



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



INSTITUT PASTEUR
DE MONTEVIDEO

Laboratorio de Genómica Funcional, Instituto Pasteur de
Montevideo. Facultad de Ciencias. UdelaR

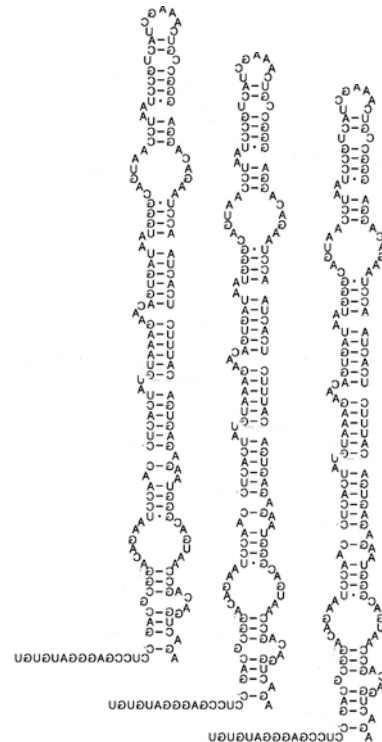
Tesina de grado

**“Estudio y caracterización de pequeños ARNs
no codificantes co-inmunoprecipitados con la
proteína TcPIWI-tryp de *Trypanosoma cruzi*”.**

Julia Sanguinetti

Tutor: Dr. Alfonso Cayota

Diciembre, 2011



RESÚMEN

Con la descripción del genoma humano se demostró que una gran fracción del mismo (60%) codifica para ARNs que no son transcritos a proteínas. Nosotros nos centramos en el estudio de los pequeños ARNs no-codificantes (sRNAs), los cuales hoy se sabe que son capaces de regular el 40% de los genes conocidos. Si bien los sARNs adoptan diferentes estrategias en su mecanismo de acción, su rol central deriva en la regulación de la expresión génica, mediante procesos como el silenciamiento de genes endógenos, contención a la invasión de parásitos y agentes patógenos del genoma como son transposones y virus y silenciamiento génico mediante la modificación de la cromatina. En la síntesis, procesamiento y función de los sARNs es clave la familia de proteínas Argonautas, las cuales actúan a diferentes niveles a lo largo de la vía de los sARNs. Nuestro modelo de estudio, *Trypanosoma cruzi*, presenta una única proteína Argonauta, denominada TcPIWI-tryp, distintiva de tripanosomátidos de la cual no se conoce su función. Se ha demostrado que *T. cruzi* carece del fenómeno de interferencia por ARN, sin embargo nuestro grupo de trabajo reportó recientemente la presencia de sARNs enriquecidos principalmente en pequeños fragmentos derivados de ARNs de transferencia (mini-tRNAs) en el transcriptoma de *T. cruzi*. Estos últimos han sido vinculados en otros organismos con la regulación de la traducción. Con el hallazgo de los sARNs y la proteína TcPIWI-tryp en *T. cruzi* surge lo que fue este trabajo, donde se demostró mediante inmunoprecipitación, una asociación entre la proteína TcPIWI-tryp y los sARNs presentes en este organismo. Además se pretendió mediante secuenciado masivo realizar la caracterización de los sARNs co-inmunoprecipitados, en lo cual continuamos trabajando. El entendimiento de estos procesos nos permitirá ahondar en el sentido de estas macromoléculas ya que podríamos estar frente a nueva clase de sARNs (mini-tARN), los cuales suponemos, surgieron al inicio de la evolución en este tipo de organismos.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada me gustaría agradecer a Alfonso que me dio el espacio y la oportunidad de realizar mi pasantía en el Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto Pasteur de Montevideo.

Me gustaría también agradecer especialmente a Rosa que no solo me enseñó, me ayudó y me dedicó de su tiempo durante toda la pasantía sino que me tuvo muchísima paciencia.

También quisiera agradecer a Pilar Moreno quien a estas alturas del año aceptó corregirme la tesis.

Además agradezco a mis compañeros del laboratorio, Flo, Braulio, Juan Pablo, Fer, Mari y Cata que siempre estuvieron apoyando y solucionando imprevistos pero que sobretodo hicieron el día a día más agradable.

Por último agradecer muy especialmente a mi familia: a mis padres, a Lula, mis abuelas, mis tíos, a Gabi y la Flia. Lassabe, por todo el apoyo y el aguante en estos años, que no fueron fáciles.

INDICE

1-INTRODUCCIÓN

1.1 ARNs no codificantes y pequeños ARNs reguladores	1
1.2 Clasificación, biogénesis y función de los pequeños ARNs	3
• miARN	4
• siARN	6
• piARN	7
1.3 Proteínas claves de las vías por sARNs	
• Dicer	8
• Argonautas	8
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> , nuestro modelo de estudio	11
1.5 Nueva familia de sARNs: fragmentos derivados de ARNs de transferencia	15
1.6 Hipótesis	17

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	20
3.2 Lisis de parásitos y obtención de fracción citoplasmática	20
3.3 Cuantificación proteica del extracto tota	20
3.4 Crosslinking e inmunoprecipitación	20
3.5 Extracción de proteínas y ARN del extracto inmunoprecipitado.....	21
3.6 Visualización de proteínas por tinción con plata	22
3.7 Western Blot.....	22
3.8 Visualización de ARN y obtención del mismo para secuenciado	23
3.9 Clonado de sARNs inmunoprecipitado	23
3.10 Preparación de muestras para el envío a secuenciado masivo	24
3.11 Secuenciado masivo Illumina solexa	24

4- RESULTADOS

4.1 Gel teñido con plata	25
4.2 Western Blot de extractos totales e inmunoprecipitación	26
4.3 Visualización y obtención de la población de sARNs	27
4.4 Clonado de sARNs inmunoprecipitados	29
4.5 Secuenciado masivo	30
5-DISCUSSION Y CONCLUSION	37
6- REFERENCIAS	42
7- ANEXO	45

1-INTRODUCCIÓN

1.1-ARNs no codificantes y pequeños ARNs reguladores.

Con el advenimiento de tecnologías de secuenciado masivo a gran escala y el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas, la comunidad científica cuenta con el genoma y el transcriptoma humano completo además de otros organismos (plantas y animales). El análisis de estos datos ha denotado una gran sorpresa para quienes las analizan. Si bien los organismos presentan grandes diferencias en su complejidad, sus genomas mostraron un número similar de genes que codifican proteínas. En particular el análisis del transcriptoma ha proporcionado una serie de sorpresas, por ejemplo, el número de proteínas resultó ser menor del esperado, por otro lado apenas el 1,8% del genoma codifica para ARNs que serán transcritos a proteínas (ARNs codificantes), siendo más del 60% la porción del genoma que codifica para ARNs que no son transcritos a proteínas (ARNs no codificantes, ARNnc) [3]. Estos ARNnc se han clasificado según el largo de sus miembros en largos ARNnc y pequeños ARNnc o **small RNAs (sRNAs)**. En el presente trabajo nos concentraremos en esta última familia de ARNnc, dado que en las casi dos últimas décadas los sARNs han sido descriptos como la principal familia de reguladores de la expresión génica [3].

El hallazgo de un mecanismo por el cual el silenciamiento génico ocurre en respuesta a la presencia de ARN doble hebra, ha tenido un enorme impacto en la biología, revelando un rol insospechablemente importante. Hoy en día son considerados los principales reguladores de la expresión génica capaces de regular el 40% de los genes conocidos. El rol de los sARNs fue caracterizado por primera vez en *Ceanorhabditis elegans*, identificándolos como ARNs interferentes (siARN) [4]. Este fenómeno también ha sido observado en diferentes tipos de eucariotas, como en plantas, mamíferos, protozoarios, etc. Extensos estudios y análisis del genoma y transcriptoma han involucrando a los ARNnc en procesos como el silenciamiento de genes endógenos [5], contención a la invasión de parásitos y agentes patógenos del genoma como son transposones [6] y virus [7] y silenciamiento génico mediante la modificación de la cromatina [8]. Si bien estos

mecanismos actúan a diferentes niveles, su rol central deriva en la regulación de la expresión génica.

En diferentes organismos la vía por la cual se da el silenciamiento génico por ARN, involucra diferentes proteínas y utiliza diversos mecanismos, aunque todas operan bajo una misma estrategia. La característica que distingue y define a los pequeños ARNs (sARN) en la vía del silenciamiento génico mediado por ARN, es el tamaño limitado del fragmento de ARN, entre 19 y 30 nucleótidos (nt), y su asociación con proteínas de la familia Argonauta. El sARN involucrado en la vía es el que guía y da especificidad a la respuesta. Dependiendo de la naturaleza de las proteínas asociadas y el grado de apareamiento entre el sARN y la secuencia blanco (el ARN mensajero, ARNm), el tipo de respuesta [9]. Si el apareamiento es casi perfecto el ARNm es clivado entre los nucleótidos 10 y 11 respecto al extremo 5' del sARN guía. Si la complementariedad es baja y principalmente a nivel del 3'UTR la interacción resulta en la inhibición de la traducción. Para ambos casos el mayor grado de complementariedad es en los nucleótidos 2-7 respecto al extremo 5' del sARN y esta región es la que parece ser la más importante para el reconocimiento del ARNm blanco denominándose región semilla [10]. Con respecto a aquellos sARN que actúan a nivel del ADN estos actúan sobre secuencias complementarias del ADN e inducen modificaciones de histonas (metilación) o bien modificaciones del ADN y se vinculan a la regulación de la transición eucromatina-heterocromatina [10].

Estudios sobre los perfiles de expresión de los sARNs indican que la mayoría se encuentra bajo control de señales específicas dependiendo de la etapa de desarrollo y el tejido en el que se encuentren estas células. Controles precisos y finamente regulados son necesarios para mantener un buen funcionamiento celular. En oposición a esto una desregulación en los mecanismos de control mediado por los sARNs se asocia regularmente a enfermedades crónicas como el cáncer [11].

El proceso de silenciamiento por sARNs se puede dividir en tres etapas básicas, que desarrollaremos en particular para cada sRNAs, pero que a grandes rasgos comienza con la presencia de un fragmento de ARN doble hebra endógeno o exógeno que luego es procesado a pequeños fragmentos de ARN doble hebra por

una ribonucleasa III (RNAsaIII, Dicer y/o Drosha). Luego, una de las hebras del sARN denominada hebra líder se une al complejo RISC ("RNA-induced silencing complex"). Por último, el complejo RISC guiado por el sARN hace una búsqueda de su ARNm blanco, para unirse a él y desencadenar el fenómeno de silenciamiento génico.

1.2-Clasificación, biogénesis y función de los pequeños ARNs.

Hoy en día se acepta la existencia de tres grandes familias de sARNs, aunque esto irá cambiando con el advenimiento de los diferentes resultados del análisis de transcriptomas a gran escala. En base a su mecanismo de síntesis y en función de las proteínas Argonautas a las que se asocian los sARNs han sido sub-divididos como: microARN (miARN), pequeños ARNs interferentes (siARN) y piwi interacting RNA (piARN).

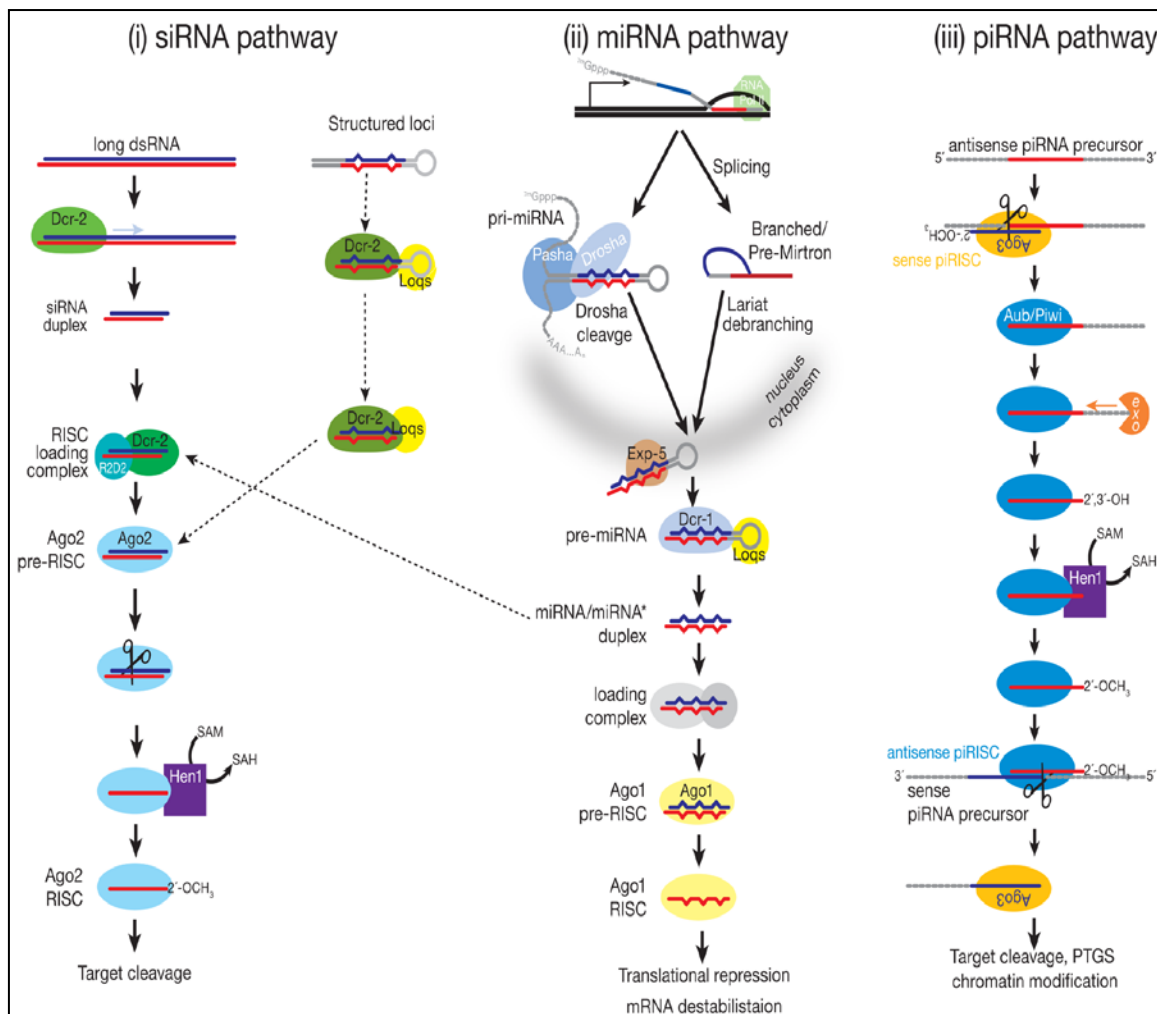


Figura 1. Esquema comparativo de las tres vías principales de silenciamiento génico por sARNs, siARN, miARN y piARN [2].

- **miARNs**

Los miARN son fragmentos de ARN simple hebra de aproximadamente 22 nt, son generados a partir de transcriptos endógenos, pudiendo adoptar estructuras secundarias características y llevan a cabo su función uniéndose entre otras, a proteínas de la subfamilia Argonauta [11]. Los miARN varían su mecanismo de acción dependiendo el grado de complementariedad con el ARNm se unen típicamente a la región 3'UTR del ARNm inhibiendo la traducción, promoviendo la detención de la fase de elongación, provocando la detención prematura de los ribosomas o provocando la degradación del ARNm a nivel co-traducciona.

Actualmente hay 21.643 miARN maduros en 168 especies (<http://www.mirbase.org/>) y al menos 1/3 de los genes humanos están regulados directamente por estos [11].

La mayoría de los miARN son transcriptos por la polimerasa II (pol II) y los genes de los miARN suelen ubicarse próximos unos de otros generándose transcriptos policistronicos, siendo probablemente esta disposición en el genoma, producto de duplicaciones génicas durante la evolución [10, 11]. De acuerdo a la región del genoma donde se ubican estos genes se los agrupa en diferentes categorías: miARN intrónicos (presentan el mismo patrón de expresión que el gen en el que reside), en exones de genes no codificantes y en intrones de genes no codificantes [10]. Aproximadamente el 40% de los miARN en animales están localizados en regiones intrónicas mientras que el 10% se localiza en regiones exónicas no codificantes [11].

Los transcriptos de los miARNs forman una estructura en horquilla característica la cual es reconocida por un complejo denominado microprocesador, compuesto por una RNasa III, "Drosha" y un cofactor de Drosha, una proteína de unión al ARN doble hebra denominada Pasha en *Drosophila* y DGCR en humanos. Drosha corta ambas cadenas del pri-miRNA en la región más lejana al loop de la horquilla definiendo uno de los extremos del miRNA maduro, y dando origen al precursor de miRNA (pre-miRNA), también con forma de horquilla, que generalmente tiene ~70pb [11]. Además de la vía clásica de generación de pre-miARNs se ha observado en *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* y mamíferos una

vía de generación alternativa dependiente de la maquinaria de Splicing para su biogénesis, la cual genera pre-miARN derivados de intrones que adoptan la estructura de hairpin, característico de los pri-miARN. A estos pre-miARN generados a partir de intrones se lo denomina pre-miARN/introns (mirtrons) [10]. Estudios recientes sugieren que el procesamiento de los pri-miARN es co-transcripcional, precediendo al splicing [11]. Una vez liberado del microprocesador el pre-miARN se une a las proteínas Exportina-5 (exp-5) para ser exportado desde el núcleo hacia el citoplasma. La unión de la exp-5 al pre-miARN se torna importante ya que estabiliza al pre-miARN en el núcleo [11].

Como se muestra en la figura 1, en el citoplasma el pre-miARN es interceptado por una endonucleasa RNasa III denominada “Dicer”, responsable del procesamiento del pre-miARN la cual genera un ARN doble hebra corto de aproximadamente 22nt. Además del procesamiento del pre-miARNs, Dicer es capaz de procesar largos fragmentos de ARN doble hebra (endógenos o exógenos), generando segmentos cortos de ARN dúplex (small interfering RNA, siARN) [10]. Luego del procesamiento por Dicer, una de las hebras del miARN se une al complejo miRNP (ribonucleoproteico miARN/Ago) en cuyo núcleo se encuentra la proteína de la familia argonauta, mientras que la otra hebra es degradada [10, 12]. El complejo miRNP es el mínimo complejo activo, el cual puede estar formando parte de un complejo multiproteico denominado RISC (“complejo silenciador inducido por ARN”). El complejo RISC, al cual actualmente se le conocen hasta 15 proteínas asociadas, va a mediar la función efectora de los miARN ya que va a ser guiado por el miARN hacia el ARNm blanco [10, 12]. La hebra que interactúa con la proteína Argonauta y luego es cargada al complejo RISC se la denomina hebra guía y la que es degradada, hebra pasajera. Lo que determina cual va a ser la hebra guía es la estabilidad termodinámica relativa del extremo 5' de las hebras, la hebra con menor estabilidad en su extremo 5', es la que típicamente será la hebra guía formando el miARN maduro [11].

En los últimos años se describieron estructuras citoplasmáticas que presentan miARN y proteínas de unión a ARNm, las cuales fueron identificadas como cuerpos P o GW y gránulos de estrés, en diversos organismos, entre ellos *T. cruzi* [13, 14].

- **siARN**

Los siARN fueron descubiertos por primera vez en plantas y en *C. elegans*, el mecanismo efector de los siARN es el mismo que el de los miARN, aunque presentan en su origen y en el inicio de su vía ciertas diferencias. Los siARN derivan de largos fragmentos de ARN doble hebra ya sea endógenos o exógenos y su clivaje depende de una única endonucleasa RNasa III, la proteína Dicer, la cual genera fragmentos de aproximadamente 21-25nt, como se muestra en la figura 1 [11].

Los siARN pueden ser endógenos, presentes en plantas y nemátodos, y exógenos, como los siARN introducidos experimentalmente o por virus [2].

Los fragmentos de ARN doble hebra son procesados por Dicer generando extremos característicos de ribonucleasas, con un extremo 5' fosfato y 2 nucleótidos 3' sobresalientes en los extremos del ARN doble hebra. Luego el fragmento generado de ~ 22nt es cargado en el complejo RISC (siRISC en la vía de los siARN) mediante la interacción con una proteína Argonauta [2, 11].

En humanos y *Drosophila* las proteínas Argonautas (Ago 2 en humanos), endonucleasas de ARN, referidas como “slicer”, son responsables de la degradación del ARNm blanco. En este caso el siARN permanece unido al complejo RISC permitiendo realizar múltiples rondas de corte de ARNm.

En algunas eucariotas como plantas y nemátodos la formación de ARN doble hebra requiere de proteínas ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRP). Las RdRP generan transcritos simple hebra mediante síntesis *de novo* de manera independiente de cebadores [2].

Los siARN participan en la regulación de expresión génica unidos a proteínas Argonautas al igual que los miARN, sin embargo también están implicados en funciones como, el silenciamiento de genes repetidos, transposones y virus como mecanismo de defensa y dirigir el reordenamiento del genoma guiando la metilación del ADN [2, 11, 15].

- **piARN**

Los piARN son la clase de sARNs mas recientemente descubierta, y el conocimiento acerca de su rol biológico y su vía de síntesis se limita a investigaciones recientes.

Los piARN son fragmentos endógenos de aproximadamente 23- 29 nt, siendo estos los más largos de los sARNs. Los piARN también se distinguen de los miARN y los siARN en que son procesados de manera independiente de Dicer y se unen específicamente a la subfamilia de Argonautas, PIWI [16]. Estos sARNs derivan de elementos genómicos repetitivos y su principal función es el silenciamiento de los elementos transponibles (TE) en la línea germinal, siendo imprescindibles para el correcto desarrollo de las gónadas y las células madre. Asimismo recientemente se ha reportado en murinos la presencia de un rol adicional a nivel post-transcripcional. La presencia de los piARN está restringida a algunos organismos pluricelulares [16].

Para llevar a cabo su función los piARN se asocian con las proteínas PIWI, las cuales forman parte del complejo RISC (piRISC), que reconoce y silencia a sus mensajeros mediante complementariedad [16]. Diferentes organismos poseen distinto número de proteínas PIWI, *Drosophila* presenta 3, PIWI, AUB y AGO, los murinos MILI, MIWI y MIWI2 y en humanos HILI, HIWI1, HIWI2 y HIWI3 [16].

Las secuencias de los piARN son muy variadas aunque colectivamente mapean en unos pocos cientos de clusters, siendo el mejor estudiado el locus *flamenco*.

La vía que presentan los piARN para discriminar a los elementos transponibles de los genes que codifican proteínas normales es perfectamente regulada y específica, siendo la regulación de esta vía principalmente a nivel de la cromatina [2, 16]. La vía de síntesis de los piARN ha sido estudiada en *Drosophila* y se la puede dividir en dos partes. La primera está totalmente caracterizada, se da un proceso por el cual se genera un pool de piARN primarios que marcan múltiples TE, de manera independiente de Dicer. Luego en una segunda etapa, los piARN primarios (sin Uridina) se unen a la PIWI y a AUB y los piARNs son amplificados en un ciclo dependiente de proteínas argonautas con actividad endonucleasa, denominado “piARN ping-pong”, que se activa únicamente sobre transcriptos derivados de ARNm derivados de elementos transponibles [2, 16].

1.3-Proteínas claves de las vías por sARNs.

- **Dicer**

Dicer es una proteína que presenta su secuencia primaria relativamente conservada, presente en casi todos los organismos eucariotas, incluidos *Schizosaccharomyces pombe*, hongos, plantas y animales [17].

La variabilidad observada entre los diferentes organismos se asocia principalmente con la presencia o ausencia del dominio PAZ, siendo los dominios mas conservados los dos dominios catalíticos RNasa III [17]. Dicer además presenta otros dominios cuyas funciones no son tan bien conocidas.

Organismos como las plantas y *Drosophila* poseen varios tipos de Dicer. *Drosophila* posee dos tipos de Dicer, Dcr-1 que cliva miARNs y Dcr-2 que se especializa en el clivaje de siARNs.

En el caso de los mamíferos y *C. elegans*, estos tienen una única Dicer que cataliza tanto a los miARN como a los siARNs.

- **Argonautas**

Las proteínas Argonautas fueron identificadas por primera vez en plantas y nematodos y se definen por la presencia de un dominio PAZ y un dominio PIWI [18]. Están altamente conservadas a lo largo de la escala biológica y el número de genes que codifica para estas proteínas en los diferentes organismos es variado. Puede variar de un único gen como es el caso de *S. pombe* a 26 genes en *C. elegans*. En humanos, estos poseen 8 genes que codifican para estas proteínas [19].

La familia de las Argonauta se divide actualmente en tres subfamilias la subfamilia AGO-like, Piwi-like y WAGO-like. La subfamilia AGO-like, está presente en animales, plantas y levaduras, y están implicadas en mecanismos de silenciamiento génico a nivel transcripcional y postranscripcional. La subfamilia Piwi-like ha sido observada únicamente en animales asociada principalmente a los piARN en células indiferenciadas o germinales durante la embriogénesis y organogénesis. Actualmente se sabe que las proteínas de la subfamilia Piwi están involucradas en procesos de silenciamiento génico mediante represión de la traducción y silenciamiento de transposones [20, 21].

Estudios filogenéticos de la maquinaria vinculada a las diferentes vías de los sARN han evidenciado que AGO/PIWI y Dicer presentan posiblemente un ancestro común, sin embargo existen evidencias de organismos unicelulares como *S. cerevisiae*, *T. cruzi*, *L. major* y *P. falciparum* que parecen haber perdido o simplificado significativamente estas proteínas. Estos organismos son incapaces de utilizar ARN doble hebra para desencadenar la vía de ARNi [19, 21].

Las proteínas de la familia Argonauta como ya se menciono han sido implicadas en el silenciamiento génico tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Estas se pueden unir tanto a los siARN como miARN y mediar la represión de ARNm de manera específica mediante la degradación o inhibición de los transcriptos. En ambas vías las Argonautas forman parte del complejo RISC, el cual es guiado por los sARNs hacia los ARNm blanco. Si existe una perfecta complementariedad las proteínas Argonautas realizarán el clivaje del mensajero entre los nucleótidos 10 y 11 del ARN guía. El clivaje del ARNm no es el único mecanismo que presenta el complejo RISC, esta maquinaria también puede marcar al ARNm para direccionarlo hacia cuerpos celulares (P-bodies) donde se encuentran proteínas que participan en procesos de degradación de ARN. Si bien se ha reportado que las proteínas Argonautas también actúan en el inicio de la traducción, la elongación y en la degradación de péptidos nacientes, aún no se sabe exactamente de qué manera actúan. También se ha observado en organismos inferiores, que las proteínas Argonautas inducen o participan en mecanismos donde el silenciamiento génico se da a nivel del núcleo inhibiendo la transcripción mediante formación de heterocromatina [18, 20].

Las proteínas Argonautas se caracterizan por presentar 4 dominios: N-terminal, dominio PAZ, dominio Mid y dominio PIWI (ver figura 2).

El dominio PAZ se encuentra tanto en proteínas Argonautas como en la proteína Dicer [19, 22]. El dominio PAZ contiene un sitio específico de unión que se ancla a los dos primeros nucleótidos del extremo 3' del ARN doble hebra, productos de la RNasa III (Dicer y/o Drosha) [18]. La unión de PAZ a los fragmentos cortos de ARNs doble hebra se da con baja afinidad y de forma independiente de secuencia, siendo capaz de discriminar entre ARNs no codificantes y ARNs que son producto de degradación [19].

La actividad catalítica observada en las proteínas Argonautas está dada por el dominio PIWI, el cual presenta una gran homología con la proteína RNasa H (que clivan ARN utilizando ADN como molde). El sitio activo del dominio PIWI presenta al igual que la RNasa H dos Asp y una His adicional, las cuales interaccionan con un ión metálico [22]. La actividad catalítica del dominio PIWI es claramente importante debido al rol que cumplen las proteínas Argonautas en la vía de los sARNs. Pero en diversos organismos, el sitio catalítico de ciertas Argonautas, han divergido, de manera que han perdido su actividad catalítica. En humanos, de las 8 Argonautas que presenta solamente Ago 2 posee actividad catalítica, en *A. thaliana* Ago 1 y Ago 4 únicamente han conservado esta característica. La observación de que no todas las proteínas Argonautas poseen actividad catalítica evidencia la participación de estas proteínas no solo en el clivaje de ARNm blanco, sino que en asociación con otras proteínas las Argonautas, participan en diferentes partes de la vía de los sARNs sugiriendo un rol adicional. Por ejemplo en el procesamiento, maduración, transporte y regulación de la estabilidad del sARNs [19].

El dominio Mid se une a los fosfatos 5' característicos de los sARNs, lo que contribuye con el anclaje del sARN a la proteína Argonauta. Además de la unión al extremo 5', el dominio Mid contiene un dominio conservado similar al motivo 7-metilguanil (m^7G) cap-binding initiation factor 4E (eIF4E), el cual se une al extremo 5' de los ARNm. Esto sugiere que tal vez la proteína Argonauta, mediante su unión al mensajero inhibe la unión de este factor eIF4E reprimiendo el inicio de la traducción [18].

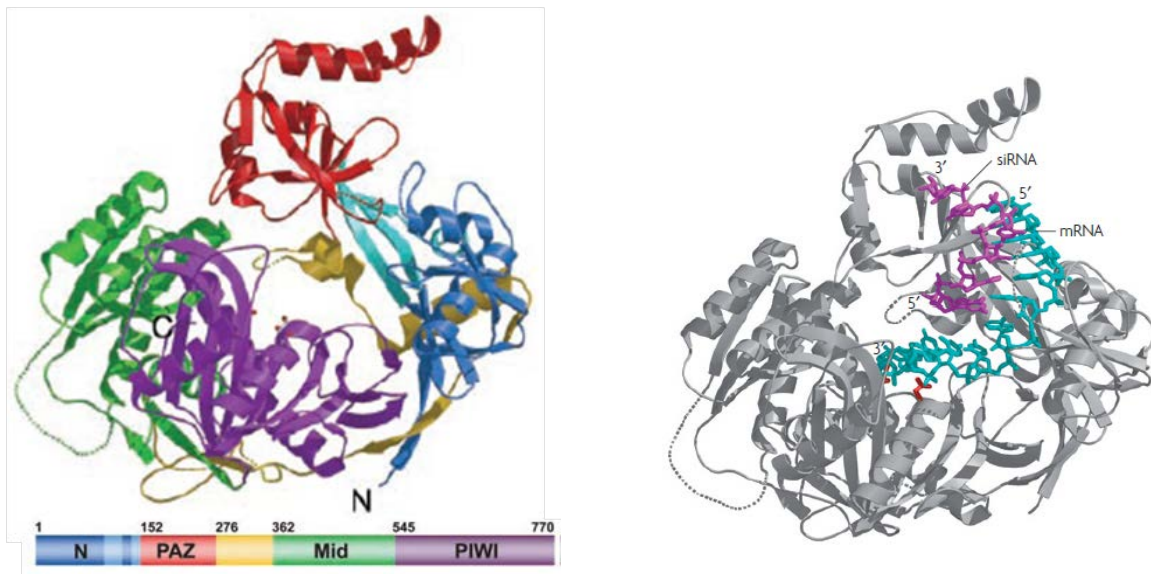


Figura 2. Izquierda: Se observa la estructura obtenida por cristalización de la proteína Argonauta de *P. furiosus* por Song et al, en la cual se pueden apreciar las similitudes con el modelo obtenido para TcPWI1. Derecha: Se observa estructura cristalográfica de la proteína Argonauta de *P. furiosus* interaccionando con un siARN y un ARNm blanco. Con verde el ARNm y con violeta el siARN.

1.4-*Trypanosoma cruzi*, nuestro modelo de estudio.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) pertenece al grupo de los tripanosomátidos, siendo este un grupo de parásitos que divergieron de manera temprana en la evolución [23]. *T. cruzi* es el responsable de la enfermedad de Chagas afectando cerca de 8 millones de personas en América del sur. Los tripanosomátidos se caracterizan por tener estructuras celulares únicas entre los protozoarios. Una de las características es la presencia de microtubulos adosados a la membrana citoplasmática, conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez. Estos microtubulos se localizan a lo largo de toda la membrana salvo en la zona donde emerge el flagelo (saco flagelar). Otra estructura muy peculiar de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos es el cinetoplasto, conformado por una malla de ADN extranuclear, el cual puede contener entre el 10 y 12% del ADN total celular. Otras peculiaridades que presentan los tripanosomátidos es la no condensación de la cromatina celular durante la división celular y una extensa edición post-transcripcional del ARN mitocondrial [23].

T. cruzi presenta un ciclo biológico complejo (figura 3) que comienza cuando el vector invertebrado, que es un insecto hematófago, se alimenta del huésped vertebrado e ingiere una población pleomórfica de tripomastigotes. Dentro del estómago del insecto, los parásitos se transforman en epimastigotes y algunas formas intermedias redondeadas que son capaces de transformarse tanto en epimastigotes cortos, los que comienzan un proceso de multiplicación en el intestino, ó en epimastigotes largos que se mueven a la región más posterior del tracto digestivo del insecto. Aparentemente, estos epimastigotes largos, son incapaces de dividirse.

En el recto, cierta proporción de epimastigotes, se diferencia a tripomastigotes metacíclicos, los cuales durante la alimentación del insecto son eliminados con las heces y la orina cerca del sitio de la picadura. El prurito y rascado posterior del hospedador mamífero permite la penetración de los tripomastigotes al torrente sanguíneo, desde donde son capaces de invadir las células de varios tejidos del vertebrado [24, 25]. Una vez en la célula, la forma metacíclica se escapa de la vacuola endocítica, también conocida como vacuola parasitófora, y se transforman en amastigotes que se dividen repetidamente por fisión binaria. A altas densidades los amastigotes dan lugar a tripomastigotes a través de formas intermedias, algunas tienen forma de epimastigotes

Las células que son prematuramente lisadas pueden también liberar amastigotes, los cuales son observados en el torrente sanguíneo durante la fase aguda de la infección. Estos amastigotes pueden servir para propagar la infección dado que ellos también son capaces de infectar células, particularmente células fagocíticas, aunque por un mecanismo diferente que los tripomastigotes. Finalmente la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado sirve para completar el ciclo cuando es ingerido por un insecto vector [25, 26].

Las formas de los parásitos en diferentes estadíos del ciclo pueden ser identificadas por la posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo de la célula y la emergencia del flagelo y se detallan a continuación:

Amastigote: su forma es característicamente esférica u ovalada de 2.4 a 6.5 μm de diámetro [24].

Epimastigote: Forma extracelular elongada, 20-40 x 2 µm, con el kinetoplasto localizado en la parte anterior al núcleo. Posee un flagelo, el cual emerge por el costado del cuerpo celular y se libera por el extremo anterior, arrastrando la membrana citoplasmática en un trayecto breve. Esta forma es capaz de dividirse y es observada en cultivos axénicos y en el intestino del huésped invertebrado [24].

Tripomastigote: Forma infectiva y no replicativa. Tiene una longitud de aproximadamente 25 µm y un diámetro de 2 µm. El kinetoplasto está localizado posterior al núcleo, y el flagelo emerge a partir del mismo, dando lugar a una extensa membrana ondulante [24].

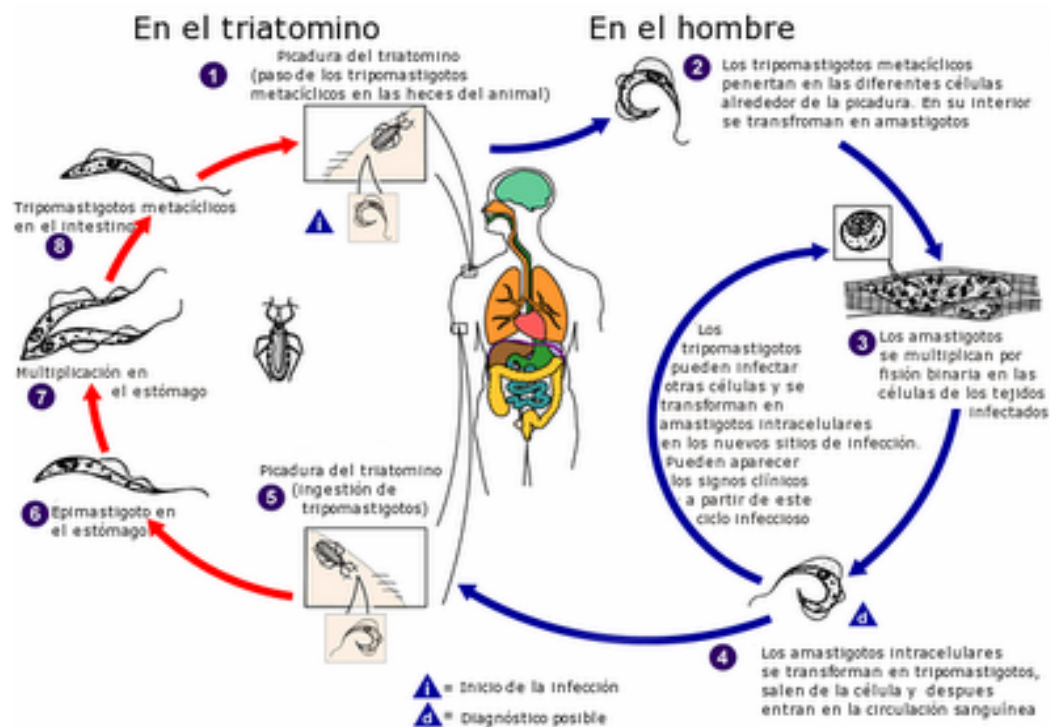


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*, tomado de Centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC).

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

En cuanto a la regulación de la expresión de sus genes, *T. cruzi* también presenta características que lo distinguen de otros organismos. Los genes de *T. cruzi* son transcriptos de forma policistrónica por la ARN pol II (pol I transcribe

ARNr y pol III ARNt), no poseen intrones y los pre-ARNm son procesados por trans-splicing (único de tripanosomátidos, *Euglena* y nemátodos) en el núcleo. Los transcriptos de tripanosomátidos no presentan secuencias señal, sin embargo los ARNm presentan en su extremo 5' una secuencia conocida como mini- exón o "spliced leader" de 39 nt, los cuales se adicionan a los mensajeros por trans-splicing, siendo esta secuencia esencial para la traducción del mensajero, luego al extremo 5' se le adiciona el cap 5' al igual que eucariotas superiores. A su vez la cola poli A es adicionada también por trans-splicing ya que no existe la secuencia señal en el transcripto como en otros eucariotas [23]. Debido a su mecanismo de transcripción la regulación de la expresión génica en este parásito es principalmente a nivel co- o post- transcripcional por lo que se torna un buen modelo para el estudio de la regulación génica a nivel post-transcripcional.

T. cruzi, *L. major* y *S.cerevisiae* entre otros, son organismos que han perdido la maquinaria involucrada en la vía de ARNs interferentes, lo que los hace ARNi negativos. Sin embargo específicamente *T. cruzi*, *L. major*, *T. brucei* y *T. vivax* presentan en su genoma una proteína de unos 1100 aminoácidos miembro de la familia Argonauta, la cual tiene un único dominio PIWI y carece del dominio PAZ conservado [21]. Estudios filogenéticos recientes sugieren que esta proteína observada en tripanosomátidos surgió previo al evento de duplicación donde se formaron la subfamilia AGO y subfamilia PIWI en la evolución [21]. La misma ha sido estudiada recientemente en nuestro laboratorio donde se propuso una clasificación adicional que incluye a TcPIWI-tryp y TbPIWI-tryp para *T. cruzi* y *T. brucei* respectivamente [21].

Así mismo mediante estudios de modelado bioinformático estructural surgió que la proteína Argonauta de *T. cruzi* (TcPIWI-tryp) contiene un único dominio PIWI bien conservado, con actividad catalítica y una estructura RNasa H característica de proteínas Argonautas. A su vez *T. cruzi* presenta una estructura OB- fold (oligonucleotide/oligosacarid binding fold, utilizada para el reconocimiento de ácidos nucleicos) en la región N-terminal, sugiriendo la presencia de un dominio homologo al dominio PAZ de proteínas Argonautas. Además de la región OB- fold, TcPIWI-tryp contiene una región corta de polyQ en la región N-terminal presente en las proteínas Argonautas tanto de

trypanosomátidos como de eucariotas superiores. Esta región ha sido implicada en la interacción proteína- proteína.

La proteína TcPIWI-tryp en *T. cruzi* se expresa en todos los estadios del ciclo y es reclutada en patrones granulares que aún no han sido caracterizados [21].

1.5-Nueva familia de sARNs: fragmentos derivados de ARNs de transferencia.

Los ARN de transferencia (ARNt) representan el 15% del ARN celular. En eucariotas los genes de ARNt son transcritos por la ARN polimerasa III y los pre-ARNt son procesados y modificados antes de ser funcionalmente maduros, con una longitud entre 73 y 93 nucleótidos [1]. Si bien los ARNt cumplen un rol fundamental a nivel de traducción, mediante la incorporación de aminoácidos al péptido creciente, también están involucrados en procesos como en la biosíntesis de peptidoglucanos, adición de aminoácidos a lípidos y regulación de la apoptosis en mamíferos [27].

Recientemente estudios de secuenciado masivo han revelado la presencia de fragmentos derivados de ARNt en diversos organismos, en distintas condiciones de estrés (*Tetrahymena*, *Drosophila*, *Aspergillus* y líneas celulares humanas entre otras) [28-34]. Lo llamativo de estos fragmentos fue que presentaban cierto patrón en su clivaje (principalmente a nivel del anticodón), no mostraban intrones y presentaban el extremo 5' modificado, característica de ARNt maduros [34]. Además si bien estos fragmentos aparecen en condiciones de estrés no se observan bajo cualquier tipo de estrés, más bien bajo estrés nutricional, oxidativo y en el desarrollo. Siendo esta repuesta otra señal de que los fragmentos observados no son producto de degradación [34].

En cuanto a la maquinaria involucrada en el clivaje de los ARNt, se ha reportado que en levaduras la proteína involucrada en el clivaje es una RNasa de la familia T2 denominada Rny1, a su vez en mamíferos el clivaje de los ARNt bajo condiciones de estrés depende de la Angiogenina, una RNasa de la familia A. Si bien hace poco se involucra a la Angiogenina en esta vía, esta proteína también participa en la respuesta frente a la hipoxia promoviendo la angiogenesis y la

proliferación celular, estando esta vía bien caracterizada[34, 35]. En el citoplasma la Angiogenina se une a un inhibidor RNH1, no dejándola actuar a nivel citoplasmático, sin embargo estudios recientes sugieren una disociación de RNH1 y la Angiogenina en condiciones de estrés, promoviendo el clivaje de los ARNt por la Angiogenina a nivel del anticodón. De los fragmentos generados, son activos los que derivan del sector 5' del ARNt [34, 35]. Además se demostró que estos fragmentos son activos, siendo capaces de inhibir la traducción. Por otro lado existen evidencias en células embrionarias de ratón y en células de mamíferos, más específicamente, en HeLa, de que Dicer está involucrada en este proceso (mostrando una mayor sensibilidad que para los miARN), clivando los ARNt en el D-loop, generando fragmentos de ~19nt [36].

Tabla 1. Clivaje de ARNt en diferentes organismos [1]

Species	Conditions inducing cleavage	Cleavage specificity	Cleavage position	Product length	Endonuclease	Proposed functions
<i>E. coli</i> ^[31,32]	stress-induced signal	tRNA ^{Tyr, His, Asn, Asp}	positions 34 and 35		colicin E5	impair protein synthesis and cause cell death
		tRNA ^{Arg} isoacceptor	positions 38 and 39		colicin D	
<i>T. thermophila</i> ^[30]	essential aa starvation	all tRNAs	anticodon loop region	30—35 nt	unknown	eliminate uncharged tRNA/ signaling molecule
<i>S. coelicolor</i> ^[24]	cell differentiation	all tRNAs	anticodon loop region	30—35 nt	unknown	a metabolic cue to switch developmental programs
<i>A. fumigatus</i> ^[33]	cell differentiation		3' adjacent to the anticodon		unknown	downregulate protein synthesis
Mammalian cells ^[36]	various stresses		anticodon loop region	35—37 nt	angiogenin	stress response
Yeast, plant, human cells ^[37]	oxidative stress		near or in anticodon loop region	~40 nt	unknown	signal transducer or inhibit translation
<i>G. lamblia</i> ^[41]	various stresses	all tRNAs	anticodon left arm	~46 nt	unknown	downregulate global gene expression

Existen varios mecanismos posibles por los cuales los fragmentos derivados de los ARNt pueden inhibir la traducción. Una posibilidad es que estos interactúen con proteínas aún no identificadas formando un complejo represor. En cuanto a las proteínas Argonautas aún no está bien establecido el rol que cumplen en esta vía aunque se han realizado experimentos en los que se co-purificaron los sARNs con complejos proteicos que poseen proteínas Argonautas, sugiriendo que estos fragmentos pueden funcionar como los siARN y los miARN [34, 36].

Si bien el mecanismo de acción aun no es muy bien entendido, existen evidencias experimentales de que los fragmentos derivados de ARNt juegan un

importante rol en la regulación de la expresión génica al igual que los sARNs. Varios estudios sugieren que en ciertos organismos el clivaje de los ARNt conlleva una disminución en el pool de ARNt inhibiendo la traducción, lo que no es una explicación viable para todos los organismos debido a que durante el período de estrés la cantidad de ARNt maduros no disminuye significativamente. Por otra parte se han propuesto varios mecanismos por los cuales los fragmentos derivados de ARNt inhiben la traducción. Por un lado se propuso la formación de un complejo multiproteico que actúa de manera similar a los sARNs, ya que se copurificó fragmentos de ARNt junto con proteínas Argonautas sugiriendo que estos fragmentos pueden actuar como los miARN y los siARN. Otra posibilidad es que los fragmentos guíen el clivaje y destrucción de los ARNm mediante el reclutamiento de enzimas [34]. Por otro lado Lee y cols. demostraron que ciertos fragmentos derivados de ARNt (tRFs) promueven la proliferación celular en diferentes líneas celulares [37].

1.6-Hipótesis.

Como mencione anteriormente los fragmentos derivados de ARNt han sido reportados en *T. thermophila*, *A. fumigans*, levaduras, *Drosophila*, humanos y plantas reflejando un procesamiento específico, característico de ARNt y sugiriendo un mecanismo conservado a lo largo de la escala biológica [28, 29, 31, 33].

La búsqueda de nuevas vías de regulación de la expresión génica y en particular asociada a pequeños ARN se torna relevante en *T. cruzi* debido a que:

- presenta un complejo ciclo de vida y una gran adaptación a diferentes ambientes
- codifica una proteína característica de tripanosomátidos, homóloga a otras proteínas Argonautas
- posee principalmente una regulación génica a nivel post-transcripcional.

Utilizando *Trypanosoma cruzi* como modelo de estudio, bajo estrés nutricional y en condiciones normales, se ha reportado en nuestro laboratorio, mediante análisis de secuenciado la presencia de una población de sARNs derivados de ARN de transferencia, representada principalmente por fragmentos derivadas de mitades 5' de aproximadamente 30 nt, los cuales se restringen a un

pequeño grupo de isoaceptores, siendo estos el resultado de un procesamiento a nivel del anticodón o cercano a él. Estos resultados se observaron principalmente en los parásitos que estaban bajo estrés nutricional [28].

Al mismo tiempo se ha reportado que estos fragmentos derivados de ARNt son reclutados en gránulos específicos en el citoplasma [28]. A su vez estudios realizados con FISH sugieren una co-localización de los fragmentos derivados de ARNt con la proteína “Argonauta” de *T. cruzi*, TcPIWI-tryp, dentro de los gránulos aún no caracterizados.

Estos antecedentes no llevó a plantearnos lo que fue el objetivo de este trabajo, donde nos planteamos demostrar una posible vinculación entre la proteína argonauta TcPIWI-tryp de *T. cruzi* y la población de pequeños ARNs identificados previamente en el laboratorio.

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

En este trabajo se pretendió demostrar la asociación de la proteína TcPIWI-tryp a una población de pequeños ARNs no codificantes. Asimismo se pretendió caracterizar los sARNs asociados a esta proteína mediante secuenciado masivo.

2.2 Objetivos específicos

- Inmunoprecipitación de TcPIWI-tryp.
- Visualización de TcPIWI-tryp mediante tinción con plata y Western Blot.
- Obtención de fragmentos de sARNs entre 15 y 30nt.
- Clonado y secuenciado de los sARNs inmunoprecipitados.
- Secuenciado masivo de sARNs co-inmunoprecipitados.
- Análisis de secuencias.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Cultivo de *T. cruzi*.

Para este trabajo se utilizaron parásitos epimastigotes sobreexpresantes (sobrexpresaban la proteína TcPIWI-tryp) y wild tipe (wt) de una cepa Dm28c los cuales fueron cultivados y expandidos a 28°C en medio axénico LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor hasta fase exponencial temprana de crecimiento, por medio de pasajes semanales.

3.2 Lisis de parásitos y obtención de fracción citoplasmática.

Se obtuvieron los parásitos del medio de cultivo mediante centrifugación (3000g durante 8 min). Una vez obtenidos en cultivo fueron lisados con un buffer de lisis (ver anexo) de manera tal que no se lisaron los núcleos ya que nos interesaba la fracción citoplasmática. La lisis de los parásitos se realizó incubando a estos mismos durante 2 horas a 4°C con el buffer de lisis, en agitación, luego se centrifugó durante 20 min a 7000g a 4°C.

3.3 Cuantificación proteica del extracto total.

Para la cuantificación proteica se utilizó el reactivo BCA (sigma), siguiendo el protocolo del fabricante. Para obtener la concentración proteica de nuestro extracto se realizó una curva de calibración con BSA (seroalbúmina bovina). A su vez en cada pocillo de la placa se sembraron 25µl de muestra en diferentes diluciones para que caigan dentro de la curva de calibración. Como blanco se utilizó buffer de lisis 10mM.

3.4 Crosslinking e inmunoprecipitación.

Para realizar la inmunoprecipitación se utilizaron esferas magnéticas, Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (invitrogen). Previo a la incubación del anticuerpo anti-TcPIWI-tryp con el extracto proteico se realizó un crosslinking entre nuestro anticuerpo y los anticuerpos anti-conejo unido a las esferas magnéticas. Comenzamos realizando 2 lavados con PBS 1X a 200µl de esferas magnéticas. Luego se incubó las bolitas en 500µl de buffer de dilución (ver anexo)

durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se incubó las esferas en 500µl de buffer de dilución con 5µl de anticuerpo anti-TcPIWI-tryp (producido en el laboratorio), 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Luego de las 2 horas se lavó las esferas con 100µl con buffer de dilución y se hizo un lavado con PBS 1X. Posteriormente se realizó 1 lavado con 200µl de HEPES 20mM, pH 7,5 y 20µl de Glutaraldehído 2,3% recién preparado, durante 5 min a 37°C y 1 lavado durante 5min en HEPES 20mM pH 7,5 a temperatura ambiente, realizando estos dos últimos pasos por triplicado. Consecuentemente se realizaron 2 lavados con 50µl de buffer de parada (Tris-HCl, pH 8, 1M), 5min a temperatura ambiente cada uno. Una vez realizado el crosslinking se prosiguió con la inmunoprecipitación. Se incubó 1ml de extracto proteico (previamente extraído, ver punto 3.2) con las esferas magnéticas overnight a 4°C. Luego la fracción que no se unió (fracción no unida) se guardó como control, a continuación las esferas se lavaron 3 veces con 1ml de buffer de lisis, guardando también estos 3 lavados como control. Por último se eluyeron las proteínas con 100µl de glicina 0,2M pH 2,5 durante 5 min en agitación y se les ajusta el pH con 10µl de Tris-HCl 0,5M pH 9,5.

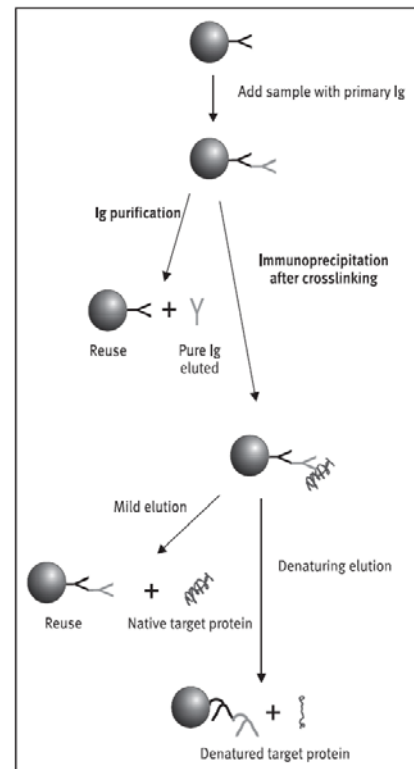


Figura 5. Esquema estratégico de la inmunoprecipitación.

3.5 Extracción de proteínas y ARN del extracto inmunoprecipitado.

Se realizó la extracción de proteínas y del ARN de la fracción unida a las esferas magnéticas durante la inmunoprecipitación con el reactivo TRIzol (invitrogen), con un protocolo adaptado a pequeños ARNs (ver anexo). Una vez obtenidas las proteínas y el ARN se procedió a realizar ensayos que nos permitieran visualizar y analizar tanto la proteína TcPIWI-tryp como los ARN asociados a ella, pudiendo inferir en algún tipo de vínculo entre ellos.

3.6 Visualización de proteínas por tinción con plata.

Para la visualización de las proteínas inmunoprecipitadas y su comparación con la fracción no unida, los lavados y los extractos totales se realizó una electroforesis SDS-PAGE (desnaturalizante) con un gel al 8%, en un buffer de corrida 1X, realizando la corrida a 25mA.

La tinción se realizó con plata mediante la utilización del Kit “SilverQuest” de invitrogen.

3.7 Western Blot.

Para realizar el Western Blot (WB) se tuvo la precaución de sembrar no menos de 30 μ g de proteína por pocillo debido a que durante la transferencia y los lavados se pierde proteína afectando la sensibilidad de la técnica. Se comenzó separando las proteínas mediante electroforesis utilizando un gel de acrilamida 8% desnaturalizante. Luego se realizó la transferencia de las proteínas del gel hacia una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) mediante transferencia eléctrica durante 4 horas a 300mA. Para la verificación de una buena transferencia y un buen estado de las proteínas se realizó una tinción momentánea de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Luego se realizó el bloqueo de la membrana, incubándola con PBS-BSA 5% a 37°C durante 1 hora 30min u overnight a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X- Tween 0,1% durante 5 min cada uno en agitación, seguido de esto se incubó la membrana con el anticuerpo primario, anti-TcPIWI-tryp 1/2000 (hecho en conejo, sintetizado en el laboratorio), en BSA 2%, Tween 0,1%, PBS 1X, durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo se lavo 3 veces la membrana con PBS-Tween 0,1% durante 5 min cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (DAKO) usado en una dilución 1:10.000 en PBS-BSA 2%, Tween 0,6%. Por último se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,6%. Una vez unido el secundario se procedió a la revelación de la membrana utilizando el reactivo ECL (VIVO Science), se expuso la membrana a un film (High performance chemiluminescence film, GE), variando el tiempo de exposición de acuerdo a la señal obtenida o la cantidad de proteína sembrada.

3.8 Visualización de ARN y obtención del mismo para secuenciado.

A partir del ARN obtenido de la extracción con TRIzol se corrieron las muestras en un gel de acrilamida desnaturalizante al 15%, urea 7,5M, utilizando para la corrida buffer TBE 0,5X (Tris-Borate-EDTA). Luego se tiñó el gel con Sybr-gold (Invitrogen) para la visualización del ARN. La visualización del ARN en el gel nos permitió la identificación de una población de pequeños ARN (15-30nt). Dicha fracción del gel fue cortada y posteriormente se eluyó el ARN del gel. La elución del ARN se realizó incubando los cortes de gel en 2 volúmenes de NaCl 0,3M overnight a 4°C en agitación y luego agregando al sobrenadante 3 volúmenes de etanol absoluto overnight o más a -80°C.

3.9 Clonado de sARNs inmunoprecipitados.

Para el clonado de “sRNAs” se procedió como se describe en [38] con algunas modificaciones, partiendo de una muestra de 300 µg de ARN total. Los “sRNAs” entre 18 y 32 nt fueron eluidos a partir de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% en urea 7.5 M. El fragmento de gel conteniendo dichos fragmentos fue seleccionado de acuerdo a la movilidad relativa de marcadores moleculares de ADN teñidos con bromuro de etidio. Luego de la ligación de adaptadores 5' y 3' que contienen el sitio de restricción Ban I, los “sRNAs” fueron amplificados por PCR con cebadores comunes a los adaptadores y posteriormente digeridos enzimáticamente con Ban-I. Los productos amplificados fueron concatamerizados y clonados en el vector pGEM T-easy (Promega Corp., Buenos Aires, Argentina) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Luego de la transformación de bacterias competentes (*E. coli*, cepa DH5α), se realizó el tamizaje de colonias positivas por PCR de las mismas, seleccionándose aquellas colonias cuyo inserto superó las 500 bp. Las minipreparaciones de ADN plasmídico realizadas con esas colonias fueron directamente sometidos a secuenciado. El análisis de secuencias y búsquedas en el BLAST fueron realizadas usando la información obtenida de bases de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), GeneDB (<http://www.genedb.org/> [genedb/tcruzi/index.jsp](http://www.genedb/tcruzi/index.jsp)) y TcruziDB (<http://tcruzidb.org/tcruzidb/>).

3.10 Preparación de muestras para el envío a secuenciado masivo.

Para el envío del ARN a secuenciado masivo luego de la elución de los sARNs se resuspendió en Etanol absoluto, NaCl 0,3M, 1µl de glicógeno y 1µl de RNasa out.

3.11 Secuenciado masivo Illumina solexa.

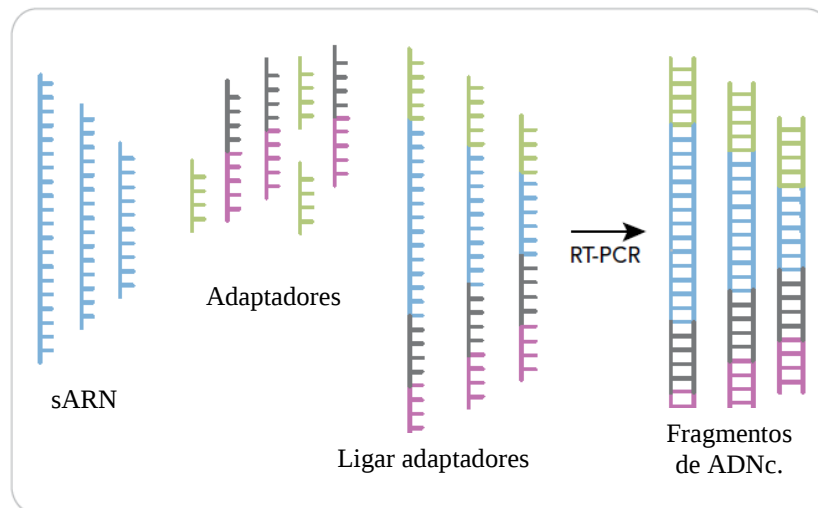


Figura 6. Esquema ilustrativo del protocolo de secuenciado masivo de sARNs con Illumina solexa 1.9.

Para realizar el secuenciado masivo de los sARNs inmunoprecipitados, las muestras fueron enviadas a Suecia, a la Universidad de Lund. Como se muestra en la figura 6, para realizar el secuenciado se realizó la construcción de una librería de ADNc (ADN copia). Las muestras fueron resuspendidas como mencione en el punto 3.9 y enviadas a Suecia, luego para la obtención de la librería se realizó la ligación de los adaptadores 5' y 3' a los sARNs. Una vez ligados los adaptadores para obtener el ADNc se realizó una retro-transcripción y para la amplificación de los mismos se realizó una PCR. Para la PCR se utilizó primer complementarios a los extremos de los adaptadores. Seguidamente se purificó el ADNc obtenido mediante una corrida electroforética y por último se valido la librería midiendo la pureza de la muestra y su concentración. Una vez obtenidas las muestras se realiza reacción de secuenciación.

4-RESULTADOS

4.1 Gel teñido con plata.

Partiendo de una concentración proteica de 150 µg en nuestro extracto proteico se realizó la inmunoprecipitación. Una vez realizada la misma (ver procedimiento en 3.4) y obtenida la fracción proteica de la extracción con TRIzol (ver anexo) a partir de la fracción unida a los anticuerpos durante la inmunoprecipitación, se corrieron las muestras (fracción unida y fracción no unida) en un gel desnaturalizante al 8% y se realizó una tinción con plata (figura 7). Como era esperado se observó la presencia de proteína alrededor de 110kDa ya que la proteína inmunoprecipitada, TcPIWI-tryp, pesa aproximadamente 110kDa. Si bien observamos la presencia de proteína con ese peso molecular no podemos afirmar que TcPIWI-tryp está presente mediante tinción con plata, aunque nos sirve como evidencia del estado de las proteínas inmunoprecipitadas y lo tomamos como una señal de que posiblemente nuestra proteína pueda haber inmunoprecipitado. A su vez se observó la presencia de otras proteínas que co-inmunoprecipitaron con la proteína TcPIWI-tryp (figura 7).

Pensando en que si identificamos estas proteínas co-inmunoprecipitadas contribuiríamos al entendimiento del mecanismo de acción de TcPIWI-tryp, algunas de las proteínas fueron eluidas del gel y enviadas al espectrómetro de masa para su identificación. Se logro identificar a una “heat shock protein” de 100 kDa de *T. cruzi* (figura 8).

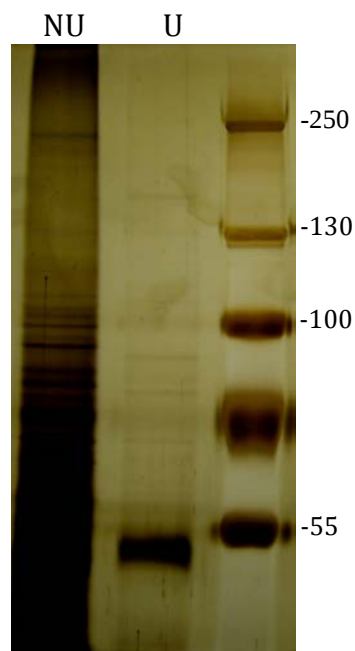


Figura 7. Gel SDS-PAGE 8%, tinción con plata. NU: Fracción que no se unió al anticuerpo en la inmunoprecipitación. U: Fracción inmunoprecipitada. MPM: Marcador de peso molecular.

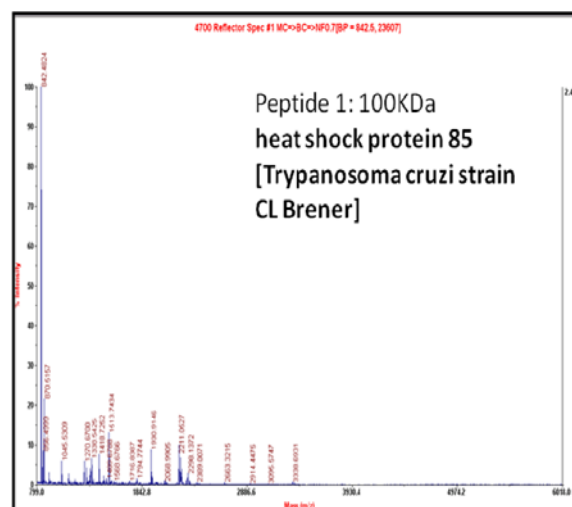


Figura 8. Espectro obtenido del espectrómetro de masa de proteínas co-inmunoprecipitadas con TcPIWI-try. Proteína heat shock de *T. cruzi* de 100 kDa.

4.2 Western Blot de extractos totales e inmunoprecipitación.

Para verificar que la proteína Argonauta estaba en nuestro extracto proteico y que además era efectivamente inmunoprecipitada se realizó un WB anti-TcPIWI-

tryp. Lo primero que observamos fue que la proteína estaba siendo sobre expresada en los parásitos sobrexpresantes (figura 9a), debido a que observamos una mayor señal en los parásitos sobrexpresantes.

Por otro lado se realizó el WB de la fracción inmunoprecipitada donde además utilizamos como control la fracción no unida de la inmunoprecipitación (figura 9b). Lo que observamos en este WB fue que efectivamente la proteína fue inmunoprecipitada, observándose una banda de aproximadamente 110 kDa únicamente en la fracción unida.

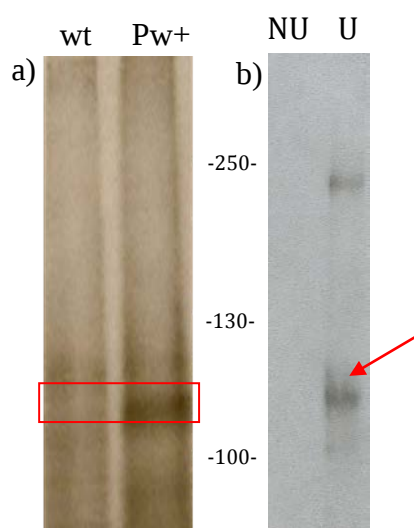


Figura 9. Western blot anti TcPIWI-tryp. a) WB extractos totales de parásitos wild type y sobrexpresantes b) WB de la inmunoprecipitación.

4.3 Visualización y obtención de la población de sARNs.

Una vez verificada la inmunoprecipitación de la proteína TcPIWI-tryp mediante WB se procedió a la visualización del ARN co-inmunoprecipitado, extraído con TRIzol. El ARN extraído se corrió en un gel desnaturizante al 15% y como control también se sembró el ARN de la fracción no unida de la inmunoprecipitación (figura 10a). Lo que observamos fue la presencia, en la fracción unida, de una población de sARNs entre 20-35nt. Este resultado muestra una asociación entre la proteína Argonauta de *T. cruzi* y los sARNs ya que esta población de sARNs observada no está presente en la fracción no unida.

Por otro lado con la idea de verificar la relación entre el aumento de la proteína argonauta y los sARNs, se extrajo el ARN de extractos totales de parásitos epimastigotes wild type y de los sobrepresantes y se los corrió en un gel de acrilamida desnaturizante al 15% (figura 10b). Pudiendo verificar también que un aumento de la proteína conlleva un aumento en la producción de sARNs.

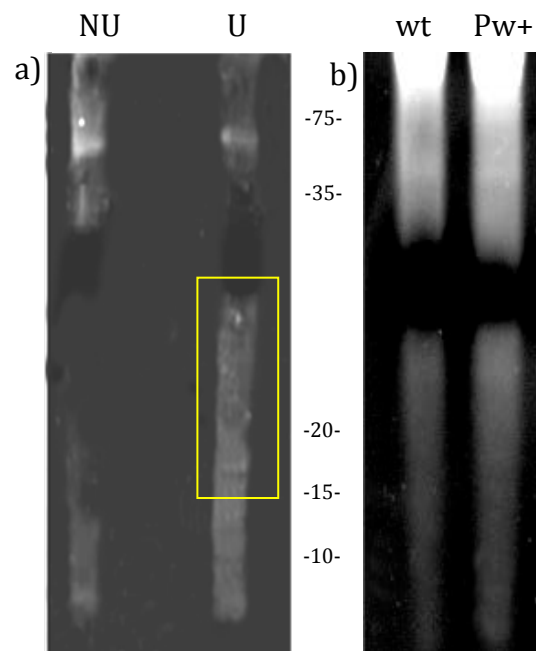


Figura 10. Gel de ARN desnaturizante al 15%. a) Inmunoprecipitación, NU: fracción no unida, U: fracción inmunoprecipitada. b) wt: extracto total de wild type, Pw+: extracto total de sobrepresantes.

4.4 Clonado de sARNs inmunoprecipitados.

En el clonado de sARNs inmunoprecipitados de epimastigotes sobrexpresantes, se generaron 50 clones (ver protocolo en materiales y métodos). Los clones obtenidos fueron secuenciados y analizados, eliminándose las secuencias menores a 18nt, obteniendo 28 secuencias de sARNs (Tabla 2).

Tabla 2. . sARNs clonados en la librería de cDNA de tamaños ~20-40 nt de epimastigotes sobrexpresantes de *T. cruzi*.

CLON ID	SECUENCIA	nts	BLAST
A2.1	cgatgtcggctcttcctaacctagcgccgca	31	rRNA
A2.2	gacaggggaacgtgagctggg	20	rRNA
B3	cgccagcatagtggttagtatacccgcc	28	tRNA Asp GTC (ver MINUS)
B4	cgcgagagatcgcgnttcngtccccgcccgtcgt	35	tRNA Val (ver MINUS)
B9	caccactgacaggggaacgtgag	23	rRNA
B9.2	cggatctgaggggttcaggttcgtgtcctgccgggatcgc cc	39-41	tRNA Arg
D7	ttcaaccgcgaattccagctagtcagcca	29	NONE
G4	ctctgtagtatagtggttagtatacccgcc	30	tRNA Asp GTC dado vuelta o tRNA GLU 5'
F1	ctcggtagtatagtggttagtatacccgcc	29	tRNA Asp GTC dado vuelta o tRNA GLU 5'
G5.2	ctcggtagtatagtggttagtatacccgcc	30	tRNA Asp GTC dado vuelta
E7.2	ggaacccggggtgtgtactctc	23	5S RNA
B7.2	ctcggtagtatagtggttagtatacccgcc	29	Trna Asp GTC
D9	ntctgtagtatagtggttagtatacccgcc	30	tRNA Asp GTC
E8.2	gccgccccagccaaactccccatctggcag	30	rRNA
E10	ctctgtagtatagtggttagtatacccgcc	30	tRNA Asp GTC
F6.1	cggactgcgcac	12	none
F8.1	tgggagaggttccgggttcatttccgggtgggc	34	tRNA Pro
F8.3	ccggtgtgtatagtggttagaacaggcgcc	31	tRNA Glu CTC
F10	tccggtaccgggaatcgaaccggatcttctggg	34	tRNA GluTTC
F10.2	accggcccgcgccctccgcc	22	Open Reading Frame Tcruzi_16514-1-1-246 from Tcruzi_16514.
F10.3	tggctgactagctggaattcgcggttaa	29	none
F10.4	gcgggtataactaaccactatactaccga	28	tRNA Asp GTC
E12.1	acaaggccagcgatcct	17	NO HITS en genoma
E12.2	cagttgcgcagcctgaatggcgaatggacgcgcc	35	 Tc00.1047053508693.199
D2.1	gccgccccagccaaactccccatctggcag	30	rRNA
D2.1	tccttcgctgtagttcgtctg	22	NO HITS
D3	ctcngtantatantggttannatacccgcc	30	NONE
H1	ccagaagatccgggttcgattcccggtaccgga	33	tRNA Val
H5	ccgataaccctgggttcngtccaggtgggagtg	34	tRNA Gln

Analizando las secuencias obtenidas del clonado se observó en el gráfico 1, un enriquecimiento de los fragmentos derivados de ARNt representando el 55,6%. A su vez examinando más detenidamente las secuencias que derivaban de ARNt (gráfico 2), observamos que estos fragmentos no se distribuían uniformemente entre todos los isoaceptores sino que el de Aspártico estaba más representado (53%) y derivaban principalmente de la región 5' del ARNt.

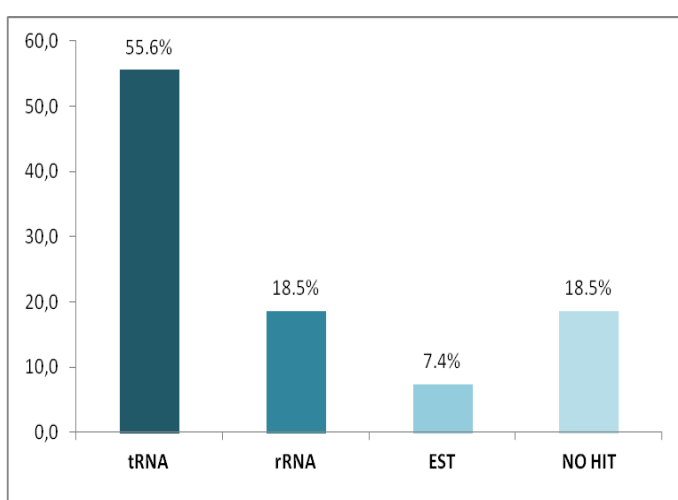


Gráfico 1. Distribución de los clones de DNAC obtenidos de la librería de "sRNAs" inmunoprecipitados en *T. cruzi*.

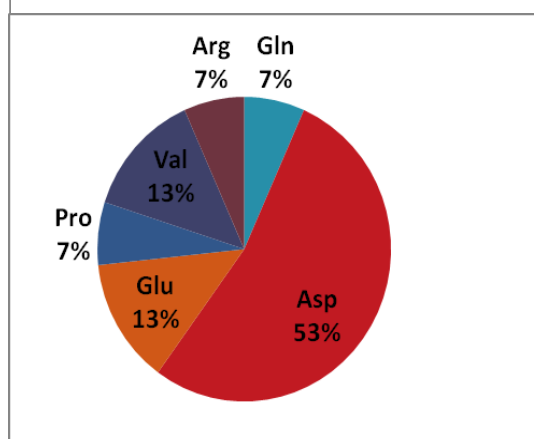


Gráfico 2. Distribución de los diferentes tipos de isoaceptores representados por los "mini-tRNAs" clonados.

4.5 Secuenciado masivo.

Primero que nada quiero destacar que el análisis y la interpretación de los datos del secuenciado masivo se realizó con la ayuda de la unidad de bioinformática del Instituto Pasteur (Lic. Álvaro Pena).

El análisis general de los resultados obtenidos en el secuenciado masivo se muestra en la tabla 3, donde se obtuvo un total de 29.966.209 de reads con un largo promedio de las secuencias de 61nt y un 45% de GC.

Medida	Valores
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger/Illumina 1.9
Total reads	29966209
Sequence length	61 nt
%GC	45

Tabla 3. Análisis general de datos obtenidos a partir del secuenciado masivo.

Gráfico 3. Calidad de los reads por base.

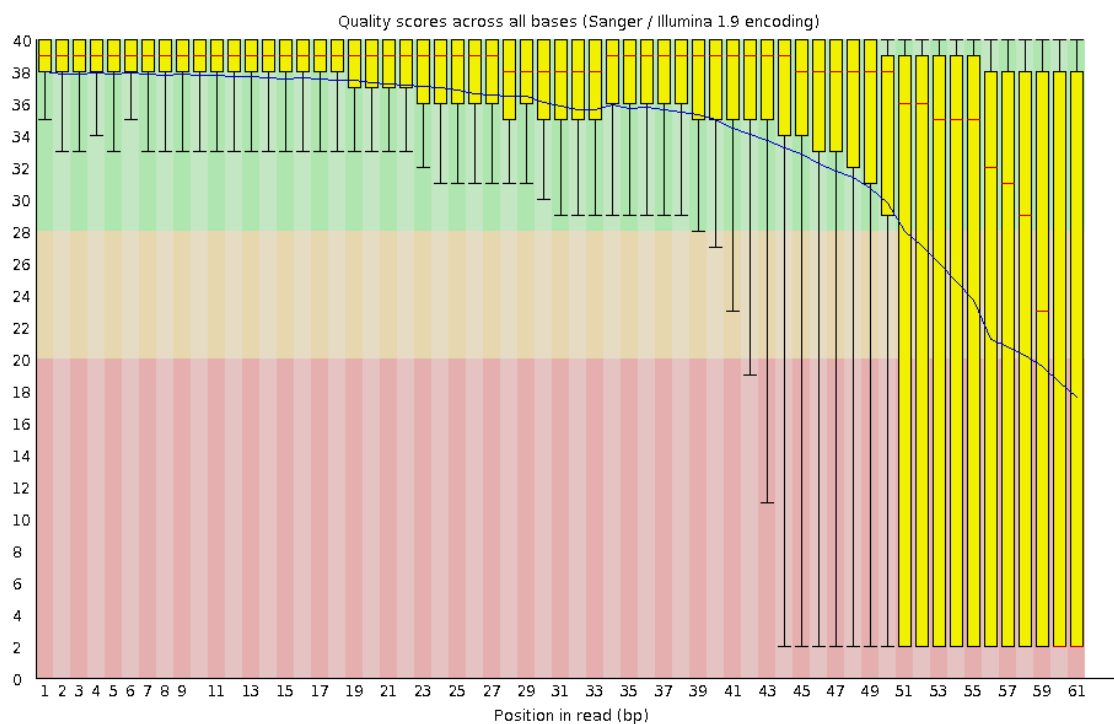


Gráfico 4. Composición nucleotídica por base.

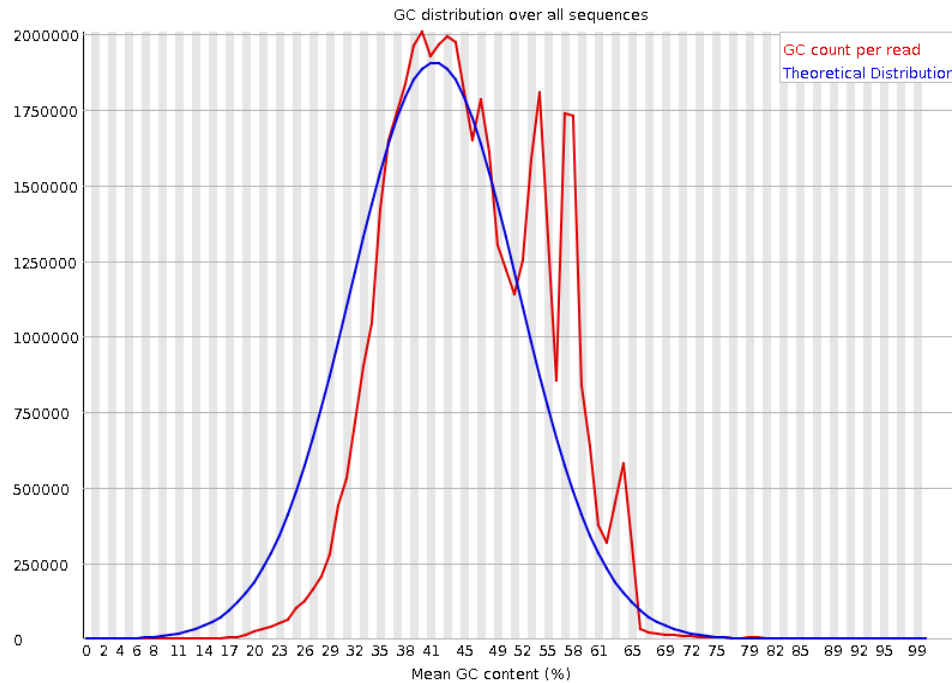
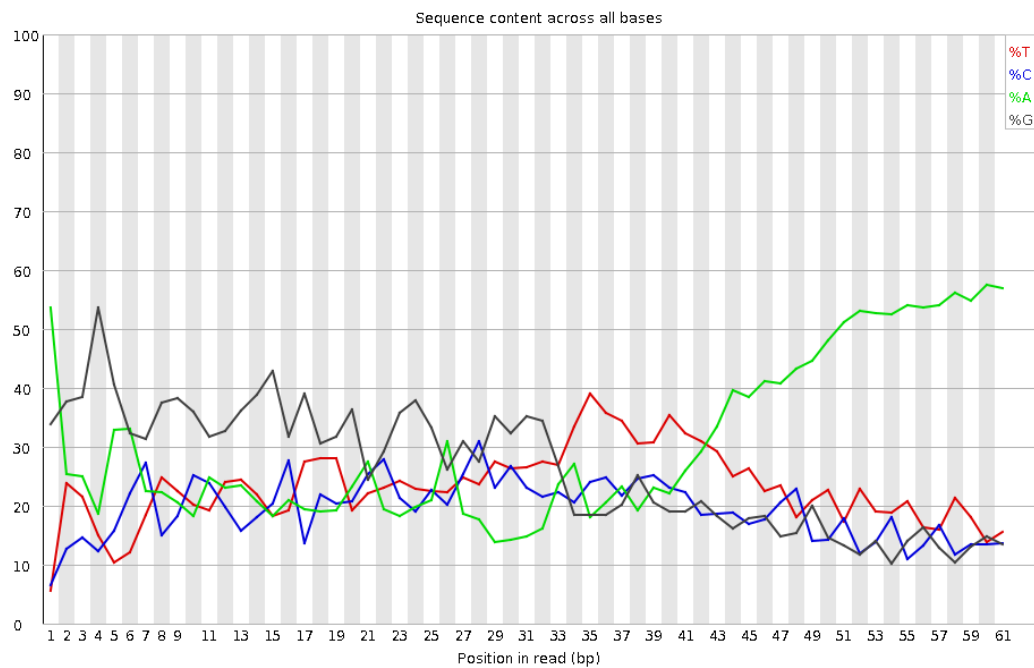


Gráfico 5. Contenido en GC por read.



Con los 29.966.209 reads obtenidos en el secuenciado se realizó un filtrado de los mismos con la idea de simplificar la interpretación de los datos obtenidos.

Se comenzó separando las secuencias sobrerrepresentadas (primer y no Hits), obteniendo 24.049.383 reads. Luego este set se lo filtro por calidad, donde los reads deben tener al menos un 65% de sus bases con un valor de calidad al menos superior a 20. Aquí se eliminó el 8% de los reads los cuales representaron 2.096.425 reads.

A su vez se realizó con los 21.952.958 reads restantes una siguiente filtración donde se filtro los artefactos de secuenciación donde se eliminaron reads que tuviesen todas sus bases idénticas o todas idénticas menos 1, 2 o 3 bases. De este filtrado se obtuvieron 21.952.016 reads.

Luego se eliminaron los adaptadores en los reads que estén presentes exigiendo un largo mínimo de 15 pb. De esta forma se eliminan 3.197.571 reads por quedar demasiado cortos y 20145 reads que sólo presentan adaptadores.

De esta forma se obtuvieron **18.734.300 reads finales**.

Una vez filtrados y ordenados los reads fueron mapeados contra el genoma de *T.cruzi* Esmeraldo, No Esmeraldo y No asignado. De los 18.734.300 reads, mapearon contra el genoma el 58% de los reads, siendo un total de 10.770.942 reads. A su vez el algoritmo utilizado para realizar el blast fue bowtie permitiendo un solo mismatch, es decir que no que no haya mas de una base desapareada por read.

El 28% de los reads (5.227.555) mapearon de manera única y el 30% de los reads (5.543.387) mapearon en múltiples loci. Dentro de los reads que mapearon en múltiples loci se descartaron aquellos reads que mapeaban en más de 20 sitios. Estos representaron 223.510 reads. Por lo tanto se cuenta con un set de datos finales que mapean en múltiples loci de 5.319.877.

Se realizó una tabla según el producto para el cual codifica la secuencia genómica en la que mapean los reads (Tabla 4).

	ARNm	ARNr	ARNt	ARNsn	Ambiguos	No feature
UNI	995600	3654427	37929	2540	1947	535112
MULTI	110828	4867128	22651	15490	24	303756
OVER	0	5130698	0	0	0	0

Tabla 4. Secuencias genómicas en la que mapean los reads. UNI-Número de reads que mapean de manera única. MULTI- reads que mapean en multiples loci. OVER- reads sobre-representados separados inicialmente. Ambiguos, son aquellos reads que mapearon al mismo tiempo y los no feature, son reads que mapearon en regiones intergénicas.

A su vez se realizó una tabla con los porcentajes relativos (Tabla 5).

	ARNm	ARNr	ARNt	ARNsn	Ambiguo	No feature
UNI	19,05	69,91	0,73	0,05	0,04	10,24
MULTI	2,08	91,49	0,43	0,29	0	5,71
OVER	0	100	0	0	0	0
TOTAL	7,06	87,08	0,39	0,12	0,01	5,35

Tabla 5. Porcentajes relativos al total de reads que mapearon para cada categoría.

En la tabla 5 se observó un alto porcentaje de reads que corresponden a ARNr representando el 87% de la secuenciación, además se observó un bajo porcentaje de ARNt (0,39%) siendo esto una sorpresa ya que de acuerdo a trabajos previos en el laboratorio se espera observar un mayor porcentaje de ARNt.

Observado esto se procedió con la evaluación de los largos de los reads con respecto a cada una de las categorías.

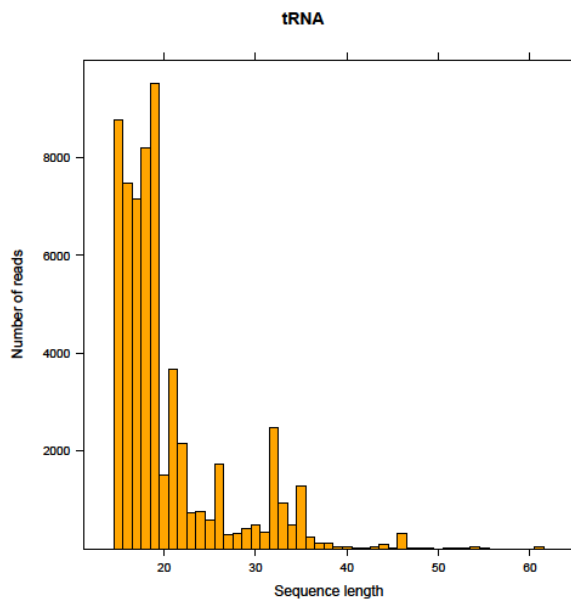


Gráfico 6. Representación gráfica del número de reads que mapean para ARNt, en función del largo de los mismos.

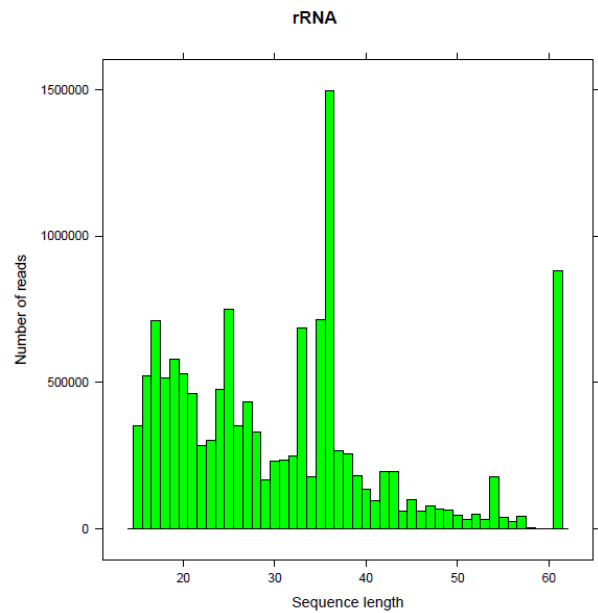


Gráfico 7. Representación gráfica del número de reads que mapean para ARNr, en función del largo de los mismos.

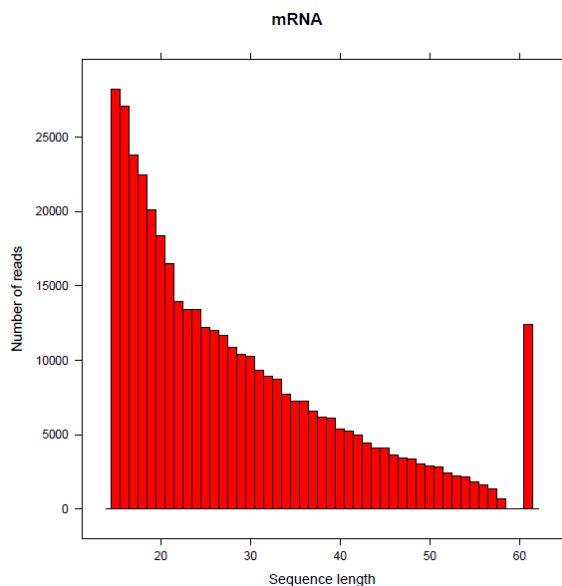


Gráfico 8. Representación gráfica del número de reads que mapean para ARNm, en función del largo de los mismos.

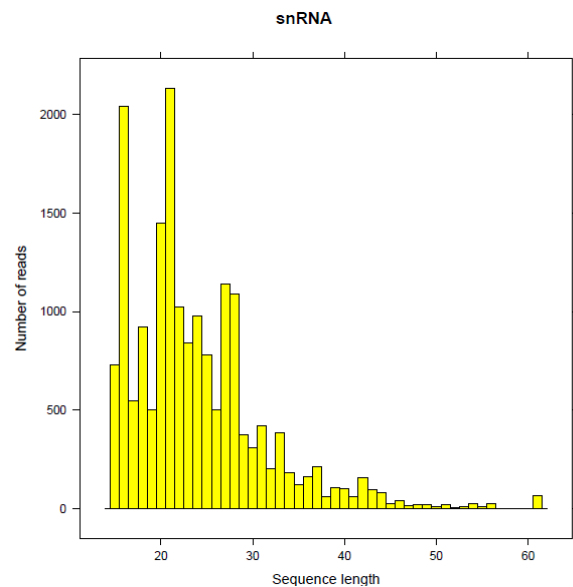


Gráfico 9. Representación gráfica del número de reads que mapean para ARNsn, en función del largo de los mismos.

A diferencia de lo que esperábamos los reads que mapean con ARNt (que son pocos) presentan un largo sesgado hacia fragmentos cortos, se puede ver un pico mucho más corto (aprox 3000 reads) en los 31-32 pb.

En el caso de los que mapean con ARNr, que representan casi la totalidad de los reads secuenciados, presentan cuatro picos en su distribución presentando un pico mayoritario en 35-36 pb.

En cuanto a los reads que mapean con ARNm se puede observar la caída gradual en la representatividad de los largos de los reads a medida que se aumenta en tamaño, lo que nos podría dar la pauta de un efecto de degradación y/o defectos en la secuenciación.

Con respecto al aspecto bioinformático, se podría decir que al permitir sólo un mismatch podríamos estar perdiendo algunas secuencias que presenten bases modificadas en más de una base como podría suceder en el caso de algunos tRNAs. Sin embargo, si cambiáramos la exigencia de mismatch a una menor también incrementaría la cantidad de reads que corresponderían con rRNA.

5- DISCUSION Y CONCLUSIÓN

Hace casi ya dos décadas los sARNs han emergido como piezas claves en la regulación de la expresión génica. Hoy en día la desregulación de vías asociadas a ellos no solo se los relaciona a enfermedades como el cáncer sino también a afecciones de tipo sistémica donde los sARNs juegan un rol central.

Si bien en los comienzos se pensó en un mecanismo de regulación sofisticado y restringido a ciertos organismos hoy en día se ha demostrado que esta vía de regulación de la expresión génica por sARNs está extendida en casi toda la escala biológica [17].

Recientemente se ha identificado un subgrupo de sARNs en varios organismos que derivan de fragmentos de ARNt [1, 29, 32, 39, 40]. A su vez diversos reportes vinculan la síntesis de estos fragmentos a varias proteínas como proteínas Argonautas, Angiogenina y tRNasa L^z [35, 39, 41]. La demostración de que estos fragmentos no son productos de degradación, que efectivamente son funcionales y se asocian a estas proteínas ha despertado gran interés en la comunidad científica ya que podría tratarse de una nueva clase de sARNs cuyo rol biológico no ha sido esclarecido 100 por ciento, mostrando además que este mecanismo de regulación de la expresión génica está presente aun en organismos no reportados y que va mas allá de la regulación de la expresión génica a nivel celular.

En nuestro grupo de laboratorio el hallazgo de sARNs y de una proteína de 1100 aminoácidos homologa a una Argonauta en *T. cruzi* fue una gran sorpresa ya que en este organismo, hasta la fecha, no existía ningún reporte ni de sARNs ni de la maquinaria asociada a los sARNs [21, 28].

Si bien en este trabajo se pretendió demostrar una asociación entre la proteína Argonauta y los sARNs de *T. cruzi* también nos interesaba realizar una caracterización de los sARNs asociados a la misma ya que se había reportado la presencia de una población homogénea de sARNs derivados de fragmentos de ARNt en este organismo.

Entonces, en cuanto a la inmunoprecipitación, si bien uno de nuestros objetivos era visualizar la presencia de proteína en la fracción inmunoprecipitada entre 110kDa y 130kDa, mediante tinción con plata, es importante considerar que esta técnica nos permite visualizar pero no identificar proteínas. Por lo que la presencia de proteína con el peso molecular esperado (110kDa) no nos permite afirmar que TcPIWI-tryp fue efectivamente inmunoprecipitada. Sin embargo esta técnica nos permitió evidenciar no solo que había proteína en el peso molecular esperado sino también el estado de la/s proteínas inmunoprecipitadas, observando la presencia de un conjunto de proteínas también co-inmunoprecipitadas con TcPIWI-tryp. Si bien estas proteínas aún no han sido caracterizadas podemos suponer que estas podrían estar formando parte de un complejo en el cual está presente nuestra proteína Argonauta ya que se ha reportado en la bibliografía la presencia de las Argonautas en complejos multiproteicos [41]. Como mencione en los resultados la identificación de las proteínas que co-inmunoprecipitaron contribuirá al entendimiento de la funcionalidad de nuestra Argonauta. De los resultados obtenidos por espectrometría de masa se identificó una proteína “heat shock” de *T. cruzi*. Esta proteína identificada forma parte de las membranas de las microvesículas [42], sin embargo no se conoce que rol estaría cumpliendo en caso de formar parte de un complejo con la proteína Argonauta TcPIWI-tryp.

Además de la identificación de estas proteínas también se envió al espectrómetro de masa las proteínas presentes entre 110kDa y 120kDa con la idea de identificar nuestra proteína argonauta, de la cual no se obtuvo el espectro. Una posibilidad que manejamos fue que esta proteína está muy poco representada en nuestro extracto proteico ya que una de las condiciones para la identificación proteica por espectrometría de masa es tener una buena cantidad y calidad proteica.

La otra técnica que se utilizó para la verificación de la inmunoprecipitación de TcPIWI-tryp fue el WB, una técnica válida para la identificación de proteínas, debido a que los anticuerpos se obtienen específicamente para la identificación de las mismas. A diferencia de la técnica de tinción con plata, el WB nos permitió verificar que la proteína TcPIWI-tryp fue inmunoprecipitada, ya que se observó la

presencia de la proteína tanto en el extracto total como en fracción inmunoprecipitada. En cuanto a los extractos totales, también pudimos verificar que efectivamente los sobrexpresantes expresan aproximadamente 4 veces más (por densitometría) de proteína que los wild type.

Además de verificar la presencia de la proteína TcPIWI-tryp en la fracción inmunoprecipitada se observó la co-inmunoprecipitación de una población de sARNs (figura 10a). Esta observación no fue tan sorprendente a la hora de hablar de sARNs en este organismo ya que previamente nuestro grupo de laboratorio había reportado la presencia de ciertos tipos de sARNs en *T. cruzi*, donde estaban enriquecidos los fragmentos derivados de ARNt [28].

A su vez mientras se esperaban los resultados del secuenciado masivo en el laboratorio se clonaron y secuenciaron los sARNs co-inmunoprecipitados, donde se observó al igual a lo reportado anteriormente la presencia de una población de sARNs derivados de ARNt, principalmente de Aspártico y Glutámico [28]. Si bien los clones obtenidos no fueron abundantes, existen reportes que en organismos como *Drosophila*, *T. thermophila* y células de mamíferos también se encuentra este perfil, lo cual contribuye a nuestra hipótesis[41, 43].

Por lo mencionado anteriormente era de esperar un resultado con el mismo perfil en el secuenciado masivo, sin embargo los resultados del secuenciado masivo no revelaron un enriquecimiento de los fragmentos derivados de ARNt. Los resultados mostraron que solo el 0,73% de los reads que mapearon de manera única mapearon con ARNt y casi el 70% mapearon con ARNr. Conjuntamente estos pocos fragmentos observados presentaron un largo sesgo hacia fragmentos cortos.

Una explicación posible que se planteó fue que haya habido algún sesgo marcado hacia las secuencias correspondientes de ARNr al realizar la fosforilación en el total de la muestra previo a la secuenciación. Otra posibilidad es que la muestra haya sido degradada y por lo tanto permanecieron los reads con mayor estabilidad estructural o los más masivos como el ARNr frente a los ARNt.

A su vez un aspecto a destacar es el gráfico observado de los ARNm que es característico de un efecto de degradación de la muestra, donde aparecen más representados los fragmentos cortos (menores a 20 pb) y menos representados los

fragmentos largos (mayores a 25 pb). Vale mencionar que también es válida la hipótesis de un defecto en la secuenciación.

A modo de conclusión cabe destacar que si bien los resultados del secuenciado masivo no fueron los esperados, pudimos inmunoprecipitar la proteína TcPIWI-tryp, demostrar una asociación de la misma con otras proteínas, las cuales no fueron identificadas aún. A su vez logramos demostrar una asociación de TcPIWI-tryp con una población de sARNs que si bien no pudimos caracterizar por secuenciado masivo, mediante clonado y secuenciado logramos identificar una fracción de sARNs enriquecidos en fragmentos derivados de ARNt.

Impacto del trabajo:

Hoy en día es conocido el rol central que juegan los sARNs en la biología de las células y de los organismos lo cual los hace interesantes objetos de estudio a la hora de pensar en soluciones para diferentes enfermedades aún no tan entendidas. Nosotros en particular creemos que es interesante elucidar la vía de síntesis de los sARNs en *T. cruzi* debido a las peculiaridades de este organismo no solo por lo que respecta a los sARNs y las proteínas Argonautas, sino también a los mecanismos que presenta en la regulación de su expresión génica, siendo un buen modelo que nos permitirá luego entender mecanismos complejos como lo son las células de mamíferos, en particular de los humanos.

Específicamente el rol de estos sARNs en *T. cruzi* es de gran interés ya que los sARNs derivados de ARNt estarían formando parte de una nueva subfamilia de sARNs, revelando un nuevo aspecto en la biología de los sARNs.

Perspectivas:

A corto plazo sería interesante repetir el secuenciado masivo ya que esos resultados nos permitirían especular con mayor certeza sobre la presencia y la funcionalidad de los sARNs en *T. cruzi*.

A su vez la identificación de las proteínas que co-inmunoprecipitaron con TcPIWi-tryp nos permitirían ahondar en el entendimiento de la funcionalidad y de la vía de síntesis de los sARNs identificados y del rol de la proteína Argonauta de *T. cruzi*.

6- REFERENCIAS

1. Li, Y. and H. Zhou, *tRNAs as regulators in gene expression*. Sci China C Life Sci, 2009. 52(3): p. 245-52.
2. Ghildiyal, M. and P.D. Zamore, *Small silencing RNAs: an expanding universe*. Nat Rev Genet, 2009. 10(2): p. 94-108.
3. Carninci, P. and Y. Hayashizaki, *Noncoding RNA transcription beyond annotated genes*. Curr Opin Genet Dev, 2007. 17(2): p. 139-44.
4. Choudhuri, S., *Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology*. J Biochem Mol Toxicol. 24(3): p. 195-216.
5. Stefani, G. and F.J. Slack, *Small non-coding RNAs in animal development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(3): p. 219-30.
6. Girard, A. and G.J. Hannon, *Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control*. Trends Cell Biol, 2008. 18(3): p. 136-48.
7. Ding, S.W. and O. Voinnet, *Antiviral immunity directed by small RNAs*. Cell, 2007. 130(3): p. 413-26.
8. Matzke, M.A. and J.A. Birchler, *RNAi-mediated pathways in the nucleus*. Nat Rev Genet, 2005. 6(1): p. 24-35.
9. Siomi, H. and M.C. Siomi, *On the road to reading the RNA-interference code*. Nature, 2009. 457(7228): p. 396-404.
10. Liu, X., K. Fortin, and Z. Mourelatos, *MicroRNAs: biogenesis and molecular functions*. Brain Pathol, 2008. 18(1): p. 113-21.
11. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. 10(2): p. 126-39.
12. Kawamata, T. and Y. Tomari, *Making RISC*. Trends Biochem Sci. 35(7): p. 368-76.
13. Leung, A.K., J.M. Calabrese, and P.A. Sharp, *Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(48): p. 18125-30.
14. Pillai, R.S., *MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?* Rna, 2005. 11(12): p. 1753-61.
15. Chen, X., *Small RNAs - secrets and surprises of the genome*. Plant J. 61(6): p. 941-58.
16. Siomi, M.C., et al., *PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence*. Nat Rev Mol Cell Biol. 12(4): p. 246-58.
17. Cerutti, H. and J.A. Casas-Mollano, *On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man*. Curr Genet, 2006. 50(2): p. 81-99.
18. Hock, J. and G. Meister, *The Argonaute protein family*. Genome Biol, 2008. 9(2): p. 210.
19. Hutvagner, G. and M.J. Simard, *Argonaute proteins: key players in RNA silencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(1): p. 22-32.
20. Faehnle, C.R. and L. Joshua-Tor, *Argonautes confront new small RNAs*. Curr Opin Chem Biol, 2007. 11(5): p. 569-77.
21. Garcia Silva, M.R., et al., *Cloning, characterization and subcellular localization of a Trypanosoma cruzi argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids*. Gene. 466(1-2): p. 26-35.
22. Tolia, N.H. and L. Joshua-Tor, *Slicer and the argonautes*. Nat Chem Biol, 2007. 3(1): p. 36-43.

23. Teixeira, S.M., *Control of gene expression in Trypanosomatidae*. Braz J Med Biol Res, 1998. 31(12): p. 1503-16.
24. De Souza, W., *From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality*. Kinetoplastid Biol Dis, 2002. 1(1): p. 3.
25. Tyler, K.M. and D.M. Engman, *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited*. Int J Parasitol, 2001. 31(5-6): p. 472-81.
26. Andrade, L.O. and N.W. Andrews, *The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention*. Nat Rev Microbiol, 2005. 3(10): p. 819-23.
27. Phizicky, E.M. and A.K. Hopper, *tRNA biology charges to the front*. Genes Dev. 24(17): p. 1832-60.
28. Garcia-Silva, M.R., et al., *A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in Trypanosoma cruzi and recruited to specific cytoplasmic granules*. Mol Biochem Parasitol. 171(2): p. 64-73.
29. Jochl, C., et al., *Small ncRNA transcriptome analysis from Aspergillus fumigatus suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(8): p. 2677-89.
30. Kawaji, H., et al., *Hidden layers of human small RNAs*. BMC Genomics, 2008. 9: p. 157.
31. Lee, S.R. and K. Collins, *Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in Tetrahymena thermophila*. J Biol Chem, 2005. 280(52): p. 42744-9.
32. Li, Y., et al., *Stress-induced tRNA-derived RNAs: a novel class of small RNAs in the primitive eukaryote Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(19): p. 6048-55.
33. Thompson, D.M., et al., *tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes*. RNA, 2008. 14(10): p. 2095-103.
34. Thompson, D.M. and R. Parker, *Stressing out over tRNA cleavage*. Cell, 2009. 138(2): p. 215-9.
35. Emara, M.M., et al., *Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly*. J Biol Chem. 285(14): p. 10959-68.
36. Cole, C., et al., *Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs*. RNA, 2009. 15(12): p. 2147-60.
37. Lee, Y.S., et al., *A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)*. Genes Dev, 2009. 23(22): p. 2639-49.
38. Pfeffer, S., M. Lagos-Quintana, and T. Tuschl, *Cloning of small RNA molecules*. Curr Protoc Mol Biol, 2005. Chapter 26: p. Unit 26 4.
39. Elbarbary, R.A., et al., *Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase Z(L) through 5'-half-tRNA*. PLoS One, 2009. 4(6): p. e5908.
40. Haussecker, D., et al., *Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing*. RNA. 16(4): p. 673-95.
41. Couvillion, M.T., R. Sachidanandam, and K. Collins, *A growth-essential Tetrahymena Piwi protein carries tRNA fragment cargo*. Genes Dev. 24(24): p. 2742-7.
42. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics. 73(10): p. 1907-20.

43. Brennecke, J., et al., *Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila*. *Cell*, 2007. 128(6): p. 1089-103.

7- Anexo

PBS 10X

ClK	27mM
KH ₂ PO ₄	14.6mM
Na ₂ HPO ₄	40mM
ClNa	1.37M

TBE 5X 1L

Tris-base	54gr.
Ac. Bórico	27,5gr.
EDTA 0,5M pH 8	20ml

Buffer de corrida 5X

Tris	125 mM
Glicina	1.25M
SDS	0.5%

Buffer de transferencia 10X

Tris	250 mM
Glicina	1.92M

Para preparar buffer 1X se le
agrega:

EtOH	10%
SDS	0,03%

LIT (1 litro) (triptosa de infusión de hígado)

Disolver 5 gr de infusión de hígado, 5 gr de triptosa, 68 ml de 1M NaCl, 5.3 ml 1M KCl, 22 ml de 1M HPO₄Na₂, 10 ml 20% glucosa, FILTRAR y agregar 1 ml hemina (1gr en 50 ml 0.2M NaOH), 10% SFB (10% final), 100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina.

Buffer de lisis: para 15ml

Tris 1M	375µl
NP40	150µl
NaCl 5M	450µl
PmsF 100mM	150µl
Glicerol	2ml
Inhibidor de proteasas	1X

Buffer de Dilución

PBS 1X
BSA 1mg/ml

Rojo Ponceau

Ponceau	0,1%
Ácido Acético	5%

Extracción de ARN con TRIzol: a la porción resuspendida con glicina se le agregó 1ml de TRIzol durante 10 min, luego se agregó 200µl cloroformo y se le da un vortex durante 20 seg. Luego de dejar que se separen las fases unos 5 min se centrifugó 15 min a máxima velocidad a 4°C. Se extrajo la fase acuosa y se guardó la parte orgánica para realizar la extracción proteica. La fase acuosa se mezcló con 500µl de etanol y se deja a temperatura ambiente durante aprox. 30min, luego se pone a precipitar el ARN toda la noche a -80°C para al otro día centrifugar 15 min a máxima velocidad a 4°C.

Extracción de proteínas con TRIzol: a la fracción orgánica obtenida anteriormente se agregó 300µl de Etanol 100% durante 3 min y luego se le agregó 1,5ml de isopropanol durante 10 min habiendo previamente hecho un vortex de 20 seg. Después de los 10 min se centrifugó durante 10 min a 10.000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2ml de hidrocloreuro de guanidino 0,3M dejándolo a temperatura ambiente durante 20 min. Luego se centrifugó a 7500g durante 5 min a 4°C y nuevamente se descarta el sobrenadante dejando secar el pellet lo máximo posible evitando que queden restos de guanidinio. Asimismo se hace un lavado con 2ml de etanol absoluto durante 20 min, se centrifuga a 10.000g durante 5 min a 4°C y se deja secar bien el pellet. Por último se disuelve el pellet en 20µl de SDS 1%.