAi inducidos cada 24 horas y analizamos las proporciones de células con cada configuración para cada condición.

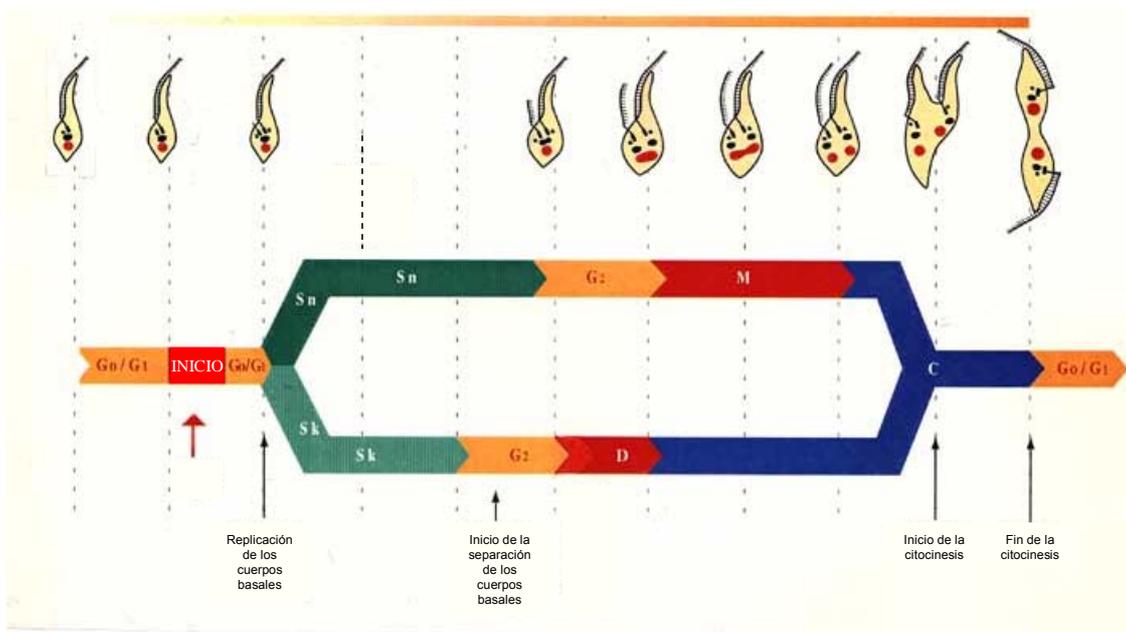


Figura R23. Ciclo celular de *Trypanosoma sp.* Es evidente el desfase entre la duplicación del núcleo (Sn) y el kinetoplasto (Sk), generada primordialmente por la diferencia de duración de la fase S de ambas estructuras. Las flechas indican hitos importantes en el ciclo celular. En la parte superior se grafica el aspecto de las células en las distintas fases del ciclo.

En la figura R24 podemos observar que, 48 h.p.i. no encontramos acumulación de células en una fase específica del ciclo celular, sin embargo hay un incremento significativo en las proporciones de células en etapas tardías del ciclo, así como

también un aumento en células que presentan configuraciones anormales o cariotipos aberrantes. Cuando este mismo análisis se realizó dos días después (96 h.p.i.), la inducción de TSR RNAi resultó en una reducción del 43% de células en G1/S y un 62% de aquellas con configuración 2K1N. Al mismo tiempo, la proporción de células en G2/M aumentó el 250% (2,5 veces). Tal vez una de las observaciones mas curiosas e interesantes encontradas en esta población fue el aumento de casi 40 veces del numero de células exhibiendo configuraciones anormales, múltiple numero de flagelos, núcleos o kinetoplastos y zoides (1K0N), los cuales pueden surgir como consecuencia de un desarreglo de los microtúbulos. (Ploubidou, 1999).

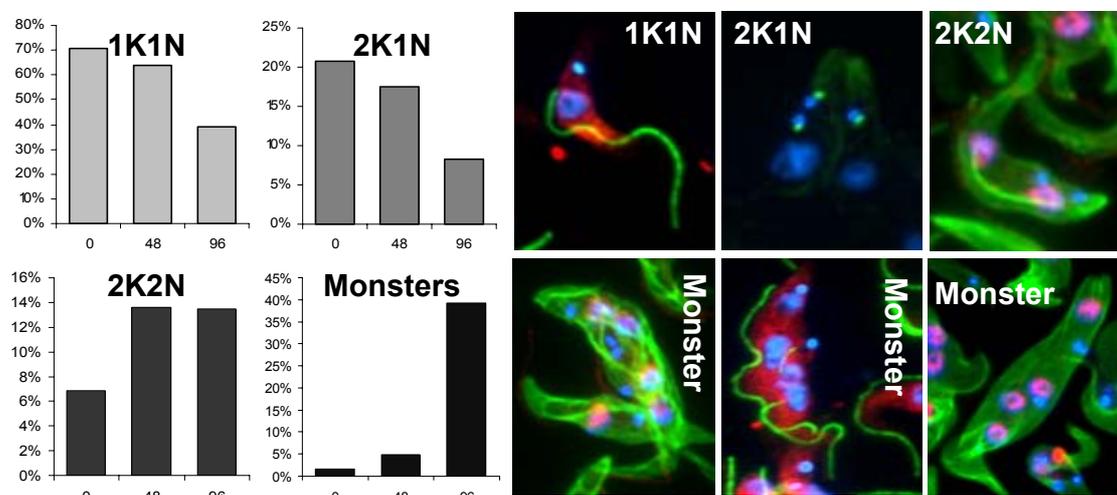


Figura R24. Cariotipificación y características celulares de la línea TSR1 RNAi. Análisis del cariotipo de las células de TSR RNAi antes, 48 y 96 horas después de la inducción con tetraciclina. Los cariotipos representados son 1- kinetoplasto, 1- núcleo, (1K1N); dos-kinetoplastos, un-núcleo (2K1N); dos-kinetoplastos, un-núcleos (2K2N) y "Monster", que representan la suma de células con cariotipos aberrantes, múltiples flagelos, núcleos y/o kinetoplastos y zoides. En la **parte izquierda** se muestra el porcentaje contado de cada cariotipo en 500 células al azar. Panel derecho: Imágenes de los diferentes cariotipos en células TSR1 RNAi inducidas. DAPI y distintos anticuerpos se utilizaron para visualizar las estructuras celulares.

5.2.4.1.- Fenotipos morfológicos inducidos por la falta de TSR1 en *T. brucei*.

Como resultado del silenciamiento de TSR1, las células inducidas presentaban un crecimiento más lento, alteraciones en el ciclo celular y alteraciones morfológicas, evidentes mediante microscopia de contraste de fases. Esto nos llevó a estudiar como puede estar afectando la ausencia de TSR1 la morfología celular, si podría existir una relación entre estas alteraciones morfológicas, las del ciclo celular y la consecuente muerte celular.

Podemos encontrar 4 dimensiones establecidas para la morfología celular de trypanosomas: Extremo anterior – Núcleo, Núcleo – Kinetoplasto, Kinetoplasto – Extremo posterior, y Largo celular. Las células TSR1 RNAi silenciadas exhiben una significativa elongación en el extremo posterior, particularmente en la dimensión comprendida entre el kinetoplasto y el extremo posterior. Esta elongación se asemeja a un fenotipo denominado “Nozzle” (figura R25). El laboratorio del Dr. K. Matthews fue el primero en definir este fenotipo en células procíclicas que sobre-expresaban la proteína TbZFP2 (Hendriks, 2001). así mismo parásitos procíclicos con depleción de la ciclina 2

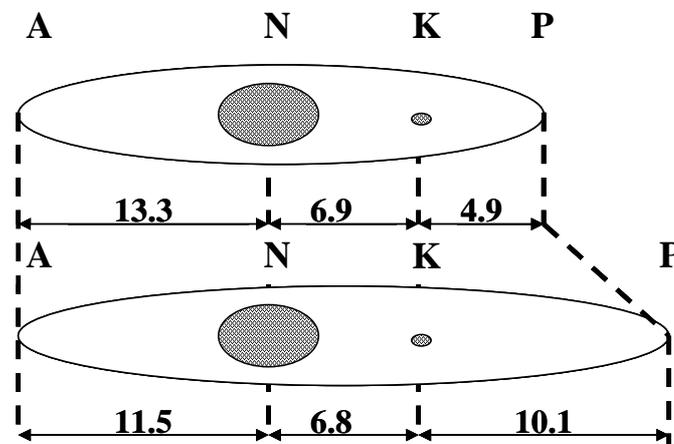


Figura R25. Representación de referencias celulares que definen las dimensiones de células procíclicas. Las dimensiones respectivas para poblaciones de parásitos procíclicos salvajes (Superior) y TSR1 RNAi (Inferior) se exhiben en el esquema. **A**, anterior; **N**, núcleo; **K**, kinetoplasto; **P**, posterior. Las mediciones están expresadas en micrómetros y representan la longitud media de 200 células. Tomado de (Hendriks et al. *EMBO Jour.* Vol. 20 Num. 23)

(CYC2) (Hammarton, 2004) también desarrollan nozzle. Este fenotipo incluye un incremento de la dimensión Kinetoplasto – Extremo Posterior (KP) como consecuencia del crecimiento polarizado en el extremo “+” de los microtúbulos ensamblados (Hendriks, 2001). Esta elongación del extremo posterior puede ser visualizada mediante inmunolocalización con el anticuerpo YL1/2, que reconoce la alfa-tubulina tirosinada presente en los microtúbulos en crecimiento. La tinción observada en parásitos con una morfología normal incluye la presencia de señal en los cuerpos basales, los flagelos en desarrollo y el extremo posterior de la célula. Este patrón es similar al encontrado en células nozzle, pero se encuentra acompañado por una tinción fuerte y brillante en el extremo alargado de la célula.

Entonces, para verificar que los parásitos TSR1 RNAi inducidos, poseen las dimensiones y la extensión de microtúbulos consistentes con el fenotipo Nozzle, se

tomaron muestras de células cada 24 h.p.i. y se midió la dimensión KP en 500 células al azar para cada punto (figura R26). Como control en el análisis se utilizaron parásitos sin inducir.

Los parásitos silenciados presentaron una dimensión KP elongada respecto del control. La longitud media de esta dimensión presenta una correlación directa con la curva de crecimiento, alcanzando 8,3 μm (2.3 veces la longitud media del control). Para definir una célula portadora de nozzle se tomó como referencia la máxima longitud KP registrada en células control. Así, toda célula presentando longitudes por encima de este umbral es considerada “Nozzle”. Más de un 50% de células TSR1 RNAi se encuentran por encima de este umbral.

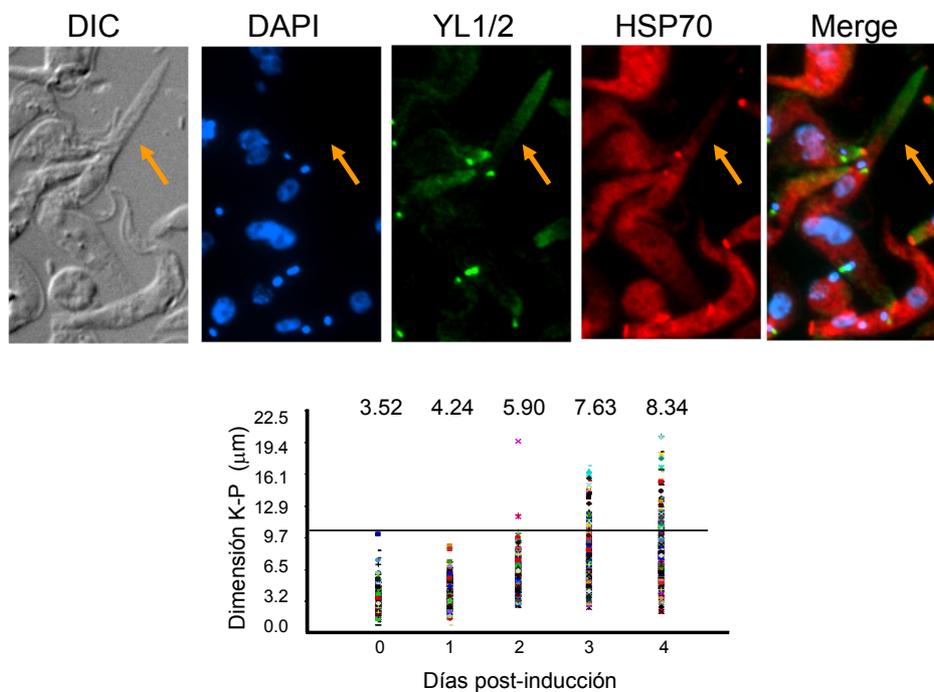


Figura R26. Análisis morfométrico de células TSR1 RNAi inducidas. Panel superior: Imágenes de contraste de fases y Triple tinción de la extensión de relative de la dimension KP en una célula TSR1 RNAi 72 h.p.i. La flecha marca una célula portadora del fenotipo “Nozzle”. **Panel inferior:** Mediciones individuales de la dimension Kinetoplasto-extremo posterior (KP) a diferentes tiempos de inducción. Cada símbolo representa la medida de una célula y 100 células fueron graficadas al azar para cada día. La línea horizontal representa la medida maxima observada en célula sin inducer, y marca la longitud mínima para considerar una célula como “Nozzle”. La longitud media para cada punto se muestran en la parte superior del gráfico. Anticuerpos: ver el texto)

Para profundizar un poco más el análisis, estudiamos si existía algún tipo de correlación entre la etapa del ciclo celular y el nozzle. Para ello recurrimos a una triple tinción mediante la inmunolocalización con anticuerpos anti-HSP70 (marcador

citoplasmático), el YL1/2 y DAPI. Determinamos entonces la presencia de nozzle y su configuración para cada célula. Todas las células clasificadas como nozzle por morfometría, estaban en las etapas tempranas del ciclo celular, presentando configuraciones 1K1N y 2K1N. En la gran mayoría de estas células clasificada morfológicamente, la señal de YL1/2 se localiza en el extremo posterior elongado, confirmando su clasificación. El numero de células clasificado por morfometría no cambio significativamente del determinado por la inmunolocalización con YL1/2. Esto nos indica que hubo una extensión activa de los microtúbulos en esta región de la célula. Junto con estos datos vale la pena mencionar que varias células, independientemente de la fase del ciclo celular, exhiben una localización anormal del kinetoplasto.

En conclusión, estos resultados nos demuestran que las células TSR1 RNAi silenciadas comienzan una reestructuración morfológica, la cual es dependiente de la fase del ciclo celular en la que se encuentren.

5.2.4.2. – Análisis del fenotipo relacionado Paraflagellar Rod

La extensión desregulada de los microtúbulos no se observo para todos los microtúbulos en los casos previos de células nozzle, como ser las CYC2 RNAi. Evidencia de esto es que las células presentaban un flagelo sano y normal posteriormente a la inducción del silenciamiento. Para determinar si el desarrollo del fenotipo nozzle está acompañado por otros fenotipos relacionados con el citoesqueleto en células TSR1 RNAi silenciadas, investigamos si estos parásitos presentaban ó no un flagelo sano. El flagelo de los tripanosomátidos (figura R27) presenta una estructura intraflagelar a lo largo del axonema en un plano determinado, denominada ParaFlagellar Rod (PFR) (Bastin, 1996).

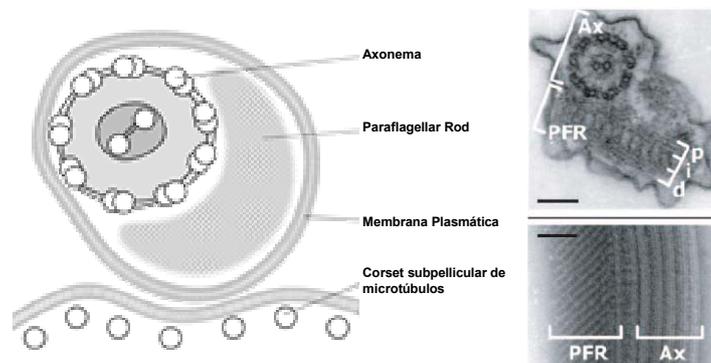


Figura R27. El flagello de trypanosmátidos. En la **parte izquierda** de la figura se observa un esquema de un corte transversal del flagelo, donde destaca la estructura paraflagelar acompañando el axonema a lo largo de todo el flagelo. **Panel superior derecho** Microfotografías por Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del flagelo de *Leishmania sp.*. La posición del axonema (Ax) junto a tres dominios de la PFR – proximal(p), intermedia (i), y distal (d) Escala 200 nm. **Panel inferior derecho** Citoesqueletos montados teñidos negativamente. Nuevamente se indican las estructuras del axonema y PFr. Escala 200 nm.

La estrategia utilizada fue la misma que para el análisis del fenotipo “Nozzle”, una triple tinción pero en vez del anticuerpo YL1/2, utilizamos uno anti-PFR. El patrón de la tinción para células normales y no inducidas es una señal suave y homogénea a lo largo de todo el flagelo. Los flagelos anormales presentan dos características: 1) una señal fuerte que genera una imagen de un flagelo engrosado. 2) una señal heterogéneamente distribuida a lo largo del flagelo, presentando distinta intensidad.

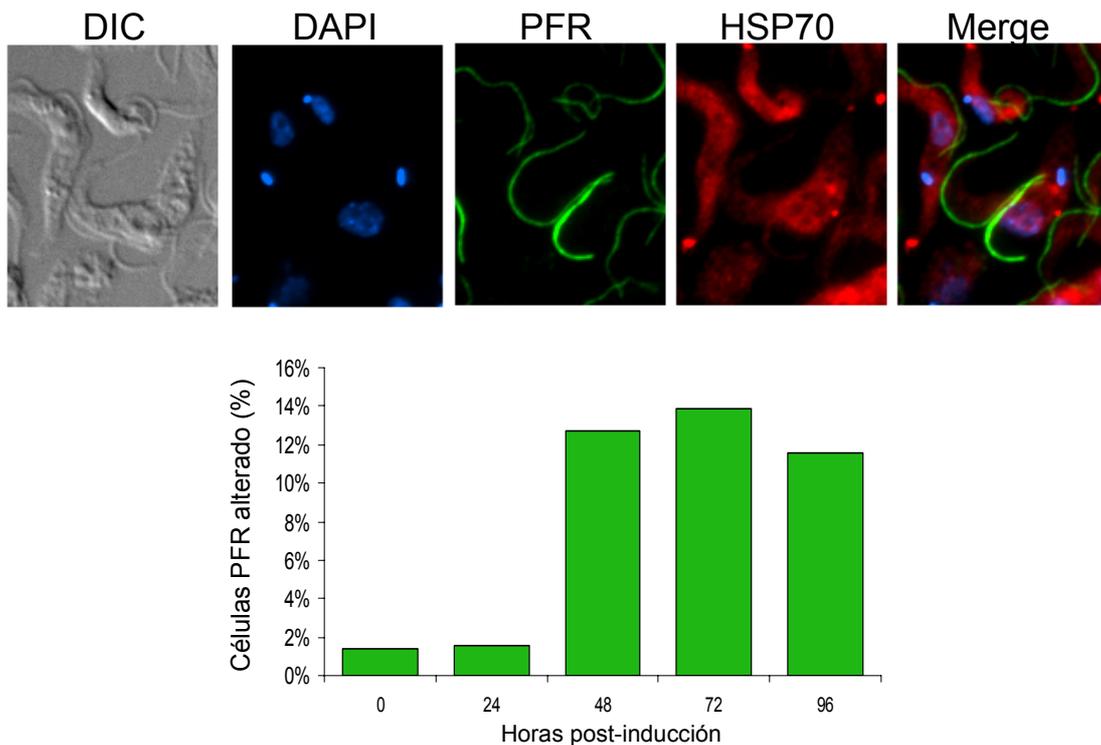


Figura R28. Fenotipo Paraflagellar Rod. **Panel superior:** Imágenes de contraste de fases y triple tinción de una célula con 2 flagelos. La flecha indica el flagelo anormal que presenta una señal heterogéneamente distribuida y mas intensa y un flagelo normal con la tinción característica.. **Panel inferior:** Porcentaje de células que presentan alterada la estructura de su flagelo, en función del tiempo de inducción. Cada barra representa la suma de células con una señal PFR muy fuerte y/o una señal PFR heterogeneamente distribuida a lo largo del flagelo. DIC, contraste; DAPI, 4,6 diamino 2-fenil-indol; PFR, Paraflagellar Rod, HSP70, Heat Shock Protein 70

Mientras que la longitud del flagelo no se vio afectada, el 15% de las células silenciadas presentan una señal PFR anormal 48 h.p.i. (figura R28). Este fenotipo se observó independientemente de si la célula presentaba el fenotipo “Nozzle”, así como también en todas las configuraciones kinetoplasto-núcleo. Cuando analizamos cual era el flagelo afectado, los casos anormales se presentaron en los flagelos nuevos, o sea aquellos en crecimiento. Estas observaciones nos permiten decir que el ensamblado de paraflagellar rod presenta alteraciones a causa del silenciamiento de TSR1. Esto nos permite especular que una alteración generalizada del citoesqueleto tiene lugar en las células carentes de TSR1, y no solo está restringida a los microtúbulos en la región del extremo posterior. .

5.2.4.3.- Distintas alteraciones originadas por la ausencia de TSR1.

A partir de los análisis de microscopia realizados, pudimos registrar otras alteraciones, en las que no centramos nuestros estudios, por lo cual no podemos aseverar que sea un fenotipo particular pero si reflejaban una tendencia en las células silenciadas de TSR1. A partir de ensayos de triple tinción con DAPI, anti-La y anti-REAP (figura R29), observamos que no todos los núcleos presentes en misma célula presentaban señal nuclear para La, así como otros no presentaban tinción con DAPI. Las células estudiadas iban de células en 1K2N a las de cariotipo aberrante polinucleadas. El caso que mas nos llamó la atención fue una célula, en la cual, los núcleos aún se encontraban unidos, pero la tinción con DAPI era bien discreta en un núcleo y la localización de La estaba restringida al otro núcleo. Las flechas indican cada uno de los núcleos por separado y juntos en la fusion final.

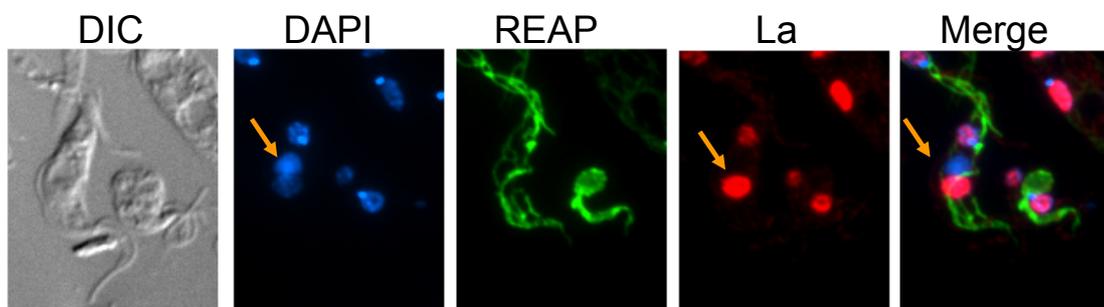


Figura R29. Alteración en la distribución del nucleoplasma y la proteína La. Imagen de contraste de fases y triple tinción de una célula TSR1 RNAi inducida por 48 hs. la imagen se aprecian los 2 núcleos aún unidos, donde uno de ellos presenta casi la totalidad del nucleoplasma mientras que es negativo para la señal de La, mientras que el otro casi no presenta tinción por DAPI, pero si muestra una señal fuerte y nítida para La. Las flechas indican cada uno de los núcleos por separado y juntos en la fusion final.

La segunda cosa que nos llamo la atención, fue el incremento de células que presentaban un patrón de “speckles” en el núcleo, para la tinción con DAPI. Esto es un indicativo de fragmentación del ADN, que se asemeja al visto en la degradación de ADN geonómico inducida por apoptosis. Para el caso de los parásitos TSR1 RNAi silenciados, el porcentaje de células con speckles aumenta 20 veces en 96 h.p.i. respecto al control. (figura 30).

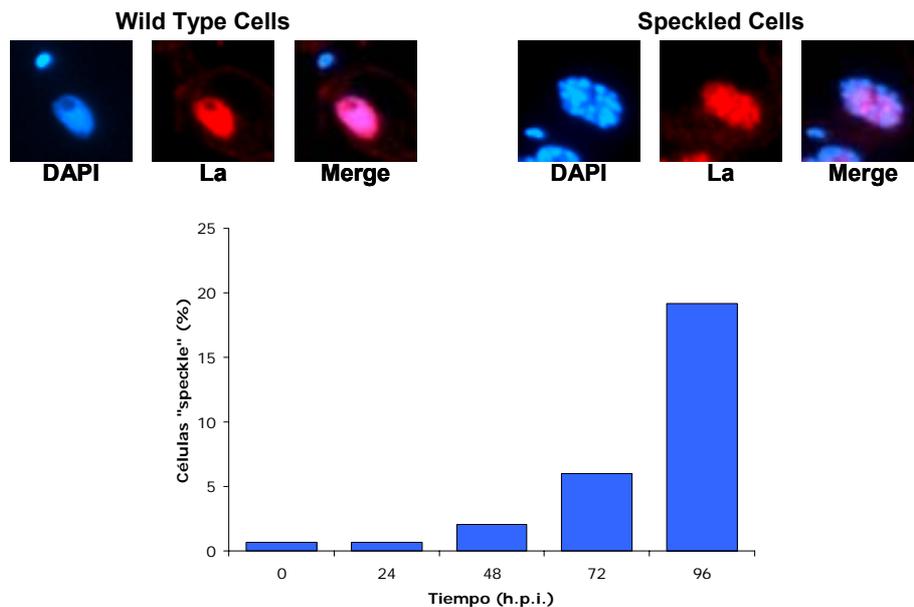


Figura R30. Fragmentación del ADN nuclear en ausencia de TSR1. Panel superior: Imágenes de núcleos normales y “moteados” (speckled) de células TSR1 silenciadas. **Panel inferior:** porcentaje de células TSR1 RNAi con patrón de “speckles” en función del tiempo de inducción. Cada barra representa la suma de células con speckles, relativizadas al número total de células contadas para cada punto.

Recientemente el laboratorio del Dr. J. Manley, describió el arresto en G2/M, seguido de muerte por apoptosis en células de embrión de pollo silenciadas para ASF/SF2. Este fenómeno estaría relacionado con una novedosa función descrita para una proteína SR. ASF/SF2 está involucrada en brindar estabilidad al ADN geonómico de la célula. Ante la falta de esta proteína, el ADN comienza a ser blanco de degradación dirigida y esto desemboca en la muerte celular, sin embargo la falta de ASF/SF2 produce un desbalance en el splicing de ICAD-L e ICAD-S (inhibidor de la DNAsa activada por caspasas), generándose una inhibición de la fragmentación internucleosomal característica de la apoptosis. Como puede verse en la figura R29, a medida que transcurre el tiempo post-inducción del silenciamiento de ASF/SF2, progresa la fragmentación de ADN geonómico en fragmentos de alto peso molecular

(HMWs), con un tamaño promedio de 50 Kb. Esta inestabilidad del ADN, esta íntimamente relacionada con el nexa entre el procesamiento del pre-ARN y la transcripción.

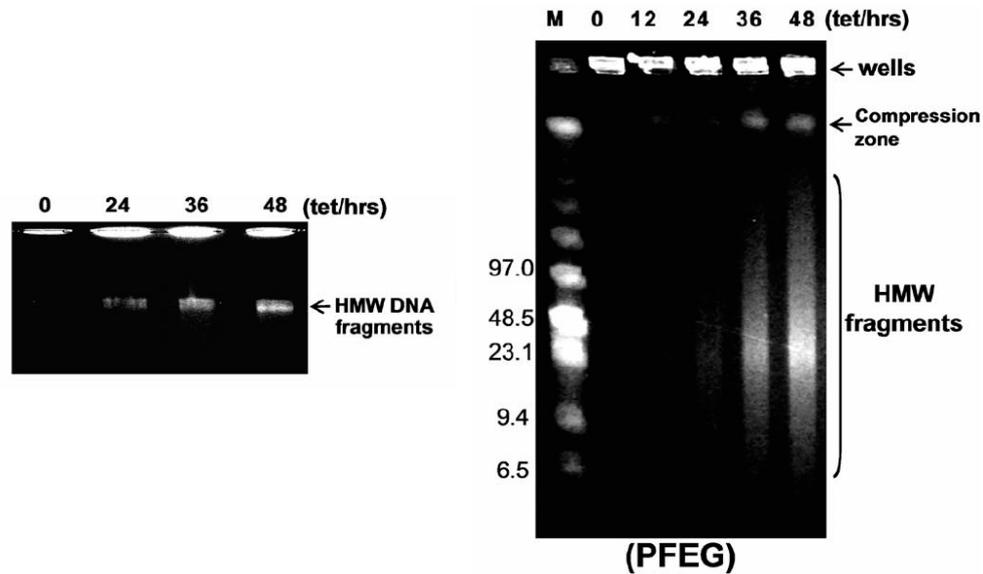


Figura R31. Depleción de ASF/SF2 induce fragmentación en ADN de alto peso molecular (HMW). Análisis de integridad cromosómica de células DT-40 silenciadas a distintos tiempos para ASF/SF2 en gel de agarosa 0,5% (izquierda) y en electroforesis de campos pulsados –PFGE- (derecha). Se aprecia el aumento de los fragmentos de ADN de alto peso molecular (HMW), los cuales se acumulan en una banda nítida en el caso de la agarosa 0,5% compuesta por fragmentos en el rango de 10 a 100 Kpb, como se aprecia en el PFGE. Tomado de “Inactivation of the SR proteins splicing factor ASF/SF” results in genomic instability” Cell, Vol 122, 365, (2005).

Contábamos con 3 líneas celulares ARNi, dirigidas al silenciamiento de proteínas involucradas en la expresión génica, todas con fenotipos letales. Cuando realizamos un análisis comparativo, las células con speckles se encontraban exclusivamente en las TSR1 RNAi, lo que nos sugiere que la ausencia de TSR1 podría estar gatillando eventos de fragmentación del ADN. Con el objetivo de investigar si la falta de TSR1 genera inestabilidad genómica y la consecuente fragmentación del ADN geonómico en fragmentos de alto peso molecular (HMW), tomamos muestras de parásitos cada 24 horas posterior al agregado de tetraciclina y analizamos mediante electroforesis de campos invertidos (FIGE) la integridad del ADN a partir de cromosomas en bloques de agarosa. El razonamiento a seguir es que los cromosomas intactos, no resuelven en un gel de agarosa, mientras que los fragmentos producto de la degradación migarían en el gel viéndose como una banda que incluye los fragmentos de hasta 100 Kb. Esta técnica presenta un inconveniente cuando se trabaja con

tripanosomátidos debido al ADN del kinetoplasto (ADNk), los maxi y minicírculos que poseen entre 5 y 20 Kb, los cuales quedan incluidos en el rango de la banda de alto peso molecular y enmascararían los HMWs (figura R32, panel izquierdo). Para resolver esto, posteriormente a la corrida electroforética transferimos el ADN a una membrana e hibridamos con una sonda específica para un elemento transponible (INGI) distribuido en todo el genoma del parásito. De esta manera un aumento en la fragmentación se evidenciaría como un aumento en la señal de INGI, coincidente con la banda de alto peso molecular. Cuando realizamos esto, no se evidenció ninguna variación en la señal de INGI conforme transcurre el tiempo post-inducción del silenciamiento de TSR1 (figura R32, panel derecho).

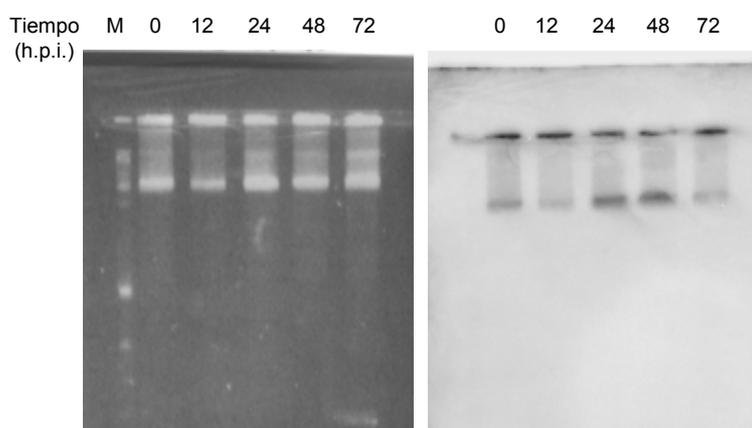


Figura R32. Análisis de inestabilidad cromosómica en células TSR RNAi inducidas. Cromosomas de Células TSR1 RNAi en bloques de agarosa se sometieron a electroforesis de campos invertidos. El gel (izquierda) teñido con bromuro de etidio muestra una fuerte señal en la siembra y en la zona de compresión, no así en el rango esperado para los fragmentos de HMWs. Este gel se transfirió a una membrana la cual se hibridó con la sonda específica para el elemento transponible INGI (derecha). M, marcador de peso molecular de alto rango.

Esto representa que el silenciamiento de TSR1 no genera la inestabilidad cromosómica y la consecuente degradación en fragmentos de alto peso molecular (HMWs) Sin embargo, nuevos intentos deberían realizarse, para confirmar inequívocamente estos resultados. Particularmente conseguir una purificación de ADN geonómico libre de ADNk, para evitar el enmascaramiento no sólo en la visualización mediante tinción con BrEt sino también en la señal inespecífica por unión de la sonda de INGI a este mismo ADN

1. Introducción.

Como mencionamos anteriormente, los resultados obtenidos previos a esta tesis, describieron una “SR-Network”, constituida por una proteína SR y su proteína quinasa asociada (TcSRPK) en *Trypanosoma cruzi*. Sumado a estos hallazgos, también se caracterizó inicialmente a la proteína quinasa homóloga de *Trypanosoma brucei*, TbSRPK. Estas proteínas se catalogaron como miembros de la familia SRPK de proteínas quinasas de proteínas SR, única familia descrita en tripanosomátidos hasta la actualidad, debido a la gran conservación de secuencia con otros organismos y su actividad específica sobre sustratos. Funcionalmente, tienen la capacidad de regular la actividad de TcSR y otras proteínas SR en distintos sistemas de splicing heterólogos: ensayos de splicing constitutivo *in vitro* en extracto de células HeLa, ensayos de splicing alternativo funcional en células HeLa (*in vivo*) y estudio de complementación de levaduras.

Con todos estos antecedentes en esta parte de la tesis presentaremos inicialmente los resultados obtenidos del análisis de los datos del proyecto genoma, para continuar con la caracterización de proteínas mutantes de TcSRPK para el estudio de la conservación de la actividad constitutiva característica de estas quinasas. Posteriormente nos centraremos en el estudio de las SRPKs en el entorno de la biología de los tripanosomátidos, para concluir con el desarrollo inicial de un modelo de estudio de proteínas del SR Network en un sistema homólogo.

2. Arquitectura genómica: Conservación sinténica entre las SRPKs de tripanosomátidos.

Como vimos anteriormente en la parte I.2, los genomas de los tripanosomátidos presentaron un alto nivel de sintenia, relacionado con una fuerte presión de selección para la preservación del orden génico a favor de mantener intactas las unidades direccionales de transcripción. Así las nuevas hipótesis sugieren que un mismo orden génico estaría relacionado con una misma función del producto codificado por dicho gen. Estudiamos entonces si TbSRPK y TcSRPK presentaban esta conservación sinténica. Nuevamente, tomando como referencia el proyecto genoma de *Trypanosoma brucei*, analizamos los datos obtenidos de los genomas de los TryTryps.

Tabla R4. Características generales de los genes de TbSRPK, TcSRPK y LmSRPK. Mpb, Mega pares de bases; pb, pares de bases, § nombres utilizados durante la tesis, aún no actualizados por el curador de GeneDB.

	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>Nombre</i>	TbSRPK§	TcSRPK§	SRPK, putativa
<i>Nombre Sistemático</i>	Tb927.8.900	Tc00.1047053506945.220	LmjF30.3580
<i>Estatus</i>	Rol inferido por homología	Rol inferido por homología	Función inferida por homología
<i>Tamaño</i>	2172 pb	2151 pb.	2244 pb
<i>Cromosoma</i>	6 (1,62 Mpb)		30 (1,4 Mbp)
<i>Localización cromosómica</i>	(1367566-1369737)	Contig 7149	(1352042-1354285)

A diferencia que para las SRs, para las quinasas se registra un COG de tres vías con la salvedad que la proteína de *T. cruzi*, está representada en un solo locus en todo el genoma. Como podemos apreciar en la tabla R4, TbSRPK se encuentra localizada en el cromosoma 6 de *T. brucei* y basándonos en su localización dentro del mismo, se ubica en el bloque sinténico Tb6.6 de la región de cadena complementaria, de los mapas generados por el proyecto genoma de los TryTryps (Figura R33). Este bloque se corresponde con el bloque Lm30.4 de *L. major*, que refiere al cromosoma 30 bloque 4 de dicha especie. Para el caso de TcSRPK, encontramos un único “contig”, estableciendo que es la única copia en el genoma híbrido de dicho organismo.

En la figura R34 puede observarse un esquema simplificado de la conservación del entorno génico para las SRPKs. Es evidente entonces que TbSRPK y TcSRPK pertenecen a un mismo COG de tres vías, junto a LmSRPK, que no había sido reportado hasta el momento. Particularmente, tanto en *T. brucei* y *L. major*, los bloques se corresponden con los extremos cromosómicos, por lo que no nos llama la atención que el contig 8452, encontrado para *T. cruzi*, presente una gran cantidad de pseudogenes. Podemos entonces decir que las SRPKs de los TryTryps están representadas de forma única en cada uno de los genomas, así también en función de la conservación sinténica, estas quinasas llevarían a cabo las mismas funciones en cada uno de los parásitos.

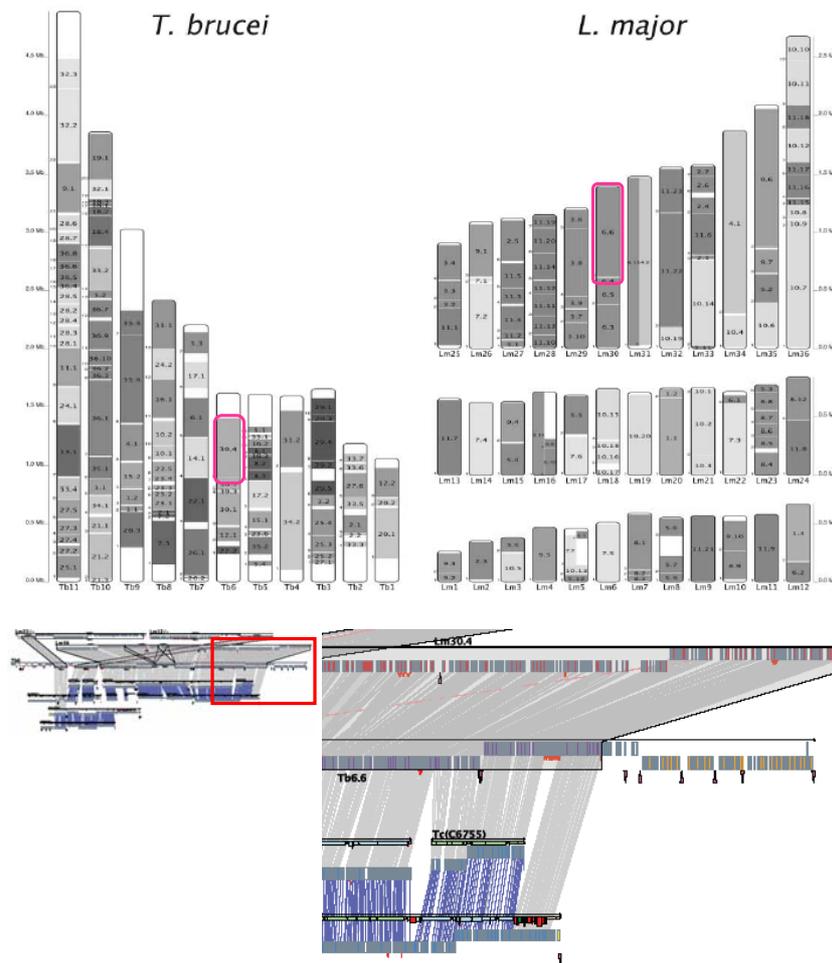
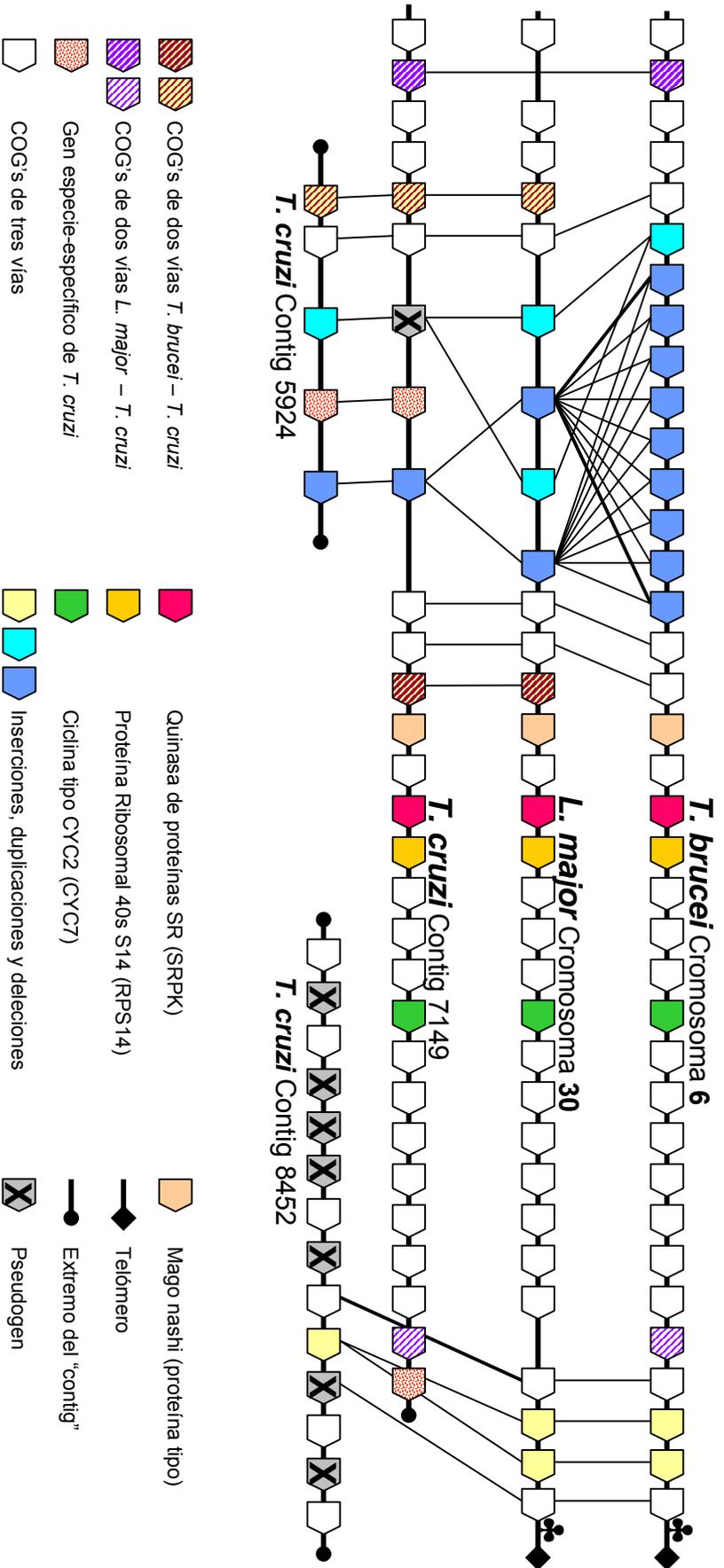


Figura R33. Mapas de Sintenia. Panel superior: Cada bloque se denomina con una doble nomenclatura que refiere a la localización cromosómica del bloque correspondiente en la otra especie. Los números en la izquierda del margen de los bloques indican el número de bloque en el genoma de referencia, y los números dentro refieren a la localización en el otro genoma. En rosa se destacan los bloques Tb6.6 y Lm30.4 **Panel inferior:** Detalles del mapa físico del cromosoma 6 de *T. brucei* apareado a los cromosomas y contigs que presentan bloques sinténicos, de *L. major* y *T. cruzi*. **Figura R34:** Página siguiente

RESULTADOS Parte II



Esquema del mapa sinténico para la región de TbSSRPK. Este diagrama está basado en los datos provistos por los proyectos genomas, sin respetar la escala en función de los tamaños de los genes así como de las regiones intergénicas. Los COG's de tres vías están representados por bloques sólidos salvo los genes especie-específicos de *T. cruzi* de estas representados por bloques ✱ representa las regiones subteloméricas a partir de la cual se encuentran, VSG, ESAG, RHS's (retroposon hot spot protein), elementos transponibles, secuencias asociadas al telómero y repeticiones teloméricas. Los números de acceso brindados son para *T. brucei* con excepción de los COG's de dos vías de *T. cruzi* y *L. major* y los genes especie específicos de *T. cruzi*. Los números de acceso son de izquierda a derecha los siguientes: Tb927.6.4780, Tb927.6.4790, Tb927.6.4800, Tb927.6.4810, Tb927.6.4820, Tb927.6.4830, Tb927.6.4840, Tb927.6.4850, Tb927.6.4860, Tb927.6.4870, Tb927.6.4880, Tb927.6.4890, Tb927.6.4900, Tb927.6.4910, Tb927.6.4920, Tb927.6.4930, Tb927.6.4940, Tb927.6.4950 (Mago nashi), Tb927.6.4960, Tb927.6.4970 (TbSSRPK), Tb927.6.4980 (RPS14: 40S Ribosomal Protein S14), Tb927.6.4990, Tb927.6.5000, Tb927.6.5010, Tb927.6.5020 (CYC7), Tb927.6.5030, Tb927.6.5040, Tb927.6.5050, Tb927.6.5060, Tb927.6.5070, Tb927.6.5080, Tb927.6.5090, Tb927.6.5100, Tb927.6.5110, Tb927.6.5120, Tb927.6.5130, Tb927.6.5140. COG's *T. cruzi*-*L. major*: LmjF30.3470 - Tc00.1047053506945.110 (caseinquinasa 1 isoforma 2), LmjF30.3550 - Tc00.1047053506945.190 (citocromo p450-like). Los genes específicos de *T. cruzi* son Tc00.1047053506945.90 y Tc00.1047053506945.359 (Proteína de unión a ADN dañado)

3. Estudio de la conservación de la actividad constitutiva de las SRPKs de tripanosomátidos.

Una de las características más sobresalientes de la familia de proteínas SRPK, 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. Este parece ser el caso de TcSRPK y TbSRPK. (ver mas abajo).

Previamente habíamos comprobado que tanto TcSRPK, como TbSRPK, recombinantes al ser expresadas y purificadas de sistemas bacterianos eran constitutivamente activas. En función de los resultados publicados por Nolen et al. (2001) para el mecanismo de activación constitutiva de estas proteínas, nos resultó interesante estudiar si este mecanismo estaba conservado en las quinasas de tripanosomátidos, remontándose hasta a los puntos mas tempranos del linaje eucariota. La figura R33 muestra la traducción teórica de la secuencia completa de los genes *tcsrpk* y *tbsrpk* alineados con la SRPK de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sky1p)

3.1.- Análisis de la estructura general proyectada de las SRPKs de tripanosomátidos.

Nolen (2001) 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 (*S. cerevisiae*), entre α C y β 4. Esta inserción interactúa con α C de una forma que permite la interacción de dos residuos altamente conservados Lis 187 en β 3 y Glu 202 en α C. 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 R35), 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 α E interactúa con los residuos asparragina 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.

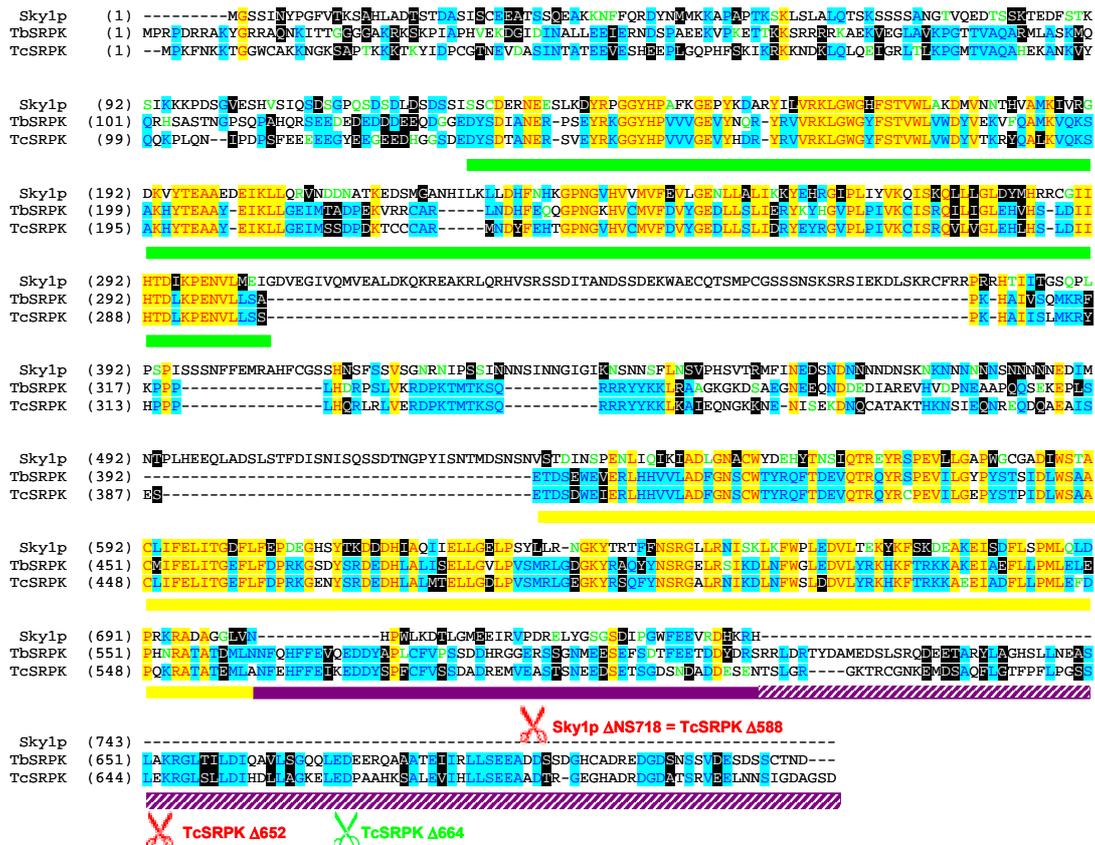


Figura R35. Comparación de secuencias aminoácidas de las SRPKs de *T. cruzi* y *T. brucei* con Sky1p. Las secuencias aminoácidas de *S. cerevisiae*: Sky1p se alinearon con TcSRPK y TbSRPK mediante el programa CLUSTALW. Los aminoácidos conservados se indican en celeste, negro o verde, según su grado de conservación; los cambios, mientras que los idénticos están sombreados con amarillo y letras rojas. Los distintos dominios están indicados por barras de colores: Verde, loop catalítico; amarillo, loop de activación; y violeta, cola C-terminal. Violeta y Blanco, porción de la cola C-terminal exclusiva de tripanosómidos tripanosomátidos. Números de acceso de Sky1p, NP 013943 y YMR216C (GeneDB); TcSRPK AY101382 y Tc00.1047053506945.220 (GeneDB), y TbSRPK Tb927.6.4970 (GeneDB). Los codones prematuros insertados para generar las mutantes están representados por

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.

Ding (2006) presenta el mecanismo de regulación de SRPKs de mamíferos mediado por el dominio espaciador de cada quinasa. La localización citoplasmática de SRPK1 es controlada por varios elementos redundantes en el espaciador, los cuales al ser deletados tienen un efecto mínimo sobre la actividad quinasa, pero causa una translocación significativa de la quinasa al núcleo. Contrariamente a lo reportado previamente donde la presencia de una señal de exportación nuclear (NES) activa en el espaciador de Dsk1 de *S. pombe*, Ding encontró que la distribución celular de SRPK1 está regida por un mecanismo de anclaje dependiente del espaciador en células de mamíferos. La importancia de la localización celular de SRPK1 queda evidenciada cuando durante la interfase se produce una acumulación de factores de splicing inducida por una cantidad excesiva de SRPK1 sin el espaciador en el núcleo. Interesantemente, antes del inicio de la fase M del ciclo celular, la quinasa transloca al núcleo en respuesta a una señal del ciclo celular, indicando que la quinasa podría estar involucrada en la progresión del ciclo celular. Estos resultados sugieren que la familia de quinasas SRPK puede estar funcionando como una clase importante de moléculas señal para la regulación del splicing en eucariotas superiores.

Cuando analizamos la secuencia proteica de TcSRPK y TbSRPK, encontramos una posible señal de exportación, en concordancia con lo reportado para eucariotas inferiores. Las posibles secuencias de exportación nuclear de las quinasas de Tripanosomátidos están en la región espaciadora y son, para TcSRPK: 314- **PPPLHQRLRLVERD**-327 y para TbSRPK: 318- **PPPLHDRPSLVKRD**-331. Cualquiera sea el resultado experimental de esta hipótesis, se considera que la región espaciadora cumple funciones regulatorias, como fueron descritas para mamíferos, pero, amén de

la señal de exportación nuclear NES, nuclear export signal, no se han encontrado otros dominios funcionales.

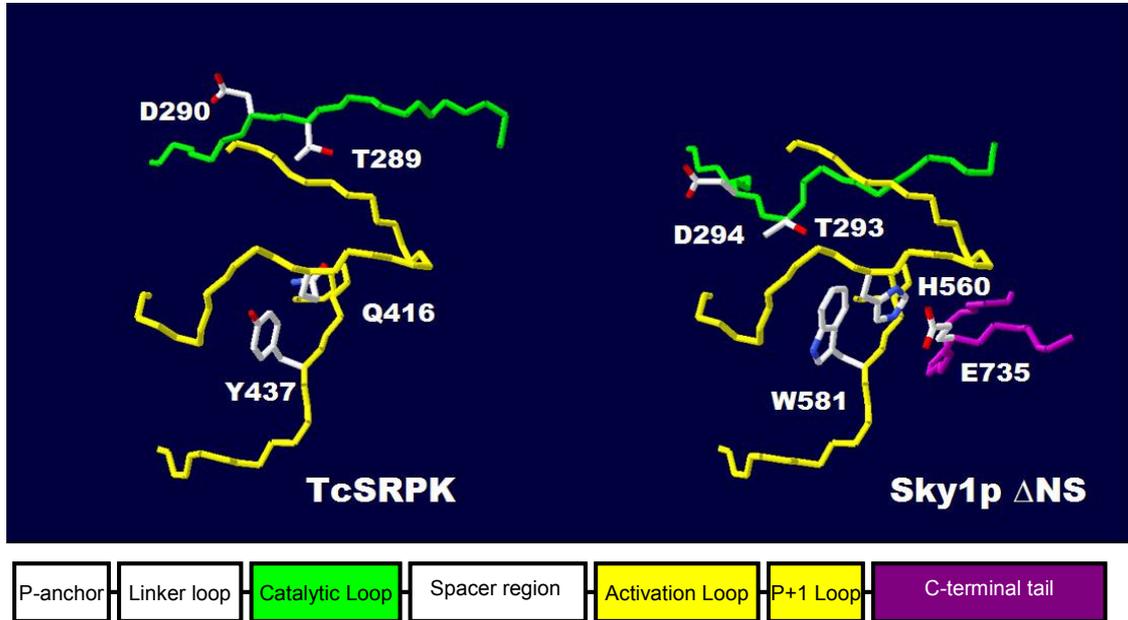


Figura R36. Modelado del Loop de activación y la cola C-terminal de TcSRPK. Panel superior: Realizamos el modelado de TcSRPK utilizando como templado la quinasa de *S. cerevisiae* Sky1p Δ NS, utilizando los servicios del servidor Swiss-Model (software utilizado: ProMod y ProModII). Los residuos correspondientes a la cola C-terminal de TcSRPK no se incluyeron en el modelado por estar por fuera de los parámetros de proyección válida. El loop de activación de Sky1p está trabado en la conformación activa sin requerir la fosforilación del loop. La cola C-terminal de Sky1p interactúa con la punta del loop, estabilizando la conformación activa. Panel inferior: esquema de los dominios de las SRPK. El coloreado es el siguiente, el loop activación/P+1 en amarillo, el loop catalítico en verde y la cola C-terminal en violeta.

Como dijimos, las SRPKs no requieren ser fosforiladas para su actividad, *in vitro*. Para aquellas proteínas que sí 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. Realizamos el modelado de la estructura de TcSRPK (figura R36), tomando como patrón la estructura cristalográfica de Sky1p, para ver si lo que observamos a nivel de secuencia primaria estaba de acuerdo con lo generado por el modelado molecular. Las SRPKs presentan como una forma de activación un residuo treonina característico inmediatamente antes del aspártico catalítico. Este residuo, se encuentra altamente conservado entre las

SRPK incluidas TcSRPK (T289) y TbSRPK (T293). Nolen (2001), 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 serina 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, 425 en TcSRPK y 422 en TbSRPK (Tabla R5). Este aminoácido, junto a otros residuos conservados en el dominio P+1, parece 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 R5. 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. Numeración según Sky1p.

3.2.- Diseño de proteínas mutante de TcSRPK.

En función al análisis de secuencia y estructura, la característica diferencial de las SRPKs de tripanosomátidos es la presencia de una cola c-terminal mucho más larga que el resto de las SRPK estudiadas (figura R37). A fin de analizar a partir de que punto la región no conservada de la cola de TcSRPK es potencialmente esencial para la actividad constitutiva de TcSRPK. Considerando válido el modelo estructural de activación constitutiva (interacción del extremo de esta cola con los residuos del

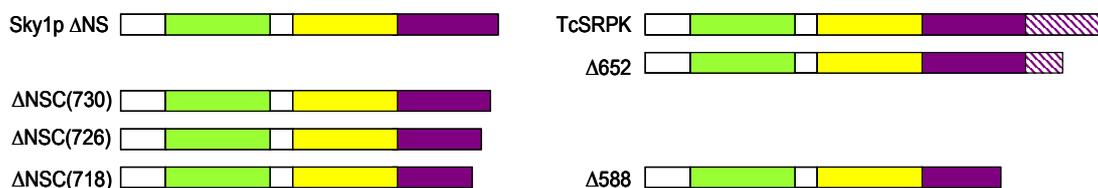


Figura R37 Estructura de las SRPK mutantes. Esquema de las mutantes caracterizadas en *S. cerevisiae* y de las desarrolladas por nosotros en TcSRPK, donde destaca la porción exclusiva de tripanosomátido (rayas violetas y blancas). Las mutantes ubicadas a la misma altura refieren a la mutante delecionada en el residuo homólogo generando una proteína similar. La clave de colores para los dominios es la misma que en la fig. R36

“Activation loop”), generamos mutantes de TcSRPK que presentaban deleciones sucesivas desde el extremo de la cola carboxi terminal. Estas mutantes se generaron mediante PCR, utilizando el mismo oligo forward que para la obtención de TcSRPK salvaje, pero con los oligos reverse presentando mutaciones que generan un codón stop en el ORF de TcSRPK, en distintas posiciones de la cola carboxi terminal. El diseño de estas mutantes se basó en la homología con Sky1p y seleccionamos 3 puntos arbitrarios donde incluir el codón stop prematuro. En dirección amino a carboxi, el primero es el $\Delta 588$, que genera la mutante equivalente a la desarrollada por Nolen (2001) al estar en la región conservada de la cola carboxi terminal. Siguiendo en el mismo orden las mutantes en la región de la cola carboxi terminal exclusiva de tripanosomátidos son $\Delta 652$ y $\Delta 664$. Esta última mutante había demostrado previamente comportarse de manera similar a TcSRPK salvaje (no incluida en la figura R37), tanto en ensayos de actividad quinasa *in vitro*, como en ensayos funcionales *in vivo*. De esta forma esperamos que TcSRPK $\Delta 652$ nos aporte datos acerca de la funcionalidad de la región de la cola carboxi terminal exclusiva de tripanosomátidos.

4.- Estudio de las TcSRPKs mutantes en ensayos de actividad quinasa *in vitro*.

Con la intención de analizar el punto crítico donde TcSRPK pierde su actividad quinasa, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* con las proteínas recombinantes parcialmente purificadas. Para ello utilizamos como sustrato péptidos derivados del dominio RS de TcSR, que previamente habíamos usado en este tipo de ensayos. Analizamos entonces la capacidad de fosforilar los péptidos a dos tiempos distintos, 15 y 30 minutos. Como puede apreciarse en la figura R38, ninguna de las dos mutantes

presenta niveles de actividad quinasa comparables a TcSRPK. Este resultado era el que esperábamos para TcSRPK Δ 588, debido a que genera un fragmento de TcSRPK similar a la quinasa mutante inactiva Sky1p, Δ NSC (718). La mutante TcSRPK Δ 652, presenta una cola carboxi-terminal truncada respecto TcSRPK, pero mas larga que Sky1p Δ NS. Sin embargo, aunque presenta la totalidad de los residuos homólogos a la cola de Sky1p, la actividad quinasa está notoriamente suprimida. Podemos ver que para ambos casos el incremento de la señal de fosforilación a distintos tiempos no varía significativamente.

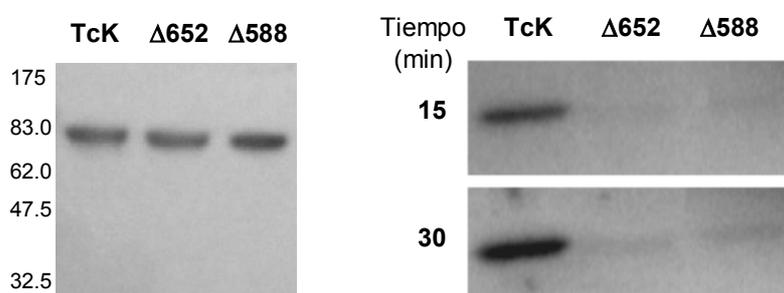


Figura R38. Ensayos de actividad quinasa de TcSRPK salvaje y mutantes. Panel izquierdo, Análisis de western blot de las proteínas recombinantes purificadas utilizadas en los ensayos de actividad (Anti-his 1:1000). Panel derecho: Ensayo de actividad quinasa in vitro TcSRPK (TcK) y las mutantes con la cola truncada se utilizaron para fosforilar péptidos del dominio RS de TcSR durante los tiempos indicados. La delección de 69 (Δ 652) y 132 (Δ 588) logra abolir la actividad quinasa, mientras que la delección de 57 (Δ 664) residuos de la cola C-terminal no afecta la actividad enzimática.

De esta manera podemos afirmar que TcSRPK presenta un mecanismo de activación constitutiva similar al caracterizado para las proteínas de levaduras y mamíferos (Nolen 2001 y Ngo 2005), pero, teniendo en cuenta la mutante inactiva con la cola carboxi-terminal más larga (Δ 652) y la mutante activa con la cola más corta (Δ 664), queda delimitado un fragmento crítico y exclusivo para la actividad constitutiva de la SRPK de *Trypanosoma cruzi*. Este fragmento está compuesto por los residuos 652-LDIHDLLAGKELE-664 de TcSRPK y el fragmento homólogo en *T. brucei* 659-LDIQAVLSGQQLE-671

5.- Estudio de la actividad de TcSRPK Δ 652 y TcSRPK Δ 588 *in vivo* en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

Previamente habíamos utilizado 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 3.1). 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. Y siguiendo esta lógica, nosotros demostramos que TcSRPK y TbSRPK funcionaban de la misma forma.

5.1.- Sobre-expresión de TcSRPK mutantes en la cepa salvaje 1913, de *Schizosaccharomyces pombe*.

En trabajos previos hemos demostrado 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*. Así mismo demostramos que se comportan como verdaderas SRPKs en sistemas *in vivo* y finalmente probamos la conservación de los mecanismos de acción constitutiva para la actividad quinasa de estas proteínas. Contando ahora con las proteínas mutantes, tenemos una herramienta mas para estudiar los efectos de las SRPKs en los sistemas *in vivo*, es decir si los efectos generados se deben a la actividad quinasa de la proteína o bien a interacciones inespecíficas, como la competencia por factores debido a la sobre expresión de estas (efecto dominante negativo).

Para saber entonces si este efecto era atribuible a la actividad de las proteínas quinasa ó bien a interacciones inespecíficas, realizamos el experimento, utilizando las mutantes TcSRPK Δ 652 y TcSRPK Δ 588, inactivas en ensayos de actividad quinasa *in vitro* (Figura R38). Así es que colocamos los genes de *tcsrpk* Δ 652 y *tcsrpk* Δ 588 bajo el control del promotor *nmt1+* en el plásmido de expresión pREP1 (Maudrell, 1993). Luego de 20 a 25 hs en condiciones "no reprimidas", es decir en ausencia de tiamina, se midieron los largos celulares.

La sobre-expresión de cualquiera de estas mutantes no genera un fenotipo elongado en las levaduras (Tabla R6), resultando similares a las células transformadas con el vector vacío. Esto indica que el arresto del ciclo celular producido por la sobre-expresión de TcSRPK, se debe a su actividad quinasa y no a un efecto de dominante negativo.

Transformante	Cepa	Largo celular promedio (μm) \pm SEM	n
pREP1/-	1913 (wt)	7.80 \pm 0.22	199
pREP1/TcSRPK	1913 (wt)	9,41 \pm 0.34 (*)	102
pREP1/TcSRPK Δ 588	1913 (wt)	7,86 \pm 0.22	144
pREP1/TcSRPK Δ 652	1913 (wt)	7,46 \pm 0.20	170
pREP1/-	B8 (Δ dsk1)	6.62 \pm 0.14	98
pREP1/TcSRPK	B8 (Δ dsk1)	9,01 \pm 0.17 (*)	81
pREP1/TcSRPK Δ 588	B8 (Δ dsk1)	6,65 \pm 0.30	99
pREP1/TcSRPK Δ 652	B8 (Δ dsk1)	6,82 \pm 0.30	96

Tabla R6. Efecto en el largo celular al sobre-expresar TcSRPK Δ 588 y TcSRPK Δ 652 en diferentes cepas de *S. pombe*. Se transfectaron TcSRPK, TcSRPK Δ 588 y TcSRPK Δ 652 en diferentes cepas de *S. pombe*. Luego de 20-25 hs en condiciones desreprimidas, cosechamos, fijamos las células y medimos los largos celulares. Las significancias estadísticas se calcularon para cada cepa, de manera independiente. El n, es el número total de células medidas en 3 experimentos independientes. Los largos se indican en $\mu\text{m} \pm$ la media del error estándar (SEM). (* ANOVA $p < 0,05$)

5.2.- Sobre-expresión de TcSRPK mutantes en las cepas mutantes B8 y 2D4, de *Schizosaccharomyces pombe*.

Hemos demostrado entonces que es necesaria la actividad quinasa de TcSRPK para el arresto del ciclo celular en células salvajes. Con este resultado, resulta interesante estudiar si en células carentes de Dsk1, o bien de ambas proteínas quinasas de proteínas SRs, 2D4 (Δ dsk1 Δ kic1), esta actividad quinasa es necesaria para el arrestar o rescatar del arresto del ciclo celular, respectivamente

Al transfectar la cepa *S. pombe* B8 (Δ dsk1) con TcSRPK Δ 652, obtuvimos resultados similares a la sobre-expresión en la cepa salvaje 1913 (Tabla R6 y figura R39), donde tanto la longitud media celular, como la distribución de frecuencia de los tamaños celulares, no presentan diferencias significativas respecto del control. Esto nos indica una vez más que el arresto del ciclo celular se provoca por la actividad quinasa sobre-expresada y no por interacciones inespecíficas independientes de la actividad.

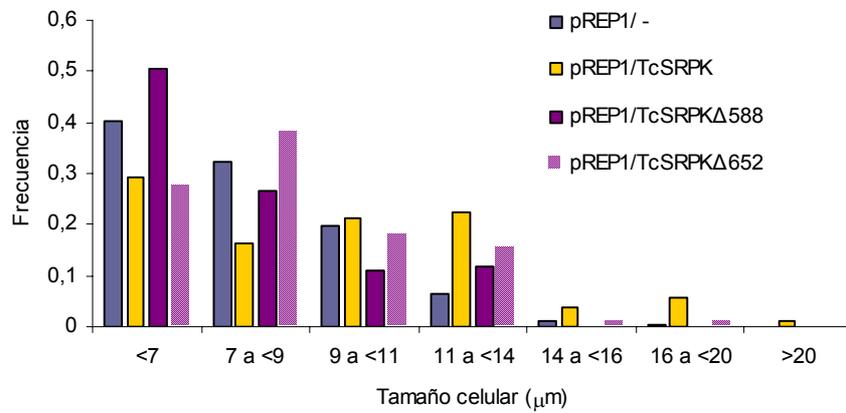


Figura R39. Distribución de frecuencias del tamaño celular de células de *S pombe* (cepa B8) sobre-expresando TcSRPK salvaje y mutantes. La sobre-expresión de TcSRPK Δ 652 y TcSRPK Δ 588 muestran un patrón prácticamente idéntico al del control con el vector vacío. Para TcSRPK en cambio se observa claramente un corrimiento hacia células de gran tamaño, comparado con el control de vector sin inserto. En la leyenda se indican las construcciones utilizadas.

La cepa mutante 2D4, como mencionamos anteriormente, prácticamente no crece en medio mínimo, salvo que se rescate el crecimiento por transformación de dicha cepa con proteínas del SR network. Previamente demostramos que tanto las proteínas SR como las SRPK de tripanosomátidos rescatan el crecimiento. En este experimento estudiamos el rescate de esta cepa, mediante la transformación con TcSRPK salvaje (como control positivo) y una de las mutantes inactivas. Como se ve en la figura R40, la mutante inactiva de TcSRPK complementa eficientemente a 2D4. Resulta interesante

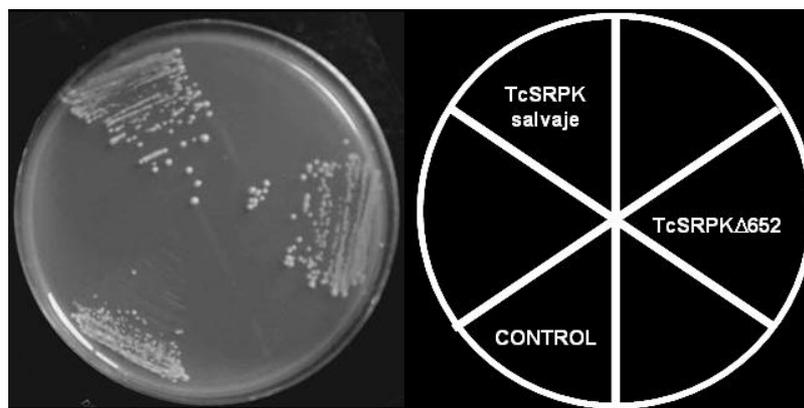


Figura R40. TcSRPK, y la mutante delecionada, Δ 652, rescatan el fenotipo mutante de la cepa mutante 2D4 de *Schizosaccharomyces pombe*. La expresión (no sobre-expresión) de la proteína TcSRPK (o sus mutantes) en la cepa mutante doble 2D4 rescata el fenotipo mutante (formación de microcolonias en medio mínimo EMM2). El panel de la derecha es un esquema de las estrias realizadas en la placa del panel de la izquierda.

considerar que la expresión de TcSRPK Δ 652 es solo la generada por el “*leaking*” del sistema y no una sobre-expresión inducida por ausencia de tiamina en el medio. Esto nos plantea dos posibilidades, ó bien el rescate es producido por la actividad remanente en la quinasa mutante, ó bien un efecto independiente de la actividad genera el rescate del crecimiento de la cepa. Dado que los niveles de expresión de TcSRPK Δ 652 son bajos, creemos que el rescate se debe a la actividad quinasa remanente en la mutante. En particular debido a que la fosforilación de factores puede tener un efecto amplificador aguas abajo, por lo cual una actividad mínima sería suficiente para generar este efecto y rescatar el crecimiento, mientras que en contraposición el rescate del crecimiento generado mediante interacciones inespecíficas necesitaría de altos niveles de expresión de la proteína mutante inactiva.

6. Estudio de la actividad de SRPKs de tripanosomátidos en Sistemas Homólogos.

Al igual que con las proteínas SR, habiendo juntado pruebas suficientes para caracterizar a TcSRPK y TbSRPK como genuinas proteínas quinastas específicas de proteínas SR, comenzamos el desarrollo de líneas celulares en tripanosomátidos, para el estudio de estas proteínas en los parásitos mismos. De tal manera se siguió con la misma estrategia anteriormente mencionada (Parte I Sección 5), desarrollar líneas estables para la sobre-expresión y el silenciamiento de TcSRPK y TbSRPK tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei* respectivamente. Como mencionamos anteriormente, en función a las limitantes técnicas y biológicas, la mayor parte del trabajo quedó determinado a *T. brucei*, debido a que tanto las líneas para la sobre expresión como para el silenciamiento de TcSRPK en epimastigotes de la cepa CL Brenner no alcanzaron nunca niveles de aumento o descenso significativos según el caso.

6.1.- Sobre-expresión y silenciamiento de TcSRPK en epimastigotes de la cepa CL Brenner de *Trypanosoma cruzi*.

Para generar las líneas antes mencionadas, el ORF de TcSRPK fue subclonado en el vector pTREX-A en orientación sentido y antisentido (figura R41). Una vez seleccionado los parásitos transgénicos, procedimos a corroborar que efectivamente presenten una reducción o aumento considerable en la expresión de TcSRPK.

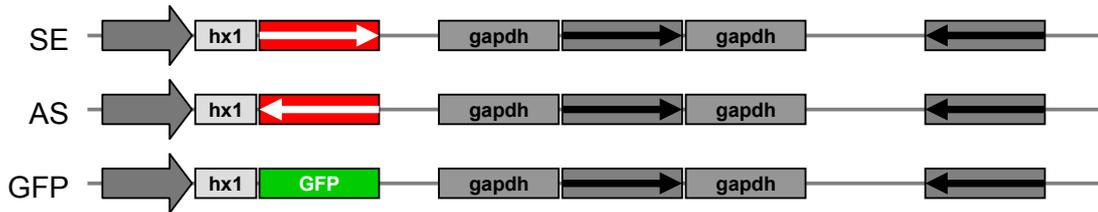


Figura R41. Construcciones transfectadas en epimastigotes de T. cruzi. Utilizando el vector pTREX-A, subclonamos bajo el control del promotor ribosomal T. cruzi el ORF de TcSRPK (bloque rojo) en orientación sentido para la sobre-expresión (SE) o antisentido (AS) para el silenciamiento. Las secuencias flanqueadas del gen de gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (gapsh) aportan los sitios necesarios para la poliadenilación del ORF río arriba y el trans-splicing y poli adenilación del marcador de resistencia, neomicina, ubicado entre ellas. pTREX-GFP, lleva la secuencia para la proteína verde fluorescente (GFP) en orientación sentido. Hx1: región de procesamiento

Para las líneas AS, no se obtuvieron descensos de los niveles de ARNm ni de proteínas, pese a que los parásitos crecían sin ningún problema bajo presión de selección inducida por los antibióticos (figura R40). Como mencionamos anteriormente, la expresión de ARN complementarios en algunos casos genera descensos en los niveles del ARNm y/o la proteína en cuestión. Sin embargo, no es una técnica que haya demostrado gran efectividad. A esto se suma que si suponemos un efecto similar al descrito en las levaduras de fisión, la tasa de crecimiento de los parásitos silenciados se encontraría notablemente reducida y por consiguiente, cabría la posibilidad de descartar las poblaciones seleccionadas al aparentar ser un cultivo que no esta creciendo.

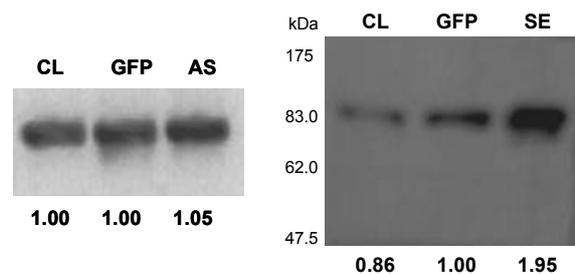


Figura R42. Análisis de control de las líneas AS y SE de TcSRPK. Panel izquierdo: ARN total de epimastigotes de la cepa CL Brenner (CL), y las líneas control (GFP), y silenciamiento (AS) se analizaron por Northern blot con una sonda específica para TcSRPK. Debajo de cada línea se muestra la intensidad relativa de las bandas, respecto el control CL. **Panel derecho:** Western blot de extractos totales de células de las líneas CL, GFP y SE de TcSRPK, la intensidad relativa de las bandas es muestra debajo de cada calle. En el margen izquierdo se aprecian los marcadores de peso molecular

En lo que respecta a las líneas de Sobre-expresión, la única diferencia es que la secuencia que codifica para TcSRPK se encuentra subclonada en orientación sense. Nuevamente, posterior a la selección de las poblaciones, estudiamos los niveles de expresión de TcSRPK. Aquí obtuvimos una línea con un nivel de expresión de 2 veces mayor respecto a los niveles de ambas poblaciones control (Fig. R42). Si bien nunca pudimos obtener clones por diluciones mínimas, la población SE no presenta modificaciones en su tasa de crecimiento, como puede apreciarse en la figura R43, ni registramos cambios morfológicos

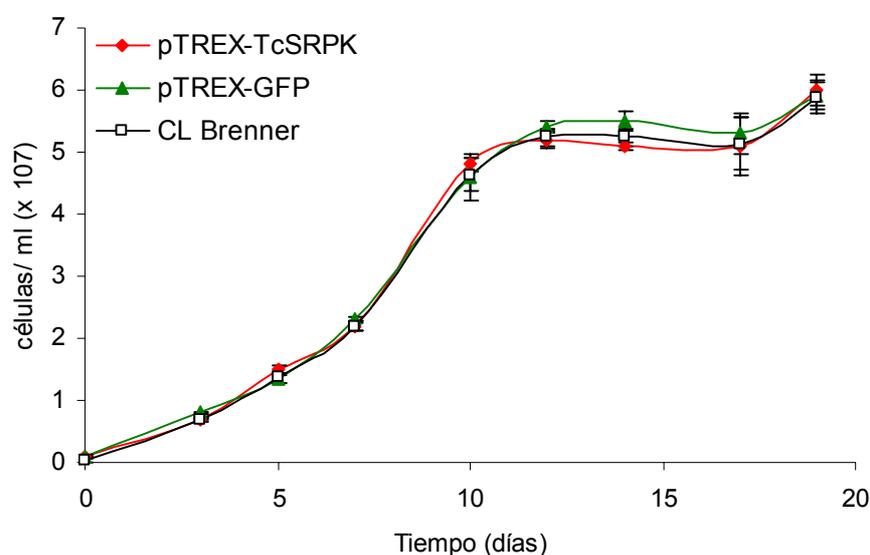


Figura R43. Curva de crecimiento de los parásitos que sobre-expresan TcSRPK. 10^7 Epimastigotes de las líneas CL Brenner, pTREX-GFP y TcSRPK (SE=2x), fueron crecidos durante 18 días, contados en cámara de Neubauer cada 2-3 días. Puede verse que la sobreexpresión de TcSRK en estos niveles no genera diferencias en la tasa de crecimiento. Para cada punto se consideran los datos de 4 experimentos independientes.

6.2.- líneas celulares de parásitos procíclicos de *T. brucei*.

Del análisis inicial de la sobre-expresión de TcSRPK en *T. cruzi* se desprende que no se generan modificaciones en el ciclo celular del parásito, en la tasa de crecimiento, ni en su morfología. En lo que respecta a la depleción de TcSRPK, una posibilidad es que la tasa de crecimiento se reduzca de manera tal que hayamos ignorado aquellos cultivos que presentaban parásitos silenciados. Esto sería similar al fenotipo descrito para la cepa 2D4 de *S. pombe*. Si reducimos la expresión de TbSRPK a niveles nulos, al ser la única quinasa de proteínas SR de *T. brucei* originaria un crecimiento mínimo de la línea celular, al igual que ocurre con las levaduras. Para esto

seguimos dos estrategias, el silenciamiento mediante RNA interferencia y la delección por recombinación homologa del locus de *tbsrpk*.

6.2.1.- Silenciamiento TbSRPK inducido por RNA interferencia en parásitos procíclicos de *T. brucei*

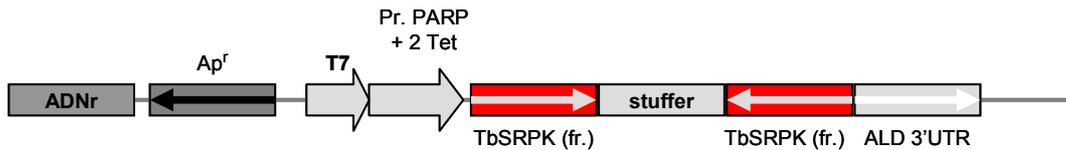


Figura R44. En el vector pLew100-stuffer, se subclonó en orientación sentido y antisentido una porción de 500pb aproximadamente del ORF de TbSRPK justo por debajo del codón de inicio (bloques rojos). En presencia de tetraciclina, el promotor T7 se libera pudiendo transcribir libremente el ARN que generará la estructura de horquilla gatillando el RNAi. ADNr: secuencia de precombinación en el genoma de *T. brucei*, Ap, resistencia a ampicilina, ALD 3' UTR, región no traducida de la aldolasa de *T. brucei*

La cepa TbSRPK RNAi se diseñó de la misma manera que lo hicimos con TSR1. Subclonamos en el vector pLew100/stuffer el producto de amplificación correspondiente a la porción amino terminal de la secuencia codificante para TbSRPK (figura R44). De esta forma contamos con una línea inducible para el silenciamiento de la quinasa, particularmente en caso que la delección por recombinación homologa del gen fuera letal. El juego de oligos utilizado abarca la porción que va de la posición 7 a la 477 en la secuencia nucleotídica a partir del codón de inicio. Una vez transfectados y seleccionados los parásitos procíclicos de la cepa 29.13, procedimos a inducir la interferencia mediante el agregado de tetraciclina al medio, durante varios días. Las curvas de crecimiento no registraban ninguna diferencia entre las poblaciones control y silenciadas,

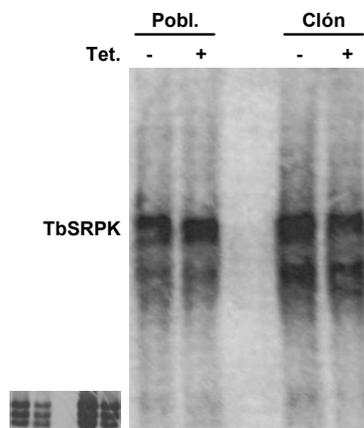


Figura R45. Análisis de Northern blot de la línea RNAi TbSRPK. ARN total de células inducidas o no, de la línea TbSRPK RNAi se resolvió en un gel 1,2% y analizado mediante Northern Blot utilizando una sonda específica de TbSRPK. Abajo a la izquierda Control de carga, tinción con azul de metileno de la membrana donde se aprecian los ARN ribosomales

En base a estos resultados analizamos mediante northern blot (figura R45), si efectivamente el nivel del ARNm de TbSRPK se encontraba reducido. Estos ensayos revelaron que no se estaba induciendo la degradación del ARNm de TbSRPK, ya que los niveles de mensajero son similares en ambas calles de la membrana. Desafortunadamente estos mismos resultados se obtuvieron para los clones obtenidos mediante diluciones sucesivas, como puede verse para uno de ellos en la misma figura.

6.2.2.- Modificaciones Génicas de TbSRPK en parásitos procíclicos de la cepa YTat de *T. brucei*.

En función de los resultados fallidos para la línea mutante condicional de TbSRPK-RNAi, desarrollamos líneas celulares que presentan uno o ambos alelos de *tbsrpk* deletionados. Utilizando el mismo método descrito anteriormente (Arhin, 2004), generamos una línea single knock-out (KO) para a partir de ésta construir la línea doble KO (SRPK-null). Debido a que la delección de todas las proteínas SRPK en *S. pombe* no resulta letal para las levaduras de fisión, nuestra intención es generar esta línea doble

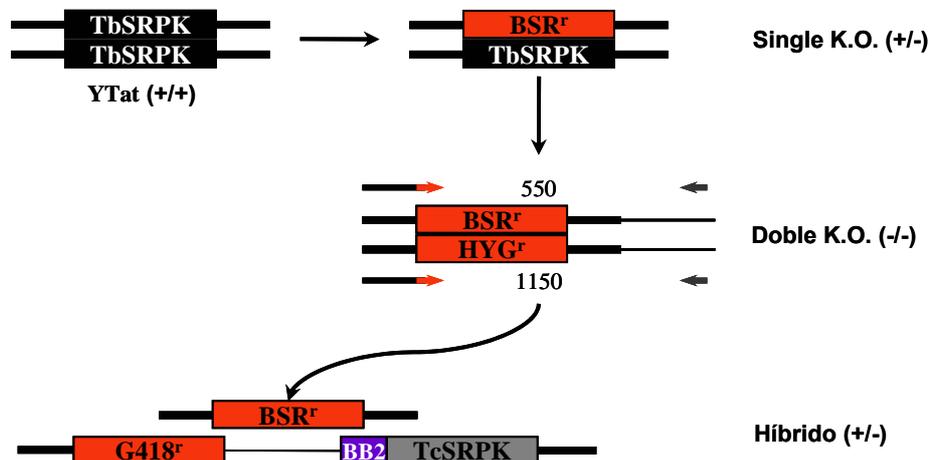


Figura R46. Estrategia de manipulaciones genéticas en el locus de TbSRPK. Parásitos de la cepa salvaje YTat, son transfectados y se reemplaza la primera copia de un alelo por el marcador BSR. Luego esta línea se utiliza como parental para generar la versiones de TbSRPK fusionada al epítipo BB2, o bien la línea carente de TbSRPK, mediante el reemplazo del segundo alelo con el marcador HYG. Los números indican el tamaño de los productos de amplificación para control del reemplazo. Los oligos utilizados son representados por flechas negras pequeñas los oligos "control" y rojas los Tag-Foward

KO, con la idea de estudiar si se registra un fenotipo de crecimiento, como el descrito para la cepa 2D4 de *S. pombe*. De esta forma estaremos generando un modelo de estudio para TbSRPK, y en caso de registrarse dicho fenotipo de crecimiento un modelo de estudio para las proteínas del SR Network en un sistema homólogo.

Para el caso de TbSRPK, al igual que para TSR1, los casetes de reemplazo utilizados fueron HYG (higromicina) y BSR (blastidina) para los KO y el de Neo^r+BB2 para la fusión del epítipo BB2 en el extremo amino. (figura R46)

Entonces obtenidos los productos de amplificación procedimos a generar el single KO, utilizando el casete de BSR. Pasado el periodo de selección y clonado, realizamos sobre esta línea la transfección con el segundo casete, el de HYG. Y procedimos a la selección de la población doble-K.O. Una vez establecidas ambas líneas celulares, confirmamos el reemplazo de los alelos de TbSRPK, así como la conservación de un alelo salvaje en la single K.O. Para ello utilizamos combinaciones de oligos específicos que hibridan sobre el ORF de TbSRPK, las regiones flanqueantes al ORF de TbSRPK y los casetes utilizados (figura R46). Como puede apreciarse en la figura R47, en ambos casos se observan las bandas correspondientes al alelo TbSRPK salvaje y el reemplazado por BSR en el single K.O., así como las correspondientes a BSR y HYG en la línea doble K.O.

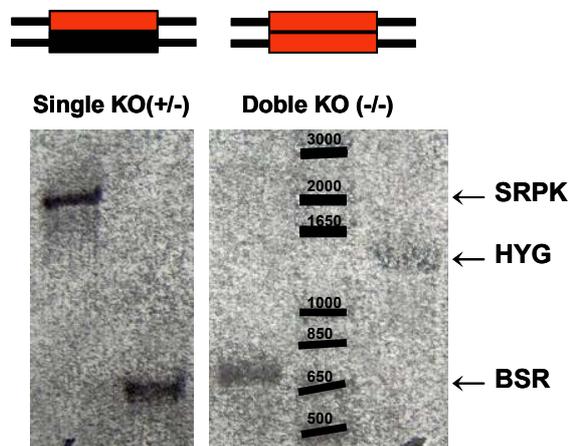


Figura R47. Análisis por PCR utilizando oligos flanqueantes al gen de TbSRPK. ADN genómico de células de las líneas single y Doble KO, fue utilizado como templado en reacciones de PCR con los oligos específicos a la secuencia de los marcadores, y TbSRPK. El oligo reverse es siempre el mismo, cambiando el oligo forward según el alelo a amplificar. Los productos obtenidos resolvieron en un gel de agarosa 1%. M, Marcador de peso molecular.

Como anteriormente mencionamos, una de las características que esperábamos encontrar en la línea doble K.O. era que presentara un fenotipo de crecimiento lento, respecto de la cepa salvaje, mientras que el crecimiento de los cultivos de la línea single K.O. sería normal. A fin de determinar si la reducción de TbSRPK influencia el crecimiento y la viabilidad de los parásitos, monitoreamos el la tasa de crecimiento de los cultivos de las tres líneas cada 24 horas (figura R48)

. Las células de la cepa salvaje YTat y las single K.O. presentan un patrón de crecimiento similar a lo largo de toda la curva. Las células doble K.O. muestran un descenso significativo de su tasa de crecimiento desde el inicio mismo del monitoreo. Cabe destacar que no observamos diferencias morfológicas en ninguna de las dos

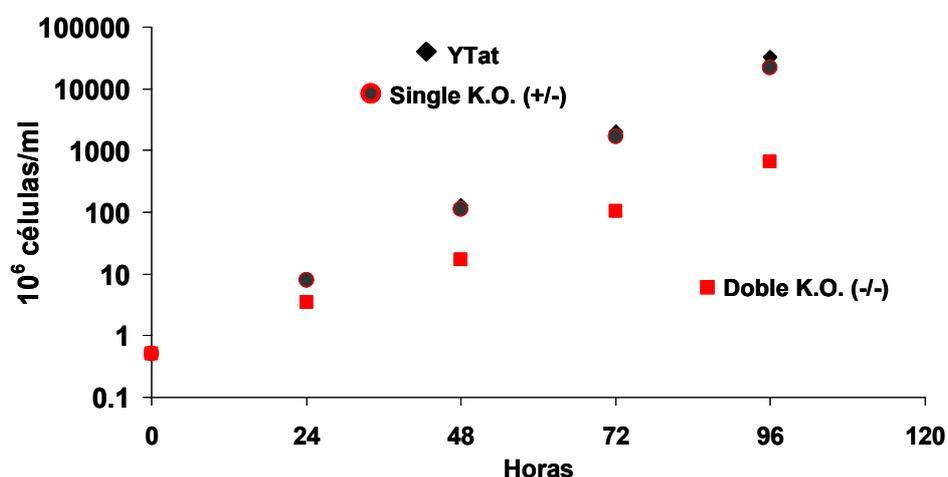


Figura R48. Curva de crecimiento de las líneas celulares single KO y doble-KO de TbSRPK. Parásitos procíclicos de las líneas indicadas, fueron crecidos durante 6 días, contados en cámara de Neubauer cada 24hs y mantenidos siempre en fase exponencial. Se grafican los resultados de 3 experimentos independientes.

líneas mutantes respecto de la salvaje. La tasa de crecimiento está reducida en un promedio de 30%, manteniéndose este valor en los sucesivos repiques a lo largo de la curva. De esta manera podemos decir que TbSRPK no es un factor esencial para la forma procíclica de *T. brucei*, sin embargo la ausencia de esta proteína origina deficiencias en el crecimiento de los cultivos, presentando una tasa de crecimiento mas lenta, concordantemente con lo descrito previamente en cepas carentes de quinasas de proteínas SRs en *S. pombe*.

7.- Caracterización de TcSRPK en un sistema homólogo de *T. brucei*

En consecuencia de lo registrado para la cepa TbSRPK (-/-), nos centramos en probar que esta cepa podría servir como modelo para el estudio de las proteínas del SR-Network de tripanosomátidos, de forma similar a como las habíamos estudiado en el sistema heterólogo de *S. pombe*. Para probar el rescate del fenotipo de crecimiento lento, diseñamos un nuevo casete que presenta una versión de TcSRPK fusionada al epítipo BB2 (TcSRPK) en su extremo amino y con resistencia a otro antibiótico (G418 en este caso), para así reemplazar uno de los alelos deletionados en la línea doble K.O. y rescatar el fenotipo de crecimiento lento (Fig. R46). Se transfectó con este casete tanto la línea single K.O. (BSRr) como la doble K.O. (BSRr; HYGr). Posteriormente la selección se llevo a cabo en medio de cultivo con blasticidina y G418, forzando la salida del casete de higromicina de la línea doble K.O. De esta manera generamos las líneas que denominamos “**híbrido**” (Tc/-). Una vez que las poblaciones fueron seleccionadas, procedimos a corroborar la expresión de BB2-TcSRPK mediante western blot de extractos totales de parásitos procíclicos (Fig. R49). Confirmada la expresión de BB2-

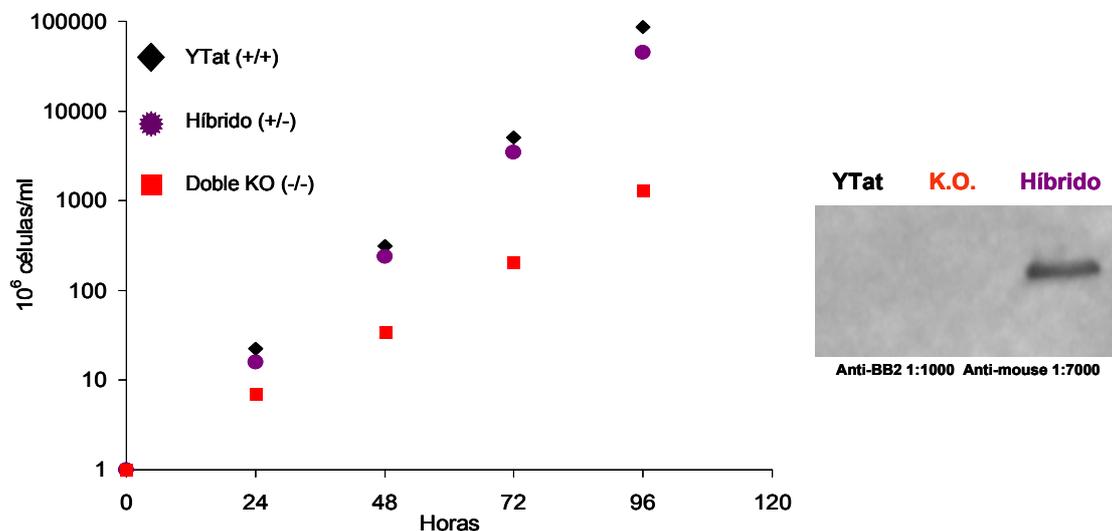


Figura R49. Curva de crecimiento de la línea híbrido. Parásitos procíclicos de las líneas indicadas, fueron crecidos durante 6 días, contados en cámara de Neubauer cada 24hs y mantenidos siempre en fase exponencial. Se grafican los resultados de 4 experimentos independientes. A la derecha se observa el análisis por Western blot de extractos totales preparados de de las líneas celulares indicadas, los separamos en un SDS-PAGE 10%, transfirimos a un amembrana de PVDF activada e incubamos con el anticuerpo anti-BB2. Como era de esperar sólo la línea híbrido muestra una señal positiva en el WB.

TcSRPK, procedimos a monitorear el crecimiento de esta línea en comparación con las la cepa salvaje y la línea doble K.O. Como puede apreciarse en la figura R49, la tasa de crecimiento de los parásitos híbridos es significativamente mayor respecto de las células doble K.O. y similar a la tasa de crecimiento de la cepa salvaje. Entonces podemos decir que la expresión de BB2-TcSRPK rescata el fenotipo de crecimiento lento de la línea TbSRPK-*null*.

Entonces, estos resultados nos demuestran que la delección de TbSRPK no es letal para el parásito. Sin embargo la ausencia de la quinasa, afecta de manera significativa la tasa de crecimiento, dando lugar a un fenotipo de crecimiento lento. Hemos reportado también que dicho fenotipo puede ser revertido por la complementación de TcSRPK. Abriendo la posibilidad de que la línea mutante SRPK-*null* podría ser utilizada como un modelo de estudio para los componentes del SR-Network de tripanosomátidos, constituyendo un el primero en un sistema homólogo.

DISCUSIÓN

Discusión

El trabajo presentado demuestra por primera vez la existencia de un "SR-network" altamente conservado en parásitos protozoarios como *Trypanosoma cruzi* y *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 tripanosomátidos no poseen intrones. Estos factores cumplen funciones generales en la regulación de la reacción de trans-splicing y cis-splicing conjuntamente con injerencia en el ciclo celular de estos parásitos.

El alto grado de conservación a nivel estructural, bioquímico y funcional observado en sistemas heterólogos y en los parásitos nos permiten afirmar que estamos frente a un sistema de regulación de la expresión génica básico, del cual resta identificar varios y probablemente novedosos factores. La participación de esta red en ambos procesos de splicing, conjuntamente con las observaciones obtenidas en este trabajo, nos permite inferir que tanto las SRs y SRPKs de tripanosomátidos poseen funciones conservadas y exclusivas, representando un aporte significativo para el entendimiento de la reacción de SL trans-splicing.

Las proteínas SR

La evidencia presentada en este trabajo de tesis indica claramente que los tripanosomátidos presentan una proteína de la familia SR que es activa en el procesamiento del pre-ARNm, interviniendo en las reacciones de trans- y cis-splicing en sistemas homólogos. Asimismo, la carencia de esta proteína, esencial para el procesamiento del pre-ARNm como para el parásito, tiene influencia en el ciclo celular, aportando nuevas evidencias a la interconexión entre los factores de las redes de proteínas SR y factores de control del ciclo celular.

A partir de los datos derivados del proyecto genoma de los Trityps, se demostró que TSR1 pertenece a uno de los COGs de tres vías sinténicas identificados y de esta forma se aporta una evidencia más que apunta a que TcSR, TSR1 y LmSR (no reportado hasta la fecha) intervendrían en las mismas funciones en cada uno de los parásitos. Mas allá de los datos inherentes a estas proteínas SR, otros datos se desprenden de los proyectos genomas. El número total de RRMs es similar en levaduras y Trityps, (103 en *T. brucei* vs. 70 en *S. pombe*), pero los Trityps presentan más proteínas pequeñas de un solo RRM lo cuál puede reflejar funciones específicas de

los Tritryps o de cooperación entre proteínas. Si este análisis lo acotamos a las proteínas con dominios SR, el número es muchísimo menor. Un caso para destacar es el de la proteína TcU2AF35, la cual presenta un dominio de dedo de zinc del tipo CCHC, en lugar del dominio RS característico de sus homólogos en otros organismos, por fuera de los Tritryps. La gran representación de este tipo de proteínas junto a la aparente ausencia de factores de transcripción activadores, co-activadores y basales, refuerzan el concepto de una regulación principal de la expresión génica a nivel post-transcripcional.

Los resultados obtenidos en levaduras permiten presentar por primera vez a TSR1 como una proteína SR genuina. Esta homología estructural y funcional confirma la presencia de una Red de proteínas SR en tripanosomátidos. Como se vio, la proteína completa TSR1 produjo una elongación celular leve pero significativa, al igual que TcSR 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). Los resultados de sobre-expresión en las cepas mutantes B8 y 2A5 posicionan a TSR1 bajo la órbita de la familia de quinasas SRPK quedando comprobada la participación de TSR1 dentro de una red de proteínas SR. 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. TSR1 Δ RS no produjo una elongación significativa de la cepa salvaje, al igual que lo había hecho TcSR. En experimentos anteriores a esta tesis, ASF/SF2 Δ RS pudo elongar la cepa salvaje 1913 al ser sobre-expresada así como complementar el crecimiento de la doble mutante 2D4. 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 que el sitio 3' de splicing sea suficientemente fuerte. Nuestros resultados indican que al menos para TcSR, el dominio RS es necesario para la actividad.

La interacción de TcSR con el factor auxiliar U2 de *T. cruzi*, suma una nueva evidencia a la participación de esta proteína en la maquinaria de procesamiento del ARN. Cabe destacar que los factores de *T. cruzi* U2AF35 y U2AF65 presentan características estructurales notoriamente diferentes respecto a sus homólogos en eucariotas superiores abriendo la posibilidad que la forma en que se establecen las

interacciones entre estos y otros factores sea de un modo diferente en tripanosomátidos. De esta forma se cierra un círculo de interacciones entre los factores que definen los primeros pasos del ensamblado del spliceosoma en tripanosomátidos, teniendo a TSR1 interactuando con la SL RNP y con TSR1IP (Ismaili 1999, 2000) en *T. brucei* y a TcSR con TcU2AF35 en *T. cruzi*. Esta conservación en las interacciones proteína-proteína y proteína-ARN sugiere que los mecanismos de maduración de los pre-mARN están conservados, indicando un posible origen común de los componentes de splicing. Las líneas procíclicas desarrolladas con la fusión del epítipo de HA a TSR1 brindaran herramientas útiles en la purificación y caracterización de complejos de splicing y mayor información acerca de las interacciones de estos factores a nivel fisiológico.

El complejo ciclo de vida de los tripanosomátidos requiere de una gran capacidad de adaptación al ambiente, es decir a sus diferentes hospedadores. Para realizar las modificaciones necesarias para esta adaptación, los parásitos sufren grandes cambios de morfología, metabolismo y en su cubierta antigénica a partir de cambios en la expresión génica regulados por el desarrollo. Como vimos, en estos organismos el control de la expresión génica se ejerce principalmente a nivel post-transcripcional. Adicionalmente, el control de la transcripción y el proceso de maduración de los pre-ARNm presentan sus características propias siendo de nuestro particular interés el estudio del SL trans-splicing. Las proteínas SR se han descrito en múltiples roles en el procesamiento del ARN (Sanford, 2005) y específicamente en trans-splicing (Furuyama, 2002). En esta tesis se ha demostrado que el silenciamiento de TSR1 afecta los procesos de trans- y cis-splicing, sugiriendo que este factor es esencial para todo el procesamiento de los pre-mARNs. En términos de la biología del parásito, el silenciamiento de TSR1 es responsable de una reducción acumulativa de la tasa de crecimiento que desemboca en la muerte celular. Los análisis cariotípicos y morfológicos de estas células nos indican que concomitantemente a la ausencia de TSR1 se produce una acumulación de células en las etapas tardías del ciclo celular, G2/M, así como de células aberrantes. Estas alteraciones vistas en la morfología celular pueden estar relacionadas con una seria disfunción del citoesqueleto.

Nuestra caracterización previa de TcSR en distintos sistemas heterólogos de splicing (Portal, 2003) nos condujeron a especular que las proteínas SR de tripanosomátidos podrían estar involucradas en el procesamiento de los ARNm,

particularmente en el trans-splicing. Debido a que ambos procesos, cis y trans-splicing están afectados, los resultados sustentan la posibilidad que un único complejo “spliceosoma” lleve a cabo ambas reacciones (Liang, 2006). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad que los efectos observados en el cis-splicing de PAP sean una consecuencia en la reducción en el rendimiento del proceso de trans-splicing.

Efectivamente, los resultados indican que el silenciamiento de TSR1 afecta tanto al trans- como al cis-splicing, pudiendo establecer por primera vez a TSR1 como un factor esencial para el procesamiento de pre-mARNs en tripanosomátidos.

Estas evidencias en el silenciamiento de TSR1 brindan soporte a las especulaciones generadas por los resultados obtenidos en las líneas transgénicas para TcSR en epimastigotes de *T. cruzi*. Recordemos que nunca se pudo obtener una línea que sobre-exprese TcSR y de esta manera rompa el balance de los factores de splicing, sólo se consiguió establecer una línea cuando el transgen presentaba una mutación que generaba una proteína truncada inactiva. Adicionalmente, la imposibilidad de generar una línea doble-KO en *T. brucei*, junto con la reducción en la tasa de crecimiento de la línea que presentaba la fusión del epítipo HA en el extremo carboxilo de TSR1 dan cuenta de los problemas que generaba alteraciones en los niveles y estructura de la proteína SR de tripanosomátidos.

Nuestro conocimiento actual no nos permite atribuir un rol específico a las SRs de tripanosomátidos en trans-splicing. En nematodos las proteínas SR son requeridas al menos en dos etapas de la reacción de trans-splicing. Estas proteínas son importantes anterior y posteriormente a la adición de la partícula U2 snRNP al sitio 3' de splicing (Furuyama, 2002). Está bien establecido el rol esencial que las proteínas SR juegan la adición mediada por U1, de U2 al sitio de ramificación, independientemente si esta interacción es por definición de los intrones o exones (Boukris, 2004). La función putativa de las proteínas SR posterior a la llegada de U2 es comunicar los sitios 3' y 5' de splicing, siendo una función independiente de los elementos exónicos. Esta función es extremadamente importante en la reacción de trans-splicing donde los sitios de splicing se encuentran en transcritos separados.

Varias de las actividades atribuidas a las proteínas SR en cis-splicing son directamente relevantes en la reacción de trans-splicing. Los efectos en el procesamiento del pre-mARN observados para las células TSR1 ARNi así como la interacción de TSR1 con el SL ARN, U2AF (Ismaili, 1999) sustentan la idea de TSR1 involucrada en la comunicación o “bridging” de los sitios de splicing como se propone

para nematodos. En nematodos se identificaron dos factores exclusivos de trans-splicing, Mr30 y Mr175. Se cree que estas proteínas esenciales para el trans-splicing, comunican la partícula ribonucleica del spliced leader (SL RNP) con el complejo SF1/BBP unido a al punto de ramificación en la otra molécula procesada. De nuestras búsquedas en la base de datos de los proyectos genomas de Trytryps y de las predicciones mismas de estos proyectos, no surge ninguna contraparte para estas dos proteínas en los tripanosomátidos, lo que nos permite considerar a las proteínas SR como un putativo candidato involucrado en el “bridging” de los sitios de splicing en el procesamiento por trans-splicing.

En lo que respecta a la intervención en el proceso de cis-splicing, recientemente ha sido identificado un spliceosoma que contiene a SL-RNP y U1snRNP., sugiriendo que existe una competencia entre estas dos RNP, la cual sería el determinante clave en la selección de un sitio 3' para realizar cis- o trans-splicing. Esta unión puede depender del perfecto apareamiento de U1snRNP con el sitio 5' de splicing, así como de la asociación de las proteínas SR en elementos en cis-. No queda claro aún si todos los spliceosomas llevan ambas RNPs, U1 y SL, pero las proteínas SR podrían estar siendo un factor determinante en la definición de los sitios de procesamiento tanto en el cis-, como en el trans-splicing. Entonces, muchos de los factores de splicing podrían ser compartidos por el trans- y cis-splicing, y las maquinarias involucradas en estos procesos serina muy similares. El desafío ahora es averiguar como es seleccionado el sitio 3' de splicing en una reacción de trans- o cis-splicing. La unión de U1 snRNP a un sitio 5' de splicing genuino y su interacción -mediada por SRs- con U2 unido al sitio de ramificación, podría comprometer al sustrato en una reacción de cis-splicing. Por otro lado, en ausencia de un sitio 5' de splicing, la unión de SL RNP a los factores asociados al punto de ramificación dirigiría al pre-ARNm hacia el camino del trans-splicing, proceso en el que las SR actuando en trans podrían estar interviniendo..

Acompañando a los defectos en el splicing en las células con ausencia de TSR1, encontramos una alteración del ciclo celular junto a fenotipos originados por alteraciones en el citoesqueleto, presuntamente relacionadas. A pesar de los avances en el conocimiento de las funciones de las proteína SR, relativamente poco es conocido acerca de los roles fisiológicos de estas proteínas. Adicionalmente el “crosstalk” entre los diferentes circuitos involucrados en el procesamiento del ARN, la transcripción y el control del ciclo celular aumentan la complejidad del estudio (Loyer, 2005, Seghezzi,

1998). Una creciente cantidad de evidencia se ha acumulado indicando que estos procesos pueden estar conectados. Es improbable que los defectos en ciclo celular sean una simple consecuencia de defectos globales en el splicing dado que mutaciones en la mayoría de los genes que codifican para factores de splicing no perturban el ciclo celular. De hecho, sólo han sido descritos un pequeño número de ejemplos que afecten el ciclo celular y el procesamiento de ARN simultáneamente y abarcan desde levaduras hasta eucariotas superiores (Ben-Yehuda, 1998-2000^a-2000b, Dahan, 2004, Li, 2005, Rasheva, 2006, Russell, 2000). La depleción de ASF/SF” en células de pollo resulta en el arresto del ciclo celular en la fase G2/M seguido de muerte celular programada (Li, 2005). Sin embargo, no se encontraron diferencias para ninguno de los transcritos de reguladores del ciclo celular (Lemaire, 2002). Casos similares se describen en levaduras, donde la conexión entre los dos procesos permanece elusiva. Extraordinariamente, conexiones directas entre defectos en el ciclo celular y splicing anormal de un gen particular se describen para el gen CDC40/PRP17. Este gen codifica para un factor de splicing del pre-ARNm involucrado en el segundo paso de la reacción de splicing (Vijayraghavan, 1989). Mutaciones en este gen provoca el arresto de ciclo celular en G2/M. El gen ANC1, cuyo transcritos permanecen constantes durante todo el ciclo celular, es blanco de la regulación por CDC40. La delección del intrón en el gen ANC1 libera del arresto en G2/M a las mutantes de cdc40. (Dahan, 2004). En otro ejemplo, la pérdida de B52 (una proteína SR) es suficiente para liberar el arresto en G1/S dependiente de dE2F2/RBF en células carentes de de2f1, probablemente por un splicing anormal del pre-mARN de de2f2. (Rasheva, 2006). La restitución del bloqueo se produce al incorporar una versión sin intrones del gen de de2f2 confirmando que son los defectos en el splicing de este gen los que causan la salida del bloqueo y no en otros bancos de B52. Un segundo ejemplo en las levaduras de gemación es el del gen de CDC5, un componente de la maquinaria de splicing (Ajuh, 2000). El arresto en G2/M causado por mutaciones en este factor de splicing se debe al procesamiento ineficiente de un intrón en el pre-ARNm de α -tubulina (Burns, 2002). Recientemente se identificó el único homólogo en *T. brucei* de Plk (Polo like kinase). TbPLK es capaz de complementar las funciones de Plk (cdc5) en *S. cerevisiae*. El silenciamiento de TbPLK en formas procíclicas del parásito resulta en la completa inhibición de la citocinesis pero no afecta la segregación del núcleo ni del kinetoplasto. (Kumar, 2006).

La ausencia de TSR1 presenta una proporción aumentada de células en las etapas tardías del ciclo celular. Además, encontramos un alto número de células con

configuraciones cariotípicas aberrantes así como un notorio número con posicionamiento anormal del kinetoplasto. Estos resultados sugieren la presencia de un problema para progresar a lo largo de los diferentes puntos de control del ciclo celular. La mayoría de las configuraciones anormales pueden surgir como consecuencia de un desarreglo de los microtúbulos. En estas mismas células observamos fenotipos relacionados a perturbaciones del citoesqueleto. Aquellas células en las etapas tempranas del ciclo celular presentan un incremento en la dimensión kinetoplasto-extremo Posterior (“Nozzle”) mientras esta elongación no es evidente en células en G2 o G2/M. Todas las células presentaron tensión positiva para los cuerpos basales de acuerdo a la respectiva configuración y fenotipo. La apariencia de las células “Monster” principalmente con múltiples flagelos, núcleos y/o kinetoplastos, evidencian problemas en la citocinesis. Estas células no siempre respetan la proyección matemática del número de núcleos, kinetoplastos y flagelos, lo que sustenta la idea de una citocinesis alterada más que un desarreglo completo de todo este proceso.

Las células que desarrollan el fenotipo de “nozzle” caracterizadas previamente como las CYC2 ARNi, no presentaron alteraciones en otros microtúbulos ni el flagelo, sugiriendo que la extensión desregulada de los microtúbulos estaba restringida a un sub-grupo específico de microtúbulos. En cambio en las células TSR1 ARNi, encontramos que el ensamblado de la estructura paraflagelar PFR se encontraba afectado, presentando diferentes características. Particularmente las agrupamos en dos grupos, 1) los flagelos que lucían mas gruesos a causa de una señal mas fuerte y 2) los flagelos que presentaban una señal heterogéneamente distribuida a lo largo de los mismos. La morfogénesis del flagelo esta compuesta de siete pasos críticos que incluye la síntesis de proteínas flagelares en el citoplasma, el transporte a la base del flagelo, entrada en el compartimiento flagelar, transporte anterógrado hacia los sitios de ensamble, ensamble en la estructura, transporte retrogrado para el reciclaje y finalmente mantenimiento y recambio. Hay varios pasos en los cuales el proceso puede estar dañado y de nuestros resultados no podemos inferir alteraciones específicas de estos pasos (Fu, 1995). En las células carentes de TSR1, los flagelos viejos donde la estructura PFR ya esta establecida, no se observan señales anormales. El fenotipo de ensamblado alterado se observó principalmente en los nuevos flagelos en desarrollo, sugiriendo que los pasos involucrados en la construcción de una nueva estructura podrían ser los afectados por la ausencia de la proteína SR.

Estos resultados entonces sustentan la idea que las células TSR1 silenciadas presentan un desarreglo serio del citoesqueleto, el cual determinará el destino celular en una forma ciclo celular dependiente. Las células silenciadas en etapas tempranas del ciclo (G1/S y G2 temprana = 1K1N y 2K1N, respectivamente) desarrollaran el fenotipo de “Nozzle” mientras que las células en las etapas tardías del ciclo, derivarán en células con problemas en la progresión de G2/M y una citoquinesis dañada, lo cual generará células aberrantes

Estos resultados demuestran que TSR1 esta involucrada en el mantenimiento de la morfología celular de formas procíclicas de *T. brucei* si bien no podemos aseverar si esto es una función directa de TSR1 o si se esta gatillando una cascada de eventos que altera finalmente la morfología celular.

En conclusión los resultados presentados en este trabajo de tesis muestran que TSR1 es una proteína SR genuina, codificada por un gen esencial, involucrada en el procesamiento del pre-ARNm por trans- y cis-splicing. Cómo el trans-splicing tiene lugar y el rol específico de TSR1 en este proceso siguen siendo poco claros y será necesario una profundizar los estudios. La alteración del ciclo celular y los desarreglos del citoesqueleto aportan una evidencia más del “cross-talk” entre las redes de diferentes procesos. Nuevamente, estudios futuros con este y otros componentes del SR Network posiblemente esclarezcan como estos procesos están conectados en tripanosomátidos.

Las proteínas quinasas de proteínas SR (SRPKs)

Tanto TcSRPK como TbSRPK presentaron una estructura extremadamente conservada con otras proteínas de la familia SRPK de metazoarios. Esta conservación estructural, representa también una conservación del mecanismo de activación constitutiva de esta familia de quinasas. En este trabajo, 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 los parásitos, 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. El desarrollo de mutantes de TcSRPK nos permitió identificar una porción crítica para la activación constitutiva en la extensa cola C-terminal, representando una característica específica de las SRPKs de tripanosomátidos.

No sabemos con certeza si TcSRPK y TbSRPK son las únicas quinasas de proteínas SR existentes en estos organismos. Los datos que se desprenden de los proyectos genomas de TryTryps así lo sugieren, aunque no puede descartarse la existencia de otras quinasas de esta u otra familia de quinasas de proteínas SR que pudieran ser elusivas a las predicciones bioinformáticas o bien frente a la falta de evidencias bioquímicas de las putativas quinasas identificadas. De nuestro análisis particular, surge que tanto TbSRPK y TcSRPK son genes ortólogos que conforman un grupo presente en los tres organismos junto al putativo gen de LmSRPK. Adicionalmente, en el caso de TbSRPK, previamente observamos sólo una banda en ensayos de Northern blot, y para TcSRPK se evidenció lo mismo tanto para los análisis de Northern blot como los de Western blot con anticuerpos específicos contra TcSRPK recombinante. Reforzando la idea de que estas son las únicas quinasas de la familia. La línea carente de TbSRPK en parásitos procíclicos presenta una reducción de su tasa de crecimiento que emula al fenotipo generado por la ausencia de todas las proteínas quinasas de proteínas SR en *Schizosaccharomyces pombe* (veremos más adelante) aportando más evidencias que TbSRPK es la única quinasa de proteínas SR.

Las búsquedas en esas mismas bases de datos de secuencias con homología con quinasas de otras familias como Clk/Sty, arrojaron resultados negativos. De igual manera que para las SRPKs, las predicciones de los proyectos genoma no aportan nuevos datos sobre este tema, dada la carencia de evidencias bioquímicas, esencial en la caracterización de las quinasas de proteínas. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que alguna otra quinasa no relacionada con las familias previamente descritas que fosforilan proteínas SR, pueda interactuar con ellas *in vivo*. Resultados previos de nuestro grupo con TcCRK, la proteína quinasa dependiente de ciclinas en el parásito, indican que al menos *in vitro* TcSR puede ser fosforilada por otras quinasas. Aportando una nueva evidencia a la interconexión entre los factores involucrados en los procesos de control del ciclo celular y procesamiento de pre-ARNm.

Previamente ambas quinasas, TcSRPK y TbSRPK mostraron ser funcionales constitutivamente en ensayos de fosforilación *in vitro* con distintas proteínas con repeticiones SR. El desarrollo de mutantes truncadas en el extremo carboxilo evidenciaron una conservación del mecanismo de activación constitutivo característico de esta familia de quinasas en metazoos. La cola C-terminal de las SRPK de tripanosomátidos es notoriamente extensa en comparación con la de otros organismos,

pudiendo ser dividida en una región conservada y otra específica. Esta última es esencial para la actividad constitutiva, sin embargo comprobamos que no toda la región resulta esencial, pudiendo identificar una porción bastante más acotada dentro de ella. Esta característica particular de la activación constitutiva, aparenta ser la única diferencia estructural en referencia a dicho mecanismo. Actualmente estamos desarrollando una serie de mutantes puntuales de Q566 en combinación o no con las deleciones en la cola c-terminal, que nos permitirán entender un poco más el mecanismo de activación en estas proteínas de tripanosomátidos.

Los resultados obtenidos en levaduras de fisión demostraron que el grado de conservación observado a nivel estructural y en ensayos de fosforilación *in vitro* tiene relevancia funcional, extendiendo por primera vez la conservación de mecanismos de activación desde hSRPK1 a los organismos protozoarios. Pudimos evidenciar que la actividad de TcSRPK es esencial para producir el arresto del ciclo celular en distintas cepas de *S. pombe*, pero que la sola presencia de mutantes inactivas de SRPK restauran un crecimiento normal en levaduras carentes de toda proteína quinasa de proteínas SR. Esto nos indica que es necesaria la sobre-expresión de la actividad quinasa para generar el arresto por deficiencias en el procesado de los pre-ARNm, posiblemente a partir de un desequilibrio del estado de fosforilación de los factores de splicing. Recordemos que tanto la hipofosforilación como la hiperfosforilación del dominio RS inhibe la actividad de las proteínas SR en splicing. Los niveles de expresión de la mutante inactiva de TcSRPK que rescatan el fenotipo de crecimiento lento son debido a la actividad basal ("leaking") del promotor de *nmt1+*, y no de la sobre-expresión. Estos bajos niveles no estarían teniendo un efecto dominante negativo inclinándonos por un efecto amplificador de la actividad quinasa remanente en las mutantes. La fosforilación de factores tiene un efecto amplificador en la transducción de señales por lo que cantidades pequeñas de una determinada quinasa, frente a la carencia absoluta, pueden restaurar una vía de señalización interrumpida. No sabemos las causas del crecimiento lento en esta cepa, es decir, en que ámbito es necesaria la presencia de alguna quinasa de proteínas SR aunque sea en cantidades mínimas, si es la regulación de factores de splicing, de factores involucrados en el control del ciclo celular o bien factores involucrados en ambos procesos. Esta es una nueva prueba de la interconexión de distintas redes de factores en distintos procesos de control. Recordemos que Dsk1 fue inicialmente caracterizada como una quinasa involucrada en el control del ciclo celular en la etapa mitótica más precisamente. De igual forma las Clk

están implicadas en la regulación del crecimiento y diferenciación celular y recientemente identificada la función de Kic1 en el último paso de la citocinesis y la formación del septum de *S. pombe*. Nuevamente la obtención de mutantes totalmente inactivas nos ayudará a discernir entre las dos posibilidades antes mencionadas.

Todos estos resultados en sistemas heterólogos apuntan hacia una conservación estructural y funcional de las SRPK desde los protozoos hasta los eucariotas superiores. Los resultados de experimentos de sobre-expresión y silenciamiento de TcSRPK en epimastigotes de *T. cruzi* no nos brindan ningún resultado concluyente aunque nos permite ver que la duplicación en los niveles de SRPK no afecta ni la tasa de crecimiento ni la morfología del parásito. Queda por estudiar si esta variación en los niveles de SRPK afecta el procesamiento de los mensajeros de *T. cruzi*. Para ello comenzamos el desarrollo de un sistema de mini-genes basados en fusiones del gen de PAP con un gen reportero que nos permitirá evaluar ambos procesamientos llevados a cabo por el parásito.

Dadas las herramientas técnicas disponibles y las condiciones biológicas de *T. brucei*, nos centramos en el estudio de TbSRPK a partir de su depleción. Además, basándonos en nuestra experiencia con *S. pombe* no sería una proteína esencial y su ausencia tendría efectos evidentes en el crecimiento. De esta forma, el desarrollo de una línea celular carente de TbSRPK nos brindaría un modelo de estudio práctico y sencillo para componentes de la red SR en un sistema homólogo de tripanosomátidos. Esta hipótesis se comprobó al ver que los parásitos SRPK-null presentan una reducción de su tasa de crecimiento de aproximadamente el 30%, la cual se restituye al complementar esta cepa con la proteína ortóloga de *T. cruzi*. En esta línea nos resta profundizar los estudios acerca de las alteraciones en el ciclo celular, la cariotipificación y morfología celular. Por otro lado, además como se ve influido el procesamiento de los pre-ARNm, tanto a nivel de cis- como trans.splicing.

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 verifican la conservación del mecanismo de actividad constitutiva de los miembros de la familia hasta el comienzo del linaje eucariota. 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 mARN debe ser independiente del tipo de splicing que

realizan los organismos. El descubrimiento de proteínas SRPKs en tripanosomátidos que funcionan de manera tan conservada no es de importancia menor ya que sugiere que el procesamiento del pre-mARN evolucionó tempranamente en la evolución. Como dijimos anteriormente, estas proteínas fueron inicialmente identificadas como proteínas quinasas del ciclo celular, esta no parecería ser la excepción en tripanosomátidos, uniendo una vez mas los sistemas de control de distintos procesos como el procesamiento de los pre-ARNm y el ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos.

1.- Medios y soluciones.

Medios de cultivo.

LIT (Liver Infusion Tryptose), 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 $\mu\text{g/ml}$ estreptomycin, 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 oxiado, 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 Edinburgo) 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 molibdenico, 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 μM , 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 $\mu\text{g/ml}$.

Concentración de IPTG para placas: 0.1 M; disolver 120 mg en 5 ml de H_2O . Agregar 100 $\mu\text{l/placa}$. Concentración final para placas: 0.5 mM.

Concentración de X-Gal para placas: 50 mg/ml. Disolver en dimetilformamida. Agregar 50 $\mu\text{l/placa}$. Concentración final para placa: 40 $\mu\text{g/ml}$.

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.

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

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

CHISAM: cloroformo /alcohol isoamílico 24:1

2.- Técnicas Electroforéticas.

Geles de agarosa. Los geles de agarosa se preparan con buffer TBE 0.5x 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.

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 a 5-10 V/cm

Geles de poliacrilamida desnaturalizantes para 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.

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..

3. Parásitos: cultivo y preparación de extractos.

Cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se utilizaron principalmente formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*, cepa CL brenner. El cultivo de

epimastigotes se efectuó en medio LIT a 28°C. Típicamente se inicia un cultivo con 10^5 células/ml y a los siete días se alcanza la fase exponencial con 10^7 células/ml aproximadamente.

Cultivo de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*. Se utilizaron parásitos procíclicos de *T. brucei*, cepas YTat (salvaje) y 29.13.6 (sistema inducible por tetraciclina). EL cultivo se efectuó en medio de Becas suplementado con suero fetal bovino a 28°C. Los cultivos se inician con 5×10^6 células/ml y se lo repican antes que salgan de la fase exponencial dentro de las 48 horas. Para el caso de la cepa 29.13.6 se agregan los antibióticos higromicina B (10-50 µg/ml) y G418 (2,5-5 µg/ml), para asegurarse de mantener la cepa estables.

Preparación de extractos protéicos de parásitos.

En el trabajo se utilizan extractos solubles o clarificados (S100). La preparación de estos extractos es muy sencilla. Se cosechan los parásitos 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.

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

Preparación de RNA total.

Pellets de parásitos, 10^8 células, se resuspenden en 1 ml de TRIZOL (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se conserva mejor en ETOH a -70°C, por lo cual es preferible conservar la mayor cantidad de muestra en este estado y sólo precipitar, lavar y resuspender en agua sólo la cantidad necesaria para cada experimento.

4.- Manipulación de ácidos nucleicos.

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:isoamílico 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:isoamílico (24:1), 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.

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.

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 temperaturas recomendadas por el fabricante.

Secuenciación de DNA. La secuenciación de ADN se realizó por distintos servicios dedicados a esta tarea.

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 inocula a 7 ml de LB en Erlenmeyer de 125 ml. Se crece con agitación a 37°C hasta una $\text{DO}_{550\text{nm}}=0.3$. **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 $\text{DO}_{550\text{nm}}=0.48$ 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 TfbI 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 *ependorf* 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.

TfbI: 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.

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.

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.

Preparación de DNA plasmídico.

Minipreparación de alta pureza 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.

Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* con el sistema pET-19b(+)

Concepto La serie de plásmidos pET-19b(+) 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 hsdSB (rB- mB-) gal (DE3) dcm pLysS, (camR)). 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, camR) 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 pET-19b(+). 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.

Los distintos productos de PCR se subclonaron en los sitios NdeI – BamHI. Los oligonucleótidos utilizados son los mismos que para el sistema de levaduras (ver nota en ese protocolo)

Protocolo

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 DO600 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 sonicar 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.

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 lizozima 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 μ g/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.

Purificación de los cuerpos de inclusión (proteína insoluble)

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.

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 DO280 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.

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.

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 alícuota en pequeñas fracciones (5, 10, 50 µl) y se guardan a -70°C, hasta su uso.

6. Anticuerpos: obtención y usos.

Obtención de anticuerpos.

anti-HA (Roche), el anticuerpo 3F10, hecho en rata.

anti BB2 es un anticuerpo monoclonal realizado en ratón, que reconoce un epitope de la proteína Ty1 de *S. cerevisiae*. Cedido por el lab. del Dr. Matthews

KMX-1, es un anticuerpo monoclonal que reconoce la beta-tubulina. Cedido por el lab. del Dr. Gull.

anti-REAP, es un anticuerpo q reconoce a la proteina asociada al complejo de Edicion del ARN, con localización exclusivamente mitocondrial, obtenido de conejo.

YL½: anticuerpo monoclonal realizado en raton que reconoce la tubulina tirosinada.

5E9: anticuerpo monoclonal de ratón, que reconoce polipéptidos de PFR de *T. brucei*.

Anti-HSP70, anticuerpo policlonal de conejo, reconoce la HSP70 de *T. brucei*

Anti-La, anticuerpo policlonal de rata, reconoce la proteina La de *T. brucei*

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.

Se incuba con una dilución del primer anticuerpo 1-2 hs a temperatura ambiente con agitación (ON a 4°C preferentemente). 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.

Southern blot.

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.

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.

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 µg/ml.

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.

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.

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 horno 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.

Lavados. Los lavados son con solución SSC cada vez más diluida 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.

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/phosphoimager 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.

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.

Marcación de la sonda. Si la sonda es mayor de 200 pb, se usa "random priming" con $\alpha(32P)$ -dCTP marcado o marcación por PCR, las sondas se realizaron con los siguientes oligos y presentan estas características,

TSR1 RS SONDA (499pb)

SR-PROB-F: 5'AATTATTGGCTTCCGTCGCCGT-3'

SR-PROB-R: 5'CTAATCTCGGCGTTTGCGGTAAT-3'

TBSRPK SONDA C-END (555pb)

K-PROB-F: 5'GTCTCAACGCCGTCGCTACTAC-3'

K-PROB-R: 5'TCCAAGCCCCAGAAATTAAGATCC-3'

Se realiza según las instrucciones del proveedor del *kit*. Si la sonda es un oligonucleótido, se marca con T4 polinucleótido quinasa y γ (32P)-ATP. Separar la marca libre de la sonda mediante columnas SP6 (Amersham) o similares.

Importante!: comprar marcadores defosforilados

Chromo Blot (PFGE, FIGE, ChEF)

10⁸ células se recuperan y lavan 2 veces con PBS1x durante 5 min a 4°C, para resuspenderlas en un volumen final de 500µl de PBS1x. Luego se agregan 500 µl de PBS agarosa 1,4% a 50°C, en hielo, llegando a un volumen final de 1 ml de PBS Agarosa 0,7%. En un molde a temperatura ambiente, se agregan 100 µl por pocillo, y se los deja por 2 min, para ponerlos en hilo durante 10 minutos mas. Los bloques se colocan en un falcon de 50 ml con 1 ml de buffer de lisis por cada bloque (0,5M EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCl; 1% sarkosyl). Agregar la proteinasa K a una concentración final de 1 mg/ml y dejar "over-night" a temperatura ambiente. Al otro día cambiar el buffer de lisis +proteinasa K, y dejar nuevamente "over-night" a temp. ambiente. Al otro día lavar 2 veces con 50 ml de buffer TE durante 20 min a temperatura ambiente en suave agitación. Finalmente agregar 15 ml de TE y guardar a 4°C. Para conservar los bloques por mas tiempo es recomendable ajustar la concentración de EDTA a 0,5 M.

Los bloques se fijan a un gel de agarosa 0,7% TBE 0,5x, y se corre durante 16-20 horas utilizando una fuente de poder capaz de invertir la polaridad de los electrodos en pulsos cortos. Generalmente se utilizan como condiciones 5 V/cm con un intervalo de pulsos de 0,025-0,505/seg (adelante) y 0,01-0,202/seg (atrás). Estas condiciones varían según la fuente y programas utilizados. Finalizada la corrida, se tiñe el gel con BrEt. Optativamente se puede transferir una membrana de Nitrocelulosa de la misma forma que se describe para Southern Blot.

En el análisis de integridad genómica se utilizó como sonda un fragmento del elemento repetitivo INGI de *T. brucei*. Los oligos utilizados para amplificar dicho fragmento a partir de ADN genómico de parásitos son: **INGI-FW** 5 GAAATTCATGCTGATGTGTGAG 3 e **INGI-RV** 5 GGGATATCCACTGCAGGTGTTGC 3

8. Secuencias de genes utilizadas

Para todos los experimentos utilizamos las secuencias proporcionadas por el proyecto genomas (www.genedb.org) correspondientes a los siguientes números de acceso: TSR1: Tb927.8.900, TcSR: Tc00.1047053509607.30/Tc00.1047053503715.10, TcSRPK: Tc00.1047053506945.220 y TbSRPK: Tb927.6.4970.

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

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).

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'-CATATGCCGAAGTTTAAACAAG-3'
2. **BamHI *tcsrpk* STOP reverse:** 5'-GGATCCTCAATCGCTCCCAGCGTCA-3'
3. **BamHI *tcsrpk*Δ586STOP reverse:** 5'-GGATCCTTAAACCATTTCACGATCGGC-3'
4. **BamHI *tcsrpk*Δ652STOP reverse:** 5'- GGATCCATCTAGCTAGCTGAGTCCACG-3'
5. **BamHI *tcsrpk*Δ664STOP reverse:** 5'-GGATCCTATAATTCTTTTCTGCG-3'

tsr1

6. **NdeI *tcsr* ATG sense:** 5'-CATATGAAAACAACGTCCGTTTTT-3'
7. **BamHI *tcsr* STOP reverse:** 5'-GGATCCTCACGATCGACTACTATAACT-3'
8. **NdeI *tsr1* ATG sense:** 5'-CATATGGATTCCAGAGACGGGAGTG-3'
9. **BamHI *tsr1* STOP reverse:** 5'-GGATCCTAATCTCGGCGTTTGCGGT-3'
10. **BamHI *tsr1*Δrs STOP reverse:** 5'-GGATCCATCTGCCACGGCTACCGC-3'

Primers 1 y 2 para el gen completo *tcsrpk*, 1 y 3 para mutante Δ586, 1 y 4 para mutante Δ652, 1 y 5 para mutante Δ664, primers 6 y 7 para gen completo *tcsr*, 8 y 9 para *tsr1*, gen completo y finalmente 8 y 10 para mutante *tsr1*ΔRS.

NOTA: Para la expresión de las SRPK en bacterias se subclonaron los mismos productos obtenidos con la misma combinación de oligos, en el vector pET19b con la misma combinación de enzimas.

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 10⁶ 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 µg de plásmido en 15 µl de buffer TE (aprox. 70 ng/µl) a 100 µl de suspensión de células, se agregan 290 µl de 50% PEG 3350 y se incuban por 1h a 30°C con vortexeo 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. Plaquear 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).

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 \ll 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 estría una colonia obtenida en la transformación a una placa fresca de EMM2 con tiamina. En el caso de los controles (pREP1/-) 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.- Desarrollo de líneas transgénicas en *T. cruzi* y *T. brucei*

Líneas estables de epimastigotes de *T. cruzi*: Se crecieron epimastigotes de la cepa CL Brenner hasta fase exponencial en LIT (10^7 células/ml). Se cosechan a 3500rpm durante 5 min, y se lavan con PBS1x estéril 2 veces. 10^8 células se resuspenden en 350 μ l de buffer de electroporación (PBS1x + 0,5mM MgCl₂ + 0,1mM CaCl₂) y se ponen en una cubeta junto a 50 μ l de ADN (1mg/ml), durante 15 min en hielo y se realiza una electroporación a 400mV y 500 μ F con dos pulsos sucesivos, posteriormente se ponen en hielo durante 10 min. Las muestras ahora se transfieren a botellas de cultivo con 5 ml de LIT 10% SFB. A las 24 se agrega G418 a una concentración final de 50 μ g/ml, y se va aumentando hasta llegar a 500 μ g/ml inclusive. La selección se da por concluida 4 semanas después aproximadamente, cuando el 100% de los parásitos transfectados con la construcción pTREX-GFP expresan la proteína verde.

Las construcciones presentan el marco abierto de lectura de TcSRPK y TcSR en ambas orientaciones, clonados en el sitio EcoRI. Los primers utilizados son los mismos que los utilizados en levaduras, subclonados en pGEMT easy. La construcción pGEM-TcSR y pGEM-TcSRPK se digieren con EcoRI, y se purifica el fragmento para posteriormente ligarlo en pTREX-A linealizado con EcoRI. Posteriormente se selecciona mediante mapeo de restricción y secuenciación de la construcción, la orientación del ORF, quedando tanto en orientación sentido (para la Sobre-expresión) y anti-sentido (el silenciamiento).

Transfección y clonado de formas procíclicas de *T. Brucei*

El protocolo de transfección para las formas procíclicas de *T. brucei* es similar al de epimastigotes de *T. cruzi*, con la salvedad que el medio utilizado es el medio de Beck, y en vez lugar de PBS1x se utiliza cytomix. En lo que refiere a los parámetros del electroporador se aplican 2 pulsos de 400 mV 1500µF (ver Djikeng, *et al.* 2004. Analysis of gene function in *Trypanosoma brucei* using RNA interference. Methods Mol. Biol. 265:73–83). A las 12 horas de realizada la transfección se agregan los antibióticos necesarios a las siguientes concentraciones finales: Bleomicina e higromicina B 10µg/ml, G418 50µg/ml y Fleomicina 2,5 µg/ml. Todas las poblaciones se clonaron mediante el método de diluciones mínimas sucesivas.

Knock-out y fusion de epitopes por recombinación homóloga en *T. brucei*:

Como desarrollamos en la seccion Resultados Parte I, se utilizo un sistema basado en la transfección de parasitos con un producto de PCR. Los oligonucleótidos utilizados son:

A) TSR KO BSR fwd

5'caatagtaataataataacaataaagaaggaaagtaattaaggaagaaagaaagaagaggaaaaggagagtctctgtgccgtttcaaaaagatggccaagcctttgtctcaagaagaatc-3'

B) TSR1 KO BSR rev

5'gaaacaacaacaactaacctccagcacactgcaagaaagagccacgcccgttccaccgaacgcccctctccccctccgctttgttcagttagccctcccacacataaccagagggcag

C) TSR KO HYG Fwd

5'caatagtaataataataacaataaagaaggaaagtaattaaggaagaaagaaagaagaggaaaaggagagtctctgtgccgtttcaaaaagatgaaaaagcctgaactcaccgacgacgc-3'

D) TSR KO HYG REV

5'cacgatccgcagcccaataacgtatgttgaaaagtatatatatatatatgtacgtgtgtatgtttttgttgccgatccttattctattcctttgccctcggacgagtgctgg-3'

E) TbSRPK KO BSR FWD

5'catctatatctgtatagggcatatagatattctacatttattatatatagagtagcgctgcacaaggcgtgtaaaggggcccgtactagtctaattggccaagcctttgtctcaagaagaatc-3'

F) TbSRPK KO BSR REV

5'cacgatccgcagcccaataacgtatgttgaaaagtatatatatatatatgtacgtgtgtatgtttttgttgccgatccttatttagccctcccacacataaccagagggcag-3'

G) TbSRPK KO HYGRO FWD

5'catctatatctgtatagggcatatagatattctacatttattatatatagagtagcgctgcacaaggcgtgtaaaggggcccgtactagtctaattgaaaaagcctgaactcaccgacgacgc-3'

H) TbSRPK KO HYGRO REV

5'cacgatccgcagcccaataacgtatgttgaaaagtatatatatatatatgtacgtgtgtatgtttttgttgccgatccttattctattcctttgccctcggacgagtgctgg-3'

Con las combinaciones A+B y E+F se utiliza como ADN molde en una reacción de PCR, un casete que contiene el gen de resistencia para bleomicina. C+D y G+H se utilizan con un templado con el gen de resistencia para higromicina B. El programa de ciclado consta de 34 ciclos de amplificación donde cada uno de estos esta fomado por un paso de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 2-3 min a 72°C, con un ciclo final de 10 min a 72°C. Se realiza una reacción de 500 µl a fin de obtener aproximadamente 10 µg de ADN. Entre 2-5 µg se transfectan directamente en 10⁷ células.

Los transfectantes estables se confirmaron mediante PCR sobre el ADN genómico utilizando los oligos

K-KOCTR-R - 5'-CACACCTCATAACACCTTCATGCTA-3'

K-KOCTR-F - 5'-TTACAAATGGCAAAGCATATTGGC-3'

S-KOCTR-R - 5'-CGACAGGACACAATAGTAATTGAACACA-3'

S-KOCTR-F - 5'-CACGCTGCTATCACTATACGAGAGG-3'

Para las fusiones de epítopes de los genes de TSR1 y TbSRPK se utilizaron los siguientes casetes y oligos:

Fusión C terminal de HA a TSR1 (BSR-HA)

SRHAB-FW

5'GCGGGACCGCAGACGTCGGGAGCGCAGTCGAAGCGCAAGCAGCGGCTCCAGGT
CTGGCAGTGAAAATTACCGCAAACGCCGAGATTACCCATACGACGTCCCAGACTAC
GC-3'

SRHAB-RV

5'AACAACAACAACCTCCAGCACACTGCAAGAAAGAGCCACGCCGCTTCCACC
CGAACGCCCTCCTCCCCCTCCGCCTTTGTTTCAGTTAGCCCTCCCACACATAACC
AGAGGGCAG-3'

Fusion N terminal de HA a TSR1 (HA-BSR)

A) TSR KO BSR fwd

5'CAATAGTAATAATAATAACAATAAAGAAGGAAAGTAATTAAGGAAGAAAGAAAGAA
GAGGAAAAGGAGAGTCTCTGTGCCGTTTCAAAAAGATGGCCAAGCCTTTGTCTCAA
GAAGAATC-3'

TSRNHA-R

5'GCTGTTCTTTGCTGATTGTAGAGGCGGCTGGGCGGAGGCCAATGTACAATGATAC
CACTTCTGGGTTATCACTTCCACTCCCGTCTCTGGAATCCTCGAGAGCGTAGTCTG
GGACGTCGTATGGGTACAT-3'

Fusión N-terminal de BB2 a TcSRPK (G418-BB2)

En este caso primero se realizan 2 PCR, una que amplifique el casete entero de G418-BB2 con los oligos XGNEO FW TbK y Junction Rev, y otra reacción sobre ADN genómico de *T. cruzi* con los oligos Junction Fw y XGTCK REV. Luego se toman 2 µl de cada una de estas reacciones y se realiza una nueva PCR pero ahora utilizando los oligos XGNEO y XGTCK. Es recomendable realizar 5 ciclos de amplificación y recién ahí agregar los oligos, dejándolos otros 30 ciclos de amplificación. Todos los productos de las PCR se analizan mediante geles de agarosa y se confirma su identidad por mapeo de restricción.

XGNEO FW TbK

5'CATCTATATCTGTATAGGCATATAGATATTCTACATTTATTATATATAGAGTAGCGT
CGACAAGGCGTGTAAAGGGGCCGTACCTAGTCTAATGATTGAACAAGATGGATTGC
ACGCAGGT-3'

JUNCTION REV

5'CGTTTTCTTGTTAAACTTCGG GTCAAGTGGATCCTGGTTAGTATGGACCTC-3'

JUNCTION FWD

5'GAGGTCCATACTAACCAGGATCCACTTGACCCGAAGTTTAAACAAGAAAACG-3'

XGTCK REV

5'CACGATCCGCAGCCCAATAACGTATGTTGGAAAAGTATATATATATATATATGTAC
GTGTGTATGTTTTTGTGGCCGATCCTTATTTCAATCGCTCCCAACGTCACCGATGC
TGTTG-3'

Construcciones para ARNinterferencia:

El vector utilizado es el pLEW100/stuffer donde se subclona en direcciones opuestas y enfrentadas un mismo fragmento correspondiente a la region 5' del ARNm blanco. Para el caso de TSR1 se utilizaron los siguientes oligos TSRintra FW 5'-AACAAGCTTGGATCCAGAGACGGGAGTGGAAAGT-3' y TSRintra RV 5'-AACTCTAGACTCGAGTTTACTGCGAGTTC-3' abarcando los nucleótidos 7-477 del marco abierto de lectura de *tsr1*. Por otro lado para TbSRPK se utilizaron los oligos

siguientes, K-Intrf-F. 5'-AACAAAGCTTGGATCCCCGACCCGACAGAAGAGCA-3' y K-Intrf-R 5'AACTCTAGACTCGAGTCCTCACCGCTACCGTCC 3' abarcando los nucleótidos 4-412 del marco abierto de lectura de *tbsrpk*. Obtenidas y confirmadas las construcciones, se linearizan las construcciones mediante digestión de las mismas con NotI, previo a su transfección. Una vez seleccionados los parásitos estables, se induce el ARNi por el agregado de tetraciclina al medio (conc. final 5µg/ml). Posteriormente se confirma mediante Northern Blot los niveles del ARNm blanco.

11.- Análisis del ARn por “*primer extensión*” y RT-PCR

Primer Extensión: 4 µg de ARN total por experimento, junto a los oligos SL22in y U2-65 marcados (no menos de 500000 cpm/µl cada uno) se dejan durante 10 min a 70°C. Posteriormente se lo deja en hielo durante 10 min y se agrega el mix de reacción conteniendo el buffer de la RT, los dNTPs y la Transcriptasa reversa (RT) en las proporciones indicadas según el fabricante de cada kit. Dejándolos durante 1-1,5 hs a 42°C. Para detener la reacción se agregan 20 µl de PE stop buffer (0,6 M ClNa, 20mM EDTA, pH 8.0), 1µl Glycogen y 120 µl de etanol. Se centrifuga durante 15 min a 14000 rpm. El pellet se lava con etanol 70% dos veces y se deja secar. El pellet se resuspende en 5 µl de Urea dye y se corren las muestras en un gel 10% desnaturalizante de archilamida – 7M urea. Se seca el gel y se expone en una pantalla de phosphoimager o una placa de radiográfica. El oligo U2-65, se utiliza como referencia para relativizar las intensidades entre calles.

RT-PCR: Para los ensayos de RT-PCR semicuantitativa ARN total de células TSR1 RNAi no inducidas o inducidas durante 12 y 72 hs, se sometió a una reacción de transcripción reversa (oligo: poli-T). Posteriormente, 1 µl del ADNc, se utilizó como templado en una reacción PCR con los juegos de oligos específicos para amplificar fragmentos correspondientes al pre-ARNm ó al ARNm maduro del gen de PAP. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa 2% y se cuantificó la intensidad de las bandas). Paralelamente, se amplificó un fragmento del ARN ribosomal 28S-alfa (tem.1.40) a fin de determinar la carga en cada calle. Como control, se realizaron reacciones de RT-PCR, con los mismos juegos de oligos pero sin el agregado de la transcriptasa reversa en la reacción de síntesis de la cadena de cADN. El número de ciclos donde la amplificación mantiene una relación lineal, se determinó experimentalmente resolviendo en un gel de agarosa 2% muestras de la reacción de amplificación tomada cada 3 ciclos.

- 1) PAP-3-RV 5'-ATCGACAGCTGTGCCTCTG-3'
 - 2) PAP-5-FW 5'-CCCAACGAAACCACTAGAGG-3'
 - 3) PAP-IN2FW 5'-TCTTCCTTCGTTAATGATGTG-3'
 - 4) 28S-FW 5'GAGGCACCAAGTGGGCCTTCTTC-3'
 - 5) 28S-RV 5'ACGCCAACCAAGATCTGCACTAG-3'
- ARNm maduro: 1+2, fragmento de 388 pb
 Pre-ARNm: 1+3, fragmento de 399 pb
 rARN: 4+5, fragmento de 383pb

El ciclado de la amplificación fue el siguiente: 94°C por 30 seg; 53°C por 30 seg; y 72°C por 20 seg. En el caso de 1+2, se amplificó durante 24 ciclos, mientras que para la combinación 1+3 se repitió este ciclo 35 veces. Para 4+5, 25 ciclos.

12.- Ensayos de fosforilación *in vitro*

Se utilizó 1 µg de sustrato. Se incubaron (o no, control negativo) con alrededor de 50 ng de enzima TcSRPK y mutantes, en un volumen final de 25 µl, a 30°C por 30 minutos. La reacción se detuvo por agregado de 5 µl de "cracking buffer" o buffer de Laemmli 6x y posterior hervido de las muestras. Las reacciones se sembraron en un gel SDS-PAGE de 15%, y fueron transferidas a membranas de PVDF como se explicó para Western blot, y reveladas 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. 2 ml de cultivo (4×10^7 células aprox.) se cosechan a 3500 rpm y se lavan con PBS
 2. Resuspender las células en 400 µl de medio fresco, agregar 100 µl en cada posillo del portaobjetos y dejar durante 5 minutos para que se adhieran.
 3. Agregar 100 µl de paraformaldehído helado y fijara durante 15 min en hielo.
 4. lavar 2 veces con PBS++ (PBS + 150µM CaCl₂ + 5 mM MgCl₂) durante 3 min en hielo.
 5. Permeabilizar las células con 200 µl de Tritón X-100 0.1%, PBS++ por 10 min ambienten hielo.
 6. lavar con PBS++ idem 4
 7. Bloquear con 100 µl de suero de cabra/PBS++ durante 15 min en hielo
 8. Incubar con 50 µl del 1^{er} anticuerpo (1/100 para YL $\frac{1}{2}$; 1:2500 para E9 (PFR); 1:5 para KMX-1, 1:500 para La; 1:500 para HSP70; 1:200 para REAP) en PBS++-BSA 3%, 30 min a temperatura ambiente
 9. Lavar 5 veces con PBS++ durante 3 min c/u en hielo.
 10. Incubar con 40 µl del 2^{do} anticuerpo correspondiente (Alexa red y Alexa green, anti-ratón, conejo y rata) Dilución 1/1000 en PBS++-BSA 3%, 30 minutos a temperatura ambiente.
 11. Lavar 5 veces con PBS++ durante 3 min en hielo.
- Montar los preparados con 5 µl de fluoromount/DAPI en cada punto y cubrir con un cubreobjetos circular. (DAPI 1:2000)

Controles importantes:

1. Incubar sólo con 2do anticuerpo (FITC),
2. suero preinmune,
- . primer anticuerpo solo.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

A

- Agabian, N. 1990. *Cell* 61, p.1157.
 Ajuh, P., B. et al. 2000. *The EMBO journal* 19:6569
 Aksov, S. 1992. *Nucleic Acids Res.* 20, p.913.
 Aly, R.M.; et al. 1994 *Nucleic Acids Res.* 22, p.2922.
 Amrein, H.; et al. 1994 *Cell.* 76, p.735.
 Andrews, N.W. et al. 1998. *J. Exp. Med.* 167, p.300.
 Archambault J, Friesen JD. *Microbiol Rev* 1993;57:703-24.
 Ausubel, F.M.; et al.1997. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

B

- Baldauf SL, et al. *Science* 2000;290:972-7.
 Bandziulis, R.J.; et al. 1989 *Genes Dev.* 3, p.431.
 Bangs JD, et al. *J Biol Chem* 1992;267:9805-15.
 Bastin, P., K. R. Matthews, and K. Gull. 1996. *Parasitology today (Personal ed)* 12:302-307
 Ben Amar, M.F.; et al. 1991. *Nucleic Acids Res.* 19, 5857.
 Benne, R. 1994. *Eur. J. Biochem.* 221, p.9.
 Benne, R.; et al. 1986. *Cell.* 46, p.819.
 Ben-Yehuda, et al. 1998. *RNA (New York, N.Y)* 4:1304-1312
 Ben-Yehuda, et al. 2000. *Genetics* 154:61-71.
 Ben-Yehuda, S., et al. 2000. *Genetics* 156:1503-1517.
 Berberof, et al. 1995. *EMBO J.* 14, p.2925.
 Birnboim, H.C.; and Doly, J. 1979. *Nucleic Acids Res.* 7, p.1513.
 Black, D.L. (1995) *RNA* 1, 763-771
 Blaustein, M. et al. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Dec;12(12):1037-44
 Blencowe, B.J. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25, 106-110
 Blencowe, B.J., et al. 1999 *Biochem. Cell Biol.* 77, 277-291
 Blum, R.; Bakalara, N.; and Simpson, L. 1990. *Cell.* 60, p.189.
 Boothroyd, J.C.; and Cross, G.A.M. 1982. *Gene.* 20, p.281.
 Boucher, L., et al. 2001 *RNA* 7, 1693-1701
 Boukis, L. A., et al. 2004 *The Journal of biological chemistry* 279:29647-29653
 Bourgeois, C.F., Lejeune, F. and Stevenin, J. (2004) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 78, 37-88
 Bruce, D. 1895. Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand. Bennet and David, Durban. 28.
 Bruzik, J.P.; and Maniatis, T. 1992. *Nature.* 360, p.692.
 Bruzik, J.P.; and Steitz, J.A. 1990. *Cell.* 62, p.889.
 Burge, C.B.; Tuschl, T.; and Sharp, P.A. 1999. In Gestelang, R.F.; Cech, T.R.; Atkins, J.F. 1999 (2nd edition). *The RNA World.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. USA.
 Burns, C. G., et al. 2002. *Molecular and cellular biology* 22:801-815.

C

- Caceres, J.F., et al. 1997 *J. Cell Biol.* 138, 225-238
 Caceres, J.F., Sreaton, G.R. and Krainer, A.R. (1998) *Genes Dev.* 12, 55-66
 Cáceres, J.F.; and Krainer, A.R. 1993. *EMBO J.* 12:4727
 Cáceres, J.F.; and Krainer, A.R. 1999. In Krainer, A. *Eukaryotic mRNA Processing.* 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.
 Cáceres, J.F.; et al. 1994 *Science.* 265, p.1706.
 Cao, W.; Jamison, S.F.; and García-Blanco, M. A. 1997. *RNA* 12, p.1456.
 Caputi, M.; et al.. 1994. *Nucleic Acids Res.* 22, p.1018.
 Cavaloc, Y., et al. 1994 *EMBO J.* 13, p.2639.
 Cazalla, D., et al. 2002 *Mol. Cell. Biol.* 22, 6871-6882
 Chung, H.M.; et al. 1992. *Parasitol. Today.* 8, p.414.
 Clayton CE. *EMBO J* 2002;21:1881. [PubMed: 11953307]
 Clayton, C.E. 1985. *EMBO J.* 4, p.2997
 Clayton, C.E. 1992. *Nucleic Acids Res.* 43, p.37.
 Clayton, C.E.; et al.1990. *Mol. Cell. Biol.* 10, p.30.
 Cole, F.J. 1926. *The History of Protozoology.* London.
 Colwill, K.; et al. 1996bis. *J. Biol. Chem.* 271, p.24569.

- Colwill, K.; et al. 1996. *EMBO J.* 15, p.265.
 Cornelissen, et al. 1991 *Noca Acta Leopold.* 279, p.215.
 Cramer, P.; et al. 1999. *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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, p.2703.

D, E

- Dahan, O., and M. Kupiec. 2004. *Nucleic acids research* 32:2529-2540
 Davis, R.E.; et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, p.20026.
 Diamond, R.H.; et al. *J. Biol. Chem.* 268, p.15185.
 Ding JH, et al. 2006 *Mol Biol Cell.* Feb;17(2):876-85.
 Duncan, P.L.; et al. 1997 *Mol. Cell. Biol.* 10, p.5996.
 Elliott, D.J.; et al. 2000. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, p.5717.
 Erondy, N.E.; and Donelson, J.E. 1992. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, p.111.
 Evers R, et al. 1989 *Cell* ;56:585-97.
 Evers, R.; et al. 1989. *Cell.* 56, p.585.

F

- Fantes, P.A. 1989. In Nasim A., P. Young, B.F. Johnson (ed.), *Molecular biology of the fission yeast.* Academic Press, San Diego.
 Feagin, J.E.; and Stuart, K. 1988. *Mol. Cell. Biol.* 8, p.1259.
 Frank, D.; and Guthrie, C. 1992. *Genes Dev.* 6, p.2112.
 Fu, X. D. 1995. *RNA (New York, N.Y)* 1:663-680.
 Fu, X.-D.; and Maniatis, T. 1990. *Nature.* 343, p.437.
 Fu, X.-D.; and Maniatis, T. 1992. *Science.* 256, p.535.
 Fu, X.-D.; Mayeda, A.; Maniatis, T.; and Krainer, A.R. 1992bis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, p.11224.
 Fukuda, M.; et al. 1997. *Nature* 390, p.308.
 Furdon, P.J.; and Kole, R. 1988. *Mol. Cell. Biol.* 8, p.860.
 Furuyama, S., and J. P. Bruzik. 2002. *Molecular and cellular biology* 22:5337

G

- Gale, M.; Carter, V.; and Parsons, M. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, p.31659.
 Gallego, M.E., Gattoni, R., Stevenin, J., Marie, J. and Expert-Bezancon, A. (1997) *EMBO J.* 16, 1772-1784
 Ge, H.; and Manley, J.L. 1990. A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-RNA *in vitro.* *Cell.* 62, p.25. Ge, H.;
 Gilbert, W.; Siebel, C.W.; and Guthrie, C. 2001. Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA.* 7, p.302.
 Gilinger G, Bellofatto V. 2001 *Nucl Acids Res* ;29:1556-64.
 Gómez, E.B.; et al. 2001. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, p.97
 Gottesdiener, K.; et al. 1991 *Mol. Cell. Biol.* 11, p.2467.
 Grant, P.T.; Sargent, J.R.; and Ryley, J.F. 1961. *Biochem J.* 81, p.200.
 Graveley, B.R. (2000) *RNA* 6, 1197-1211
 Green, M.R. 1991. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7, p.559.
 Gui, J. G.; et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, p.10824.
 Gui, J. G.; Lane, W. S.; and Fu, X.-D. 1994. *Nature* 369, p.678.
 Gunzl A, et al. 2003 *Eukaryotic Cell*;2:542-51.

H

- Hajduk, S.L.; and Sabatini, R.S. 1996. In Smith, D.F.; and Parsons, M. 1996. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa.* IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.
 Hammarton, T. C., M. Engstler, and J. C. Mottram. 2004. *The Journal of biological chemistry* 279:24757-2476
 Hanamura, A., et al. 1998 *RNA* 4, 430-444
 Hastings, M.L. and Krainer, A.R. 2001 *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 302-309
 Hastings, M.L.; and Krainer, A.R. 2001. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, p.302
 Hehl, A.; et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, p.370.
 Hendriks, E. F., et al. 2001. *The EMBO journal* 20:6700-6711
 Hoare, C.A. 1972. *The Trypanosomes of Mammals: a Zoological Monograph.* Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 Huang Y, Maraia RJ. 2001 *Nucl Acids Res*;29:2675-90.
 Huang, J.L., and Van der Ploeg, L.H.T. 1991bis. *EMBO J.* 10, p.3877.
 Huang, J.L.; and Van der Ploeg, L.H.T. 1991. *Mol. Cell. Biol.* 11, p.3180.

- Huang, Y. and Steitz, J.A. 2001 *Mol. Cell* 7, 899-905
 Huang, Y., et al. 2003 *Mol. Cell* 11, 837-843
 Hug, M.; et al. 1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, p.87.
 Hug, M.; et al. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14, p.7428.

I, J

- Ishihama A, Kimura M, Mitsuzawa H.1998 *Curr Opin Microbiol*;1:190-6.
 Ismaili, N., D. et al.. 1999.. *Molecular and biochemical parasitology* 102:103-115
 Ismaili, N.; et al. 2000 *Mol. Biochem Parasitol.* 106, p.109.
 Janz, L.; Hug, M.; and Clayton, C. 1994. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, p.99.
 Jefferies, D.; et al. 1993. *Nucleic Acids Res.* 21, p.191.
 Jefferies, D.; Tebabi, P.; and Pays, E. 1991. *Mol. Cell. Biol.* 11, p.338.
 Jess, W.; Hammer, A.; and Cornelissen A.C.W.A. 1989. *FEBS lett.* 249, p.123.
 Jumaa, H. and Nielsen, P.J. (1997) *EMBO J.* 16, 5077
 Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003) *Mol. Cell* 12, 5

K

- Kadener, S.; et al. 2001. *EMBO J.* 20, p.5759.
 Kanopka, A., Muhlemann, O. and Akusjarvi, G. (1996) *Nature (London)* 381, 535-538
 Kapotas, N.; and Bellofatto, V. 1993. *Nucleic Acids Res.* 16, p.4067.
 Kataoka, N., Bachorik, J.L. and Dreyfuss, G. 1999 *J. Cell Biol.* 145, 1145
 Kelly S, Wickstead B, Gull K. 2005 *Biochem Soc Trans*;33:1435-7.
 Kenan, D.J; Query, C.C; and Keene, J.D. 1991.*Trends Biochem Sci.* 16, p.214.
 Kim, Y.-J.; et al. 1992. *Genes Dev.* 6, p.2569.
 Köck, J.; et al. 1988 *Nucleic Acids Res.* 16, p.8753.
 Koenig, E.; et al. 1989 *Nucleic Acids Res.* 17, p.8727.
 Kohtz JD, et al. 1994. *Nature* ;368:119-24.
 Kooter, J.M.; and Borst, P. 1984. *Nucleic Acids Res.* 12, p.9457.
 Krainer, A.R.; and Maniatis, T. 1988. 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. *Genes Dev.* 4, p.1158.
 Krainer, A.R.; Conway, G.C.; and Kozak, D. 1990bis. *Cell.* 62, p.35.
 Krainer, A.R.; et al. 1991. *Cell.* 66, p.383.
 Kramer, A. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65, 367-409
 Krämer, A. 1993. *Mol. Biol. Rep.* 18, p.93.
 Krause, M.; and Hirsh, D. 1987. *Cell.* 49, p.753.
 Kumar, P., and C. C. Wang. 2006. *Eukaryotic cell* 5:92-102.

L

- Lai, M.C., et al. 2000 *J. Biol. Chem.* 275, 7950-7957
 Lai, M.C.; Lin, R.I.; and Tarn, W.Y. 2001..*Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, p.154.
 Laird, P.W.; et al. 1987.. *EMBO J.* 6, p.1055.
 Lamm, G.; and Lammond, A.I. 1993. *Biochim. Biophys. Acta.* 1173, p.247.
 Lamond, A.I. and Spector, D.L. 2003 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 605-612
 Laveran, A.; and Mesnil, F. 1907. Balliére, Tindall and Cox. London.
 Lavigner, A.; et al. (1993) *Genes Dev.* 7, p.2405.
 Layden, R.E.; and Eisen, H. 1988. *Mol. Cell. Biol.* 8, p.1352.
 Le Hir, H., et al. 2001 *EMBO J.* 20, 4987-4997
 LeBowitz, J et al. 1993 *Dev.* 7, p.996.
 Lee, M.G. 1996. *Mol. Cell. Biol.* 16, p.1220.
 Lemaire, R., et al., 2002. *Genes & development* 16:594-607
 Li, H. and Tschudi, C. 2005 *Mol Cell Biol.* Mar;25(6):2216-26
 Li, X., J. Wang, and J. L. Manley. 2005. *Genes & development* 19:2705-2714
 Liang, X. H., et al.. 2006. *Molecular and biochemical parasitology* 145:29-39
 Loyer, P., J. H. et al. 2005. *Cellular signalling* 17:1033-1051
 Lukes, J., et al.2002 *Eukaryotic Cell* 1, 495-502.
 Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. 1992 *Nature*;356:83-5.
 Lykke-Andersen, J., Shu, M.D. and Steitz, J.A. 2001 *Science* 293, 1836

M

- Madison-Antenucci, S., Grams, J. & Hajduk, S. L. 2002 *Cell* 108, 435-438.
 Mair, G.; et al. 2000. *RNA.* 2000 6, p.163.

- Makarova, O.V., Makarov, E.M. and Luhrmann, R. (2001) *EMBO J.* 20, 2553-2563
- Mardon, H.J., Sebastio, G., and Baralle, F.E. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, p.7725.
- Martinez- et al.2004. *Eukaryot Cell*;3:506. [PubMed:15075279]
- Martinez-Calvillo S, et al. 2003 *Mol Cell*;11:1291. [PubMed: 12769852]
- Maslov, D.A.; et al.1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, p.127.
- Matthews, K.R.; Tschudi, C.; and Ullu, E. 1994. *Genes Dev.* 8, p.491.
- Mayeda, A.; and Krainer, A.R. 1992. *Cell.* 68, p.365.
- Mayeda, A.; et al. 1992bis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, p.1301.
- McConville, M.J.; and Fergusson, M.A.J. 1993. *Biochem J.* 294, p.305.
- Mermoud, J.E.; Cohen, P.T.W.; and Lammond, A.I. 1992. *Nucleic Acids Res.* 20, p.5263.
- Mermoud, J.E.; Cohen, P.T.W.; and Lammond, A.I. 1994. *EMBO J.* 13, p.3679.
- Misteli, T.; and Spector, D.L. 1996. *Mol. Biol. Cell* 7, p.1559.
- Misteli, T.; Cáceres, J.F.; and Spector, D.L. 1997. *Nature* 387, p.523.
- Molineux, D.H. 1997. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. Hide, G.; Mottram, G.H.; and Holmes, P.H. p.39.
- Morris, D.R.; et al. 1993 *Biochemistry* 32, p.2931.
- Murphy, W.J.; Watkins, K.P.; and Agabian, N. 1986 *Cell.* 47, p.517.
- Myler, P.J.; et al. 1999. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.* 96, p.2902.

N

- Nakaar V, et al. 1994 *Mol Cell Biol*;14:6736-42.
- Navarro M, Gull K. *Nature* 2001;414:759-63.
- Ngo JC, et al.2005. *Mol Cell.* Oct 7;20(1):77-89.
- Nilsen, T.W. (2003) *Bioessays* 25, 1147-1149
- Nilsen, T.W. 1994. *Cell.* 78, p.1
- Nolen B, et al. 2001*Nat Struct Biol.* Feb;8(2):176-83.

O

- O'Brien SJ, et al. 1999 *Science*;286:458-81.
- Okamoto, Y.; et al. 1998 *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. *FEBS lett.* 80, p.360.
- Overath P, et al. 2001 *Int J Parasitol*;31:468-71.

P

- Palenchar JB, et al. 2006 *Eukaryotic Cell*; 5.
- Papoutsopoulou, S.; et al. 1999. *Biochem. Biophys. Res.Com.* 255, p.602.
- Pays E. 2005 *Trends Parasitol*;
- Pays, E. 1993bis. In *The eukaryotic genome organization and regulation* (eds. Broda, S.G.; Oliver, S.G.; and Slims, P.F.G.). Cambridge University Press. p.127.
- Pays, E.; et al. 1989. *Mol. Cell. Biol.* 9, p.4018.
- Pays, E.; et al. 1990. *EMBO J.* 9, p.3145.
- Pays, E.; et al. 1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, p.107.
- Pellé, R.; and Murphy, N.B. 1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, p.277.
- Perriman, R.; and Ares, M. Jr. 2000. *Genes Dev.* 14, p.97.
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. 1992 *Nature* 355, 730-732
- Ploubidou, A., et al. 1999 *Journal of cell science* 112 (Pt 24):4641-4650
- Portal, D. et al. 2003. *Molecular and biochemical parasitology* 127:37-46
- Portal, D. et al. 2003bis. *Molecular and biochemical parasitology* 127:9-21
- Potashkin, J.; et al. 1998. *Curr. Genet.* 34, p.153.
- Prasad, J.; et al.1999 *Mol. Cell. Biol.* 19, p.6991.
- Prata A. 2001. *Lancet Infect Dis*; 1: 92-100
- Priest, J.W.; and Hajduk, S.L. 1994. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, p.291.

R

- Rajkovic, A.; et al. 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, p.8879
- Rasheva, V. I., D. et al. 2006 *Molecular and cellular biology* 26:3468-3477
- Reed, R.; and Maniatis, T. 1986. *Cell.* 46, p.681.
- Reed, R.; and Palandjian, L. 1999. In *Krainer, A. Eukaryotic mRNA Processing*. 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.
- Reichenow, E. 1940. *Archivos do Instituto Biológico, Sao Paulo.* 11, p.433.

- Revelard, P.; Lips, S.; and Pays, E. 1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, p.93.
 Rio, D. 1993. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, p.574.
 Robberson, B.L., Cote, G.J. and Berget, S.M. 1990 *Mol. Cell. Biol.* 10, 84-94
 Rocha, et al. 2006 *The Lancet*; 363: 247
 Roscigno, R.F. and Garcia-Blanco, M.A. 1995 *RNA* 1, 692-706
 Rossi, F.; et al.1996. *Nature* 381, p.80.
 Roth, M.B.; Murthy, C.; and Gall, G. 1990. *J Cell Biol.* 111, p.2217.
 Roth, M.B.; Zahler, A.M.; and Stolk, J.A. 1991. *J. Cell. Biol.* 115, p.587.
 Ruan JP, et al. 2004 *Mol Cell Biol*;24:9610-8.
 Rudenko, G.; et al. 1989. *EMBO J.* 8, p.4259.
 Rudenko, G.; et al.1994. *EMBO J.* 10, p3387.
 Rudenko, G.; Lee, M.G.S.; and Van der Ploeg, L.H.T. 1991. *Nucleic Acids Res.* 20, p.303.
 Russell, C. S., et al. 2000. *RNA (New York, N.Y)* 6:1565-1572

S

- Saito, R.M.; Elgort, M.G.; and Campbell, D.A. 1994. *EMBO J.* 13, p.5460.
 Sanford, J. R., J. Ellis, and J. F. Caceres. 2005. *Biochemical Society transactions* 33:443-446
 Sanford, J. R.; and Bruzik, J. P. 1999. *RNA* 5, p.918.
 Sanford, J.R., Gray, N.K., Beckmann, K. and Caceres, J.F. (2004) *Genes Dev.* 18, 755-768
 Sanford, J.R., Longman, D. and Caceres, J.F. (2003) *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 31, 33-58
 Sanger, F.; and Coulson, A.R. 1975. *J. Mol. Biol.* 94, p.441.
 Santori, M.I.; et al. 2002. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, p.225.
 Schimanski B, et al.2003 *Mol Biochem Parasitol*;126:193-200.
 Schurch N, et at. 1994. *Mol Cell Biol.* Jun;14(6):3668-75
 Screaton, G.R.; et al. 1995. *EMBO J.* 14, p.4336.
 Seghezzi, W., K. et al.1998. *Molecular and cellular biology* 18:4526-4536
 Shen, H., Kan, J.L. and Green, M.R. 2004 *Mol. Cell* 13, 367-376
 Sherman, D.R.; et al. 1991. *EMBO J.* 10, p.3379.
 Siebel, C. W.; et al. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, p.5440.
 Smith JL, et al. 1989. *Cell*;56:815-27
 Smith, D.F.; and Parsons, M. Oxford University Press, NY, USA.
 Sommer, J.M.; et al. 1996. In *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*.
 Steitz, J.A. 1992. *Science.* 257, p.888.
 Stevens JR, et al. 2001 *Adv Parasitol*;48:1-56.
 Stevens JR, Gibson WC. 1999 *Cad Saude Publica*;15:673-84.
 Storino, R.; and Milei, J. 1994. *Enfermedad de Chagas*, Ed. Mosby.
 Sureau, A.; et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, p.11683.
 Sutton, R.E.; and Boothroyd, J.C. 1986. *Cell.* 47, p.527.
 Swindle, J.; and Tait, A. 1996. In *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Oxford Univ. Press. NY. USA.

T

- Tacke, R.; Boned, A.; and Goridis C. 1992. *Nucleic Acids Res.* 20, p.5482
 Takeuchi, M.; and Yanagida, M. 1993. *Mol. Biol. Cell* 4, p.247.
 Tang, Z.; Kuo, T.; Shen, J.; and Lin, R.-J. 2000. *Mol. Cell. Biol.* 20, p.816.
 Tang, Z.; Yanagida, M.; and Lin, R.-J. 1998. *J. Biol. Chem.* 273, p.5963.
 Teixeira, S.M.; Kirchhoff, L.V.; and Donelson, J.E. 1995. *J. Biol. Chem.* 270, p.22586.
 Tessier, L.H.; et al. 1991. *EMBO J.* 10, p.2621.
 Tian, M.; and Maniatis, T. 1994. *Genes Dev.* 8, p.1703.
 Torri, A.F.; Bertrand, K.L.; and Hajduk, S.L. 1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, p.316.
 Tosato V, et al. *Curr Genet* 2001;40:186. [PubMed: 11727994]
 Tschudi, C.; and Ullu, E. 1990.. *Cell.* 61, p.459.
 Turco, S.J.; and Descoteaux, A. 1992. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, p.65.

U, V, W

- Ullu E, Matthews KR, Tschudi C. 1993. *Mol Cell Biol*;13: 720-5
 Vanhamme, L.; et al. 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15, p.5598.
 Vellard, M.; et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, p.2511.
 Vibe-Pedersen, K.; Kornblihtt, A.R.; and Baralle, F.E. 1984. *EMBO J.* 3, p.2511.
 Vickerman, K. 1965 *Nature.* 208, p.762.
 Vijayraghavan, U., M. Company, and J. Abelson. 1989. *Genes & dev.* 3:1206
 Wahle, E.; and Keller, W. 1999. In *Krainer, A. Eukaryotic mRNA Processing*. 1999. IRL Press at Oxford University Press, NY, USA.

BIBLIOGRAFIA

- Walgraffe D, et al. 2005. *Mol Biochem Parasitol*;139:249-60.
- Wang, H.Y.; Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. 1998. *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., et al. 1993. *Nucleic Acids Res.* 21, p.2815.
- Worthey E, et al. 2003. *Nucleic Acids Res*;31:4201. [PubMed: 12853638]
- Wu JY, Maniatis T. 1993. *Cell*;75:1061-70.

X, Y, Z

- Xiao, S.-H.; and Manley, J.L. 1998. *EMBO J.* 21, p.6359.
- Yang, X.; et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, p.6924.
- Zahler, A.M. 1999. *Methods Mol Biol.* 118, p.419.
- Zahler, A.M., et al. 1993. *Science* 260, 219-222
- Zahler, A.R.; et al. 1992. *Genes Dev.* 6, p.837.
- Zervos AS, Gyuris J, Brent R. 1993. *Cell*;72:223-32.
- Zhang WJ, Wu JY. 1996. *Mol Cell Biol*;16:5400-8.
- Zhang, Z. and Krainer, A.R. 2004. *Mol. Cell* 16, 597-607
- Zhu, J.; and Krainer A.R. 2000. *Genes Dev.* 14, p.3166.
- Zhuo, P., and Manley, J.L. 1991. *Cell.* 66, p.373.
- Zuo, P.; and Manley, J.L. 1993. *EMBO J.* 12, p.4727.