

Indice

Indice.....	1
Abreviaturas.....	4
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 La enfermedad de Chagas.....	8
1.2 Características generales de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.3 Biología molecular del parásito.....	11
1.4 Regulación de la expresión génica en tripanosomátidos.....	13
1.5 Proteínas de unión al ARN en <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.6 Antecedentes.....	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo general.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Medios de Cultivo.....	26
3.2 Tampones.....	26
3.3 Parásitos.....	27
3.4 Cepas Bacterianas.....	27
3.5 Marcadores de Peso Molecular para ADN.....	27
3.6 Cultivos de bacterias.....	27
3.7 Transformación de células competentes.....	28
3.8 Cebadores.....	28
3.9 Manipulación de ácidos nucleicos.....	28

3.9.1 Obtención de ARN total de <i>T.cruzi</i>	28
3.9.2 Aislamiento de ADN plasmídico	29
3.9.3 Cuantificación de ácidos nucleicos	29
3.10 PCR	29
3.11 Reacción de Transcripción Reversa	30
3.12 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	30
3.13 Clonado en vector pGEM [®] -T Easy	30
3.14 Digestión del ADN con enzimas de restricción	31
3.15 Secuenciación	31
3.16 Análisis computacional	31
3.17 Vectores de expresión	32
3.18 Manipulación de proteínas	32
3.18.1 Obtención de la proteína recombinante a partir de bacterias transformadas	32
3.18.2 Obtención de proteínas totales de <i>T. cruzi</i>	33
3.18.3 Cuantificación de proteínas	34
3.19 Marcado de sonda ARN por transcripción <i>in vitro</i>	34
3.20 Marcado de sondas oligorribonucleótidos	34
3.21 EMSA (análisis de retardo en gel)	35
3.22 Ensayos de <i>Crosslinking</i>	35
3.23 Super-retardo	36
4 RESULTADOS Y DISCUSION	37
4.1 Selección de los ARNs blanco	40
4.2 RT-PCR	40
4.3 Clonado	43

4.3.1 Selección del vector	43
4.3.2 Verificación de los clones bacterianos recombinantes	44
4.4 Secuenciación.....	45
4.5 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias	46
4.5.1 Definición de las 3'UTR	46
4.5.2 Búsqueda de posibles motivos conservados y estructuras	47
4.6 EMSA con sondas ricas en U	49
4.7 Obtención de la sonda por transcripción <i>in vitro</i>	52
4.7.1 Transcripción <i>in vitro</i>	54
4.7.2 Marcado radiactivo	55
4.8 EMSA con sondas obtenidas por transcripción <i>in vitro</i>	55
4.9 Conclusiones	58
5 PERSPECTIVAS	60
6 BIBLIOGRAFIA	62

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AEBSF	Fluoruro 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
cm	Centímetros
col	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
dATP	Deoxi Adenosina trifosfato
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EMSA	Ensayo en gel de retardo
E64	L-trans-epoxi succinyl amido(4-guanidino)butano
g	Gramo
L	Litro
GST	Glutación S transferasa
IPTG	Isopropil- β -tiogalactopiranosido
Kb	Kilo pares de bases
Kcal/mol	Kilo calorías por mol
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
LIT	Medio de cultivo de Tripanosomas de infusión hepática y triptosa

M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mL	Mililitros
μ Ci	Microcurio
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
ORF	Fase abierta de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBP	Proteína de unión al ARN
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN
RT	Transcripción reversa
seg	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Tampón Tris-acetato
TBE	Tampón Tris-borato
temp.	Temperatura
TLCK	N-alfa-tosil-L-lisina clorometilcetona
Tm	Temperatura de fusión

Tris	Trihidroximetil aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
UTR	Región transcrita no traducida
V	Voltios
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -galactósido
°C	Grado Celsius

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Chagas

La parasitosis causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, conocida como la enfermedad de Chagas, es transmitida por diversas especies de insectos de la familia *Reduviidae* (Chagas, 1909). Actualmente se estima que están infectadas por esta enfermedad entre 15 y 17 millones de personas en América cada año, de las cuales mueren unas 50.000 ((CDC), 2006), por lo que representa un importante problema sanitario para la población americana.

La infección puede clasificarse en tres etapas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda comprende entre los 2 y los 6 primeros meses de la infección. Presenta cuadros sintomáticos poco específicos y de intensidad variable. Se caracteriza por alta parasitemia e invasión tisular multiparenquimatosa. Usualmente se desarrolla una reacción inflamatoria localizada en el sitio de infección, denominada “chagoma”, de dónde pueden aspirarse parásitos. Esta fase presenta sintomatología evidente principalmente en niños menores de 10 años mientras que en los adultos generalmente no se presentan síntomas o son muy leves. Los síntomas incluyen fiebres altas, agrandamiento de hígado y páncreas, dolores musculares y miocarditis aguda. Casi en el 10% de los casos, la infección aguda puede ser letal en unas pocas semanas o meses, de lo contrario, los síntomas desaparecen y los parásitos quedan latentes dentro de las células musculares. Luego de la fase aguda la enfermedad evoluciona hacia la fase indeterminada que puede durar entre 10 a 30 años. En esta etapa de la enfermedad no hay parásitos en sangre pero sí anticuerpos contra *T. cruzi*. Entre un 10-30% de los infectados progresan a la fase crónica y el resto de los infectados permanecen en la etapa indeterminada de la enfermedad. En la fase crónica hay muy pocos parásitos en sangre y se caracteriza por efectos adversos que afectan principalmente el corazón y el tubo digestivo. La afección cardíaca es la más importante y frecuente en esta fase. El corazón aumenta hasta 3 veces su tamaño normal. Los electrocardiogramas muestran anomalías típicas tales como arritmias que pueden usarse como diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Las arritmias ventriculares pueden llevar al enfermo a una muerte súbita. Las paredes del corazón pueden volverse muy finas lo cual puede desembocar en una aneurisma. En algunos pacientes ocurre una dilatación del esófago o del colon resultando en una megaenfermedad con efectos severos en la digestión (Talice, 2009).

1.2 Características generales de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi pertenece a la clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género trypanosoma. Es un organismo flagelado que se reproduce asexualmente por fisión binaria y posee los componentes celulares típicos de una célula eucariota: núcleo, microtúbulos (citoesqueleto y flagelo), retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria (**Figura 1**).

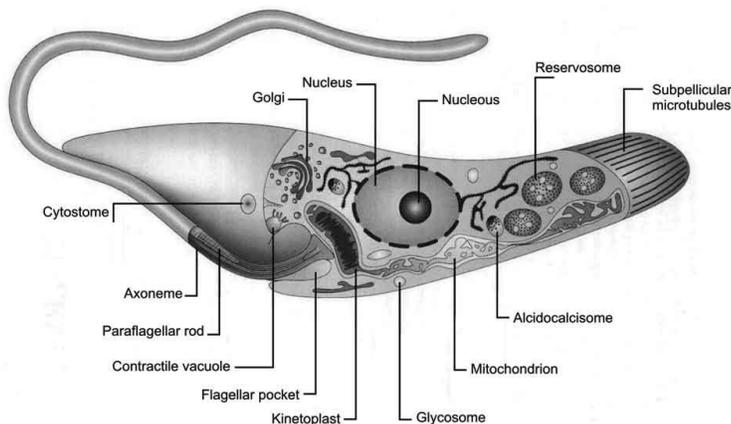


Figura 1: Estructura de *T. cruzi*.

Diagrama que muestra las estructuras y organelos principales de *T. cruzi* en el estadio epimastigota.

Extraído de (Souza, 2008).

Poseen una única gran mitocondria que se extiende a lo largo del cuerpo celular del parásito. La matriz mitocondrial posee una región especializada formada por un entramado de fibras de ADN que se denomina kinetoplasto, éste contiene hasta el 25% del ADN celular total. La microscopía electrónica ha mostrado que el kinetoplasto está formado por una red de dos tipos de ADN circular que se encuentran concatenados entre sí: los maxicírculos y los minicírculos (Chen et al., 1995). Los maxicírculos contienen los genes que codifican para un pequeño número de proteínas tales como las subunidades de la citocromo oxidasa y NADH deshidrogenasa entre otras y para los ARN ribosomales (Simpson, 1987). Los minicírculos contienen las secuencias que codifican para los ARN guías que intervienen en un proceso de modificación de algunos ARNm denominado *editing* (Shaw et al., 1988; Sturm and Simpson, 1990).

La membrana plasmática está asociada a una capa de microtúbulos subpelliculares que a su vez están asociados entre sí por cortos filamentos, lo que le da una gran rigidez a la célula. El flagelo emerge de una invaginación denominada bolsillo flagelar y su tamaño varía según el estadio de desarrollo. En tripanosomátidos los peroxisomas son denominados glicosomas debido a que en estos organelos se

llevan a cabo las vías glicolíticas entre otros procesos. Éstos son esféricos, con una matriz homogénea y están rodeados por una membrana. Poseen además un organelo denominado acidocalcisoma que está involucrado en varias funciones como almacenaje de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro y compuestos fosforados, homeostasis del pH y la osmoregulación participando asociado a una vacuola contráctil (Souza, 2008).

T. cruzi posee un ciclo de vida muy complejo, que transcurre entre dos huéspedes: uno invertebrado, el insecto triatomino o vinchuca, y otro vertebrado, el huésped mamífero. Presenta, a lo largo del mismo, al menos cuatro estadios principales de desarrollo bien diferenciados.

Los epimastigotas replicativos poseen un flagelo anclado cerca del centro del parásito. El kinetoplasto se ubica anterior al núcleo y tiene forma de disco. Miden de 20 a 40 micrones de largo (De Souza, 2002). Los tripomastigotas metacíclicos y tripomastigotas sanguíneos son no replicativos e infectivos. Poseen el núcleo en la parte posterior del cuerpo y un flagelo libre anclado a su membrana. El kinetoplasto tiene una ubicación posterior al núcleo y forma de canasto abierto (Tyler et al., 2002). Miden 25 micrones de largo y 2 de diámetro (De Souza, 2002). Los amastigotas replicativos son intracelulares y poseen una forma oval. No tienen un flagelo protuberante. Miden desde 1,5 a 5 micrones de largo. Estudios realizados con amastigotas obtenidos de diferentes fuentes han mostrado que también son infectivos para las células de vertebrados (de Carvalho and de Souza, 1986).

El ciclo comienza cuando el insecto ingiere tripomastigotas sanguíneos que se encuentran en la sangre del huésped vertebrado infectado (**Figura 2**). En la luz del intestino del mismo, los parásitos, se diferencian a la forma epimastigota, que rápidamente se divide por fisión binaria. Luego, en la ampolla rectal del insecto los epimastigotas pasan al estadio tripomastigota metacíclico, los cuales son eliminados por la materia fecal y son capaces de infectar otros huéspedes vertebrados. Estos últimos penetran a través de una herida o mucosas y son ingeridos por macrófagos, ya dentro de las células se diferencian en amastigotas replicativos. Luego, los amastigotas se diferencian en la forma tripomastigota sanguínea que es capaz de lisis la célula liberándose así al torrente sanguíneo, pudiendo infectar otras células o cerrar el ciclo al ser ingeridas por un insecto vector (De Souza, 2002).

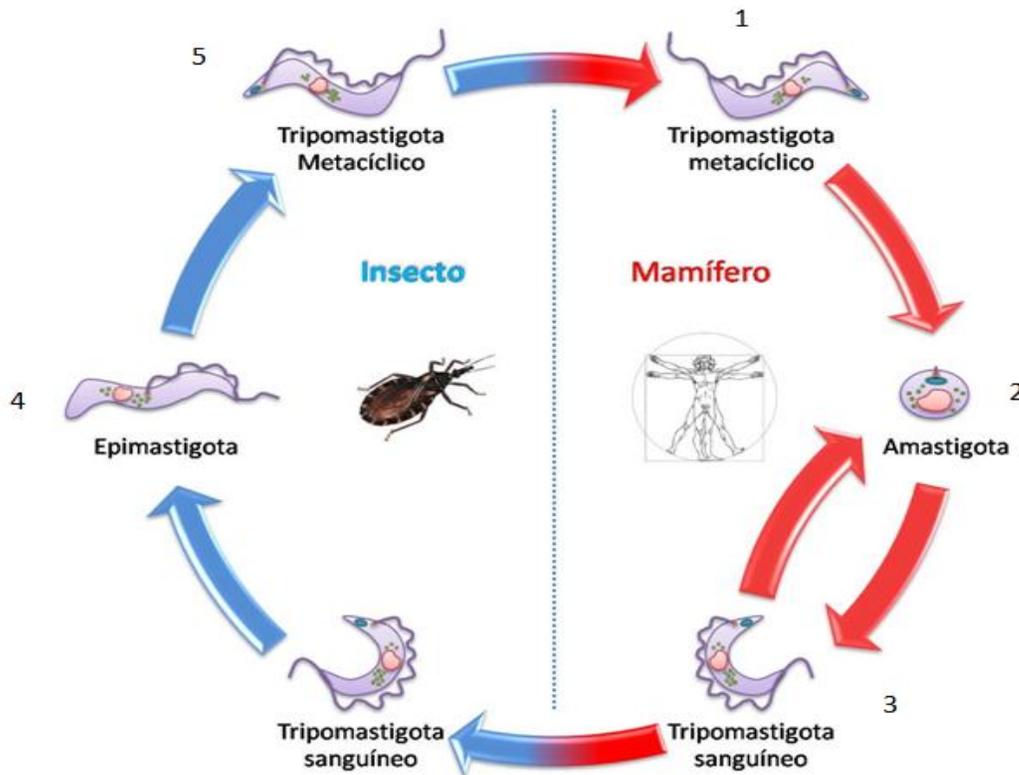


Figura 2: Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Los parásitos entran al torrente sanguíneo luego de la contaminación de la herida causada por la picadura del insecto con heces conteniendo tripomastigotas metacíclicas (1). Éstos pueden invadir un gran número de células incluyendo macrófagos, células del músculo cardíaco y del tejido nervioso, donde se transforman en amastigotas que se replican por fisión binaria (2). Los amastigotas se diferencian en tripomastigotas sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo luego de la lisis de la célula huésped (3). Los tripomastigotas circulantes son capaces de invadir una amplia variedad de células diseminando la infección por todo el cuerpo o pueden ser ingeridos nuevamente por un insecto para así comenzar un nuevo ciclo. Dentro del tracto digestivo medio del insecto, los parásitos se diferencian en epimastigotas (4), los cuales se multiplican y migran a la luz del intestino posterior del insecto y se transforman nuevamente en tripomastigotas metacíclicas en la ampolla rectal (5).

1.3 Biología molecular del parásito

Los flagelados aparecieron en la tierra hace aproximadamente 1.5 billones de años (Woese et al., 1990). Es posible que esta distancia filogenética explique el hecho de que los tripanosomátidos presentan características biológicas excepcionales que los diferencian del resto de los eucariotas

superiores.

Los transcritos mitocondriales pueden ser modificados hasta en un 50% por la adición de uridinas en un proceso conocido como *editing* (Shaw et al., 1988; Sturm and Simpson, 1990). Esto constituye una característica sorprendente de estos parásitos que parece violar uno de los postulados fundamentales del “dogma central” de la biología molecular ya que resulta en cambios de la secuencia codificante del ARNm no dirigidos por el ADN molde sino por ARN guías codificados por los minicírculos.

Por otro lado, poseen una forma de expresión génica muy particular que involucra la transcripción de ARNs policistrónicos primarios que son procesados en mensajeros individuales por un mecanismo intermolecular denominado *trans-splicing*, que adiciona un miniexón de 39 nucleótidos en el extremo 5', y por la poliadenilación en el extremo 3' (**Figura 3**) (De Lange et al., 1984). Al parecer, la adición del miniexón y la poliadenilación del gen adyacente estarían acoplados en un mismo proceso (LeBowitz et al., 1993). La poliadenilación en *T. cruzi* es similar al resto de los eucariotas superiores. Participa una endonucleasa de restricción específica que corta el pre-mensajero en su extremo 3' y la enzima poliA polimerasa que incorpora adenosinas a expensas de ATP. Se han identificado y purificado proteínas de unión a poliA (homólogas a PABP1) en *T. cruzi* (Batista et al., 1994) y *T. brucei* (Pitula et al., 1998). Mediante estudios en *T. brucei* se identificaron dos proteínas de unión al ARN con motivos del tipo RRM (*RNA recognition motif*) de unión a trectos de polipirimidinas, PTB1 y PTB2, que serían esenciales en el proceso de *trans-splicing* en genes con trectos de polipirimidinas ricos en C (Stern et al., 2009).

En el proceso de *trans-splicing*, el miniexón se agrega unos nucleótidos antes del inicio del marco abierto de lectura en un dinucleótido AG que se encuentra corriente abajo a un tracto de polipirimidinas (Pays et al., 1994) (Benz et al., 2005). Su secuencia proviene del extremo 5' de un ARN nuclear pequeño, el ARN SL, que está compuesto por 120 nucleótidos (Agabian, 1990). La adición de esta secuencia ocurre cotranscripcionalmente (Ullu et al., 1993) y es fundamental para la correcta traducción de los mensajeros (LeBowitz et al., 1993). Previamente al *trans-splicing* el miniexón adquiere en su extremo 5' una estructura CAP que se denomina CAP 4 y que consiste en una 7-metilguanosa y los cuatro primeros nucleótidos modificados por adición de grupos 2'O-metilo (Bangs et al., 1992).

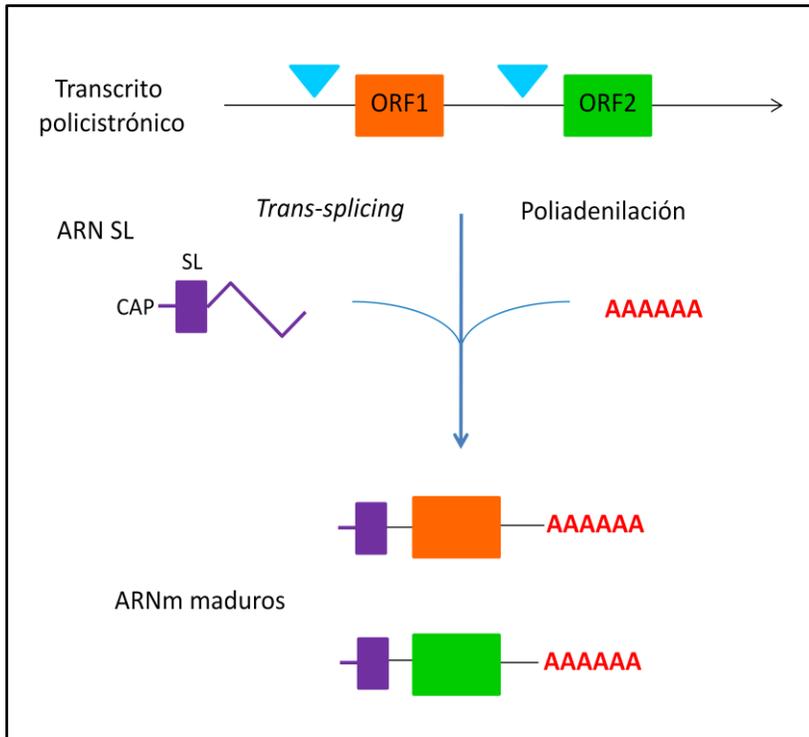


Figura 3: Maduración de los ARNm.

Esquema de la maduración de los transcritos policistrónicos para generar los mensajeros maduros mediante el proceso de poliadenilación y *trans-splicing*. El SL o miniexón es empalmado en sitios consenso (triángulos) localizados en los ARNs policistrónicos para generar el extremo 5' de cada ARNm. El extremo 3' de cada ARNm es poliadenilado en un paso que está asociado con el *trans-splicing* para el siguiente gen corriente abajo. ORF 1 (naranja) y ORF 2 (verde) indican los marcos abiertos de lectura a partir de los cuáles el ARN policistrónico generará dos ARNm maduros distintos.

1.4 Regulación de la expresión génica en tripanosomátidos

El proceso transcripcional en tripanosomátidos se distingue del resto de los eucariotas. De hecho, en cuanto a promotores para la ARN polimerasa II (que es la responsable de la transcripción de los ARN pequeños nucleolares, del gen *ARN SL* y de los genes que van a dar lugar a proteínas) hasta la fecha, el único promotor identificado como tal, en tripanosomátidos, es el promotor del gen *ARN SL* (Gilinger and Bellofatto, 2001). Sin embargo, estudios funcionales recientes han demostrado que hay más factores generales de la transcripción de lo que se estimaba originalmente (Martinez-Calvillo et al., 2010). Por otro lado, la identificación de variantes de histonas y modificaciones de éstas en el origen de un policistrón revelan que la estructura de la cromatina jugaría un rol importante en el inicio de la transcripción en tripanosomátidos al igual que en el resto de los organismos (Martinez-Calvillo et al., 2010). Las ARN polimerasas de los tripanosomátidos tampoco parecen ajustarse a los paradigmas descritos para la mayoría de los eucariotas. Se sabe que la subunidad grande de la ARN polimerasa II carece de los repetidos de heptapéptidos del dominio C terminal (Smith et al., 1989) (Evers et al., 1989). El rol de dicho dominio ha sido estudiado exhaustivamente en varias especies eucariotas (Corden, 1990) (Young, 1991). Estudios en *T. brucei* constataron que el dominio carboxi-terminal no

canónico de la ARN polimerasa II es esencial para la síntesis productiva de ARN (Das and Bellofatto, 2009).

El ciclo de vida de *T. cruzi* alterna entre dos huéspedes bien diferentes y a su vez el mismo involucra estadios del parásito bien diferenciados, tanto morfológica como bioquímicamente, por lo que deben existir mecanismos que le permitan al parásito adaptarse rápida y eficientemente a los diferentes ambientes para asegurar su supervivencia.

A pesar de que se transcriben juntos, los genes individuales que pertenecen a la misma unidad de transcripción policistrónica tienen diferentes patrones de expresión estadio específicos (Vanhamme and Pays, 1995). Esta observación y el hecho de que no se han identificado promotores para la ARN polimerasa II en regiones reguladoras de genes que codifican para proteínas han llevado a la hipótesis de que la regulación de la expresión génica en tripanosomas opera, a diferencia del paradigma de los eucariotas superiores, básicamente a nivel postranscripcional (Clayton, 2002).

La regulación a nivel del procesamiento, estabilidad y traducibilidad de los ARNm parece jugar un papel fundamental en el control de la expresión génica diferencial en estos parásitos (Haile and Papadopoulou, 2007). Por estas razones los tripanosomátidos resultan organismos muy útiles e interesantes a la hora de estudiar los mecanismos de regulación de la expresión génica que operan en niveles postranscripcionales.

Los eventos de **procesamiento** que generan los ARNm maduros a partir de los transcritos primarios representan puntos estratégicos en los que la expresión génica puede ser controlada y estos procesos parecen estar íntimamente asociados a los mecanismos que hacen posible la expresión diferencial. Se sabe que la maquinaria responsable de la maduración se une a sitios ubicados en las regiones intergénicas de los transcritos primarios, procesando estas regiones en tanto son sintetizadas (LeBowitz et al., 1993).

Otro punto importante en la regulación de la expresión génica involucra la modulación de la **estabilidad** de los ARN mensajeros. Se han identificado múltiples elementos de regulación en *cis* presentes en los ARNm denominados USERs (*untranslated sequence elements for regulation*) (Keene, 2007) que son capaces de regular la vida media de los ARNm maduros así como también su

traducibilidad. Estos elementos pueden actuar a nivel de secuencia o de estructura secundaria y están localizados principalmente en las regiones 3' transcritas no traducidas de los mensajeros, aunque también pueden estar en las regiones 5'UTR e incluso dentro de las secuencias codificantes (LeBowitz et al., 1993) (Norton, 1994). A nivel de secuencia, se han caracterizado en las 3' UTR de *T. cruzi* y *T. brucei* secuencias ricas en AU que le confieren desestabilización selectiva a los ARNm (D'Orso et al., 2003). Por otro lado, el *loop* de 16 bases localizado en la región 3'UTR de los ARNm procíclicos de *T. brucei* que confiere estabilidad a los ARNm y mejora la eficiencia de la traducción constituye un ejemplo de elemento regulatorio a nivel de estructura. De esta forma los transcritos son degradados selectivamente o su vida media es estabilizada en los diferentes estadios del parásito (Furger et al., 1997). Por lo tanto, las regiones no traducidas que flanquean los genes constituirían sitios claves en la modulación de la abundancia de los ARN mensajeros ya que estarían involucradas en el mecanismo que determinan el procesamiento y la estabilidad de los mensajeros (Nozaki and Cross, 1995) (Norton, 1994) (Aly et al., 1994) (Haile and Papadopoulou, 2007) (Clayton and Shapira, 2007).

Mediante estudios de microarreglos de todo el genoma en los cuatro estadios del parásito, se observó que la **abundancia** de los transcritos de más del 50% de los genes de *T. cruzi* es significativamente regulada durante el ciclo de vida del parásito (Minning et al., 2009). Esto soporta la idea de que la abundancia de los transcritos es un punto importante de la regulación de la expresión génica en este organismo, contrariamente a lo constatado en previos estudios de genómica en kinetoplastidos (Duncan, 2004).

Existen además **mecanismos traducionales** que controlan los patrones de expresión apropiados de un gran número de genes. Por ejemplo, el producto de los genes *nanos* y *pumilio* en *Drosophila* son componentes claves en la represión de la traducción de ARNm específicos (Parisi and Lin, 2000). En particular en *T. cruzi* se ha demostrado que las 3'UTR afectan la traducibilidad de los mensajeros (Nozaki and Cross, 1995) (Haile and Papadopoulou, 2007). Estudios en la familia de los genes de superficie de las mucinas, demostraron que elementos ricos en AU en las 3'UTR de los mensajeros confieren inestabilidad estadio específica y afectan la eficiencia de la traducción de dichos genes (Di Noia et al., 2000).

En estudios realizados sobre una familia de proteínas de unión a quitinas (Dallagiovanna et al., 2001) y en un gen específico del proceso de metacicloogénesis (Avila et al., 2001) se ha observado que la expresión estadio específica de estas proteínas es regulada por **movilización polisomal** (transporte de los mensajeros a la fracción polisomal, reconocimiento de los mismos por la subunidad ribosomal y el ensamblaje de los ribosomas para formar el complejo polisomal). La regulación de este proceso estaría dada a nivel de la formación del complejo de iniciación de la traducción y del paso subsiguiente de elongación (McCarthy, 1998).

Se ha constatado que existe una coordinación global de la expresión génica en eucariotas a nivel postranscripcional, en donde ARNm que codifican para proteínas funcionalmente relacionadas son regulados coordinadamente formando operones y regulones postranscripcionales (Gerber et al., 2004) (Bolognani et al., ; Keene, 2007). Numerosos abordajes en tripanosomátidos avalan la existencia de este modelo de regulación postranscripcional. Estudios en el transcriptoma de *T. brucei* en distintos estadios de diferenciación constataron la existencia de operones y regulones postranscripcionales en este parásito ya que se determinó que ciertos ARNm que se encuentran funcionalmente relacionados se regulan de forma coordinada (Queiroz et al., 2009).

La regulación coordinada ocurre mediante la interacción de los ARNm con factores en *trans*. Estos factores son principalmente proteínas de unión al ARN, aunque también pueden ser ARNs no codificantes y metabolitos (Keene, 2007).

Estudiando uno de estos factores en *trans* en *T. brucei*, la proteína de unión al ARN PUF9, se determinó que esta proteína forma parte de un regulón postranscripcional involucrado en la replicación de estructuras subcelulares. PUF9 estabiliza a sus blancos y genera la acumulación de los mismos justo después de la replicación del ADN. Dos de los blancos de esta proteína están involucrados en la replicación del kinetoplasto mientras que el otro se encuentra asociado al huso mitótico. A su vez, los blancos de la proteína PUF9 comparten un motivo en sus 3'UTR mediante el cual se establece la interacción y se produce la estabilización del mensajero (Archer et al., 2009).

De esta manera, al interactuar con las señales en *cis* presentes principalmente en las 3' UTR de sus blancos, las proteínas de unión al ARN modulan la expresión génica diferencial. Por esta razón nos resulta crucial el estudio de estas proteínas en estos organismos.

1.5 Proteínas de unión al ARN en *Trypanosoma cruzi*

El ARN rara vez se encuentra desnudo ya que una vez que comienza a transcribirse se asocia a proteínas. La asociación de estas proteínas con el ARN es dinámica y define su tiempo de vida media, localización celular, procesamiento y traducibilidad (Lunde et al., 2007).

La estructura de las proteínas de unión al ARN es modular y a pesar de que cumplen con diversas funciones su estructura se construye con unos pocos dominios de unión al ARN. Estos dominios están compuestos por 70-150 aminoácidos y median el reconocimiento al ARN. Los principales tipos de dominios de proteínas de unión al ARN incluyen tanto motivos grandes de 50-100 aminoácidos tales como el dominio de unión al ARN doble hebra (*dsRBD*); el motivo dedo de Zinc (*Zinc finger*), el motivo Puf (*Pumilio/FBF family*) y el RRM (por *RNA Recognition Motif*), así como motivos más cortos de 10-25 aminoácidos tales como el motivo rico en Argininas (*ARM*), el dominio KH (*K-homology*), y la caja arginina-glicina-glicina (*RGG-box*). Estos dominios se combinan estructuralmente de distintas maneras para crear una superficie de unión muy versátil que define la especificidad de estas proteínas (Lunde et al., 2007).

Se han caracterizado varias proteínas de unión al ARN en *Trypanosoma cruzi*, sin embargo solo se conoce la función y los blancos específicos de muy pocas de ellas (De Gaudenzi et al., 2005). Se han estudiado algunas proteínas con motivo dedo de zinc en *T. cruzi*, como TcZFP1 (Morking et al., 2004), que está involucrada en varios aspectos del control homeostático y de diferenciación, y sus dos proteínas parálogas TcZFP2A y TcZFP2B (Caro et al., 2005). Se han descrito proteínas que participan en el procesamiento del ARNm, por ejemplo, factores de *splicing* como U2AF35, U2AF65 y SF1 (Bercovich et al., 2009), así como las pertenecientes al EJC (*exon junction complex*), que son depositadas en el ARNm durante el segundo paso del *splicing*, tales como Mago e Y14 (Bercovich et al., 2009).

Se han descrito además proteínas con motivo pumilio, como la familia de TcPUF1, las cuales son capaces de unirse a las regiones 3' UTR de ciertos mensajeros controlando su localización, estabilidad

y/o traducibilidad (Caro et al., 2006). En particular, en nuestro grupo de trabajo se caracterizó una de las proteínas de esta familia, denominada TcPUF6 (Dallagiovanna et al., 2005), la cual estaría involucrada en la regulación de la vida media de sus ARNs blanco mediante la asociación diferencial a complejos de degradación a lo largo del ciclo de vida del parásito (Dallagiovanna et al., 2008).

En cuanto a las proteínas con dominio RRM en *T. cruzi*, en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de Facultad de Ciencias, se ha caracterizado a la proteína TcRBP19, una proteína exclusiva de tripanosomátidos (Perez-Diaz et al., 2007). El RRM es uno de los dominios más comunes y mejor caracterizado. Está compuesto por 80 a 90 aminoácidos que forman una estructura del tipo $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (**Figura 4**). La interacción con el ARN se da mediante las láminas β_1 y β_3 . Posee una región con varios residuos conservados, alguno de los cuales se agrupan en dos submotivos más cortos denominados RNP1 (octámero) y RNP2 (hexámero) que se encuentran separados por 30 aminoácidos (Maris et al., 2005) (Clery et al., 2008).

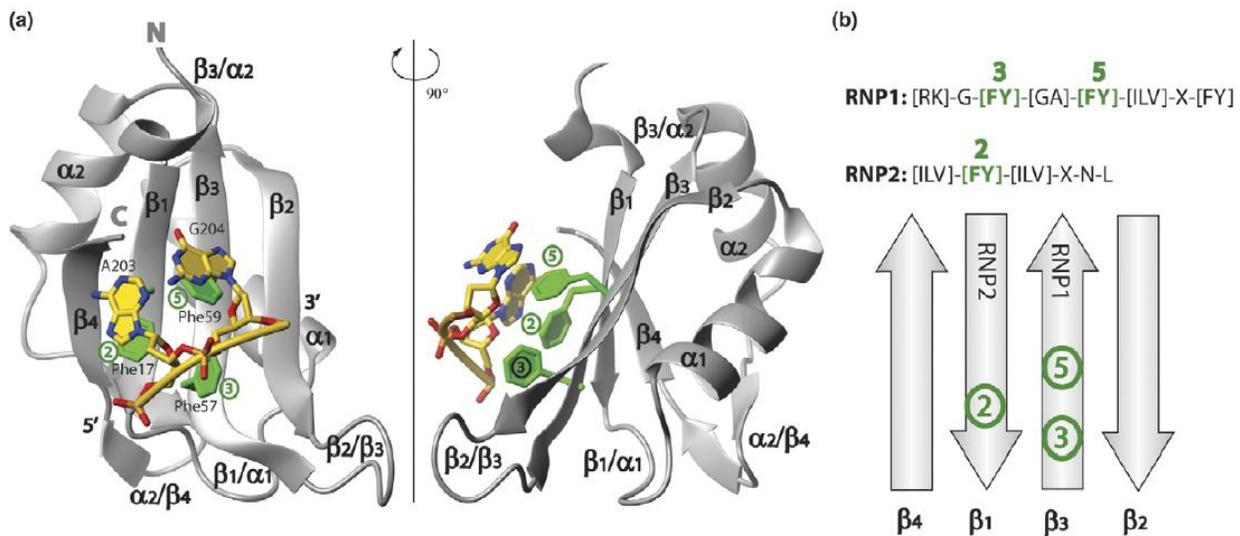


Figura 4: a: Estructura del hnRNP A1 RRM2 en complejo con ADN telomérico simple hebra, como modelo de unión a un ácido nucleico simple hebra. b: Esquema de las cuatro hojas β con los residuos aromáticos conservados en los RNP1 y RNP2 marcados en verde. También se muestra la secuencia consenso del RRM (la X indica cualquier aminoácido). Extraído de (Clery et al., 2008).

Se ha caracterizado también en *T. cruzi* una familia de proteínas con dominios RRM llamada TcRBP, que posee al menos seis miembros (De Gaudenzi et al., 2003) que difieren en su expresión en los distintos estadios del parásito. Se han estudiado los ARNm blancos de dos integrantes de esta familia,

TcUBP1 y TcRBP3, constatándose que las señales en *cis* para estas proteínas se encuentran más frecuentemente en las regiones 3`UTR de sus blancos. En particular se logró la identificación de un motivo consenso a nivel de estructura reconocido por cada una de estas dos proteínas. Por otro lado se determinó que los transcritos que se encuentran relacionados funcionalmente se asocian a una proteína en particular, los blancos de TcUBP1 están enriquecidos en genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo mientras que los blancos de TcRBP3 codifican principalmente para proteínas ribosomales (Noe et al., 2008).

En trabajos de análisis sobre genoma de *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* (TriTryps) se ha encontrado que poseen un gran número de proteínas de unión al ARN (Ivens et al., 2005). Sin embargo, el número de proteínas con RRM es similar al encontrado en levaduras (Ivens et al., 2005), aunque en TriTryps hay más proteínas pequeñas (menores a 200 residuos) con un solo RRM (De Gaudenzi et al., 2005). Por otro lado, estudios de interferencia en *T. brucei* contra varias proteínas con RRM demostraron que muchas de ellas son esenciales en la vida del parásito (Wurst et al., 2009).

Dado que las proteínas de unión al ARN tienen un rol preponderante en la regulación postranscripcional resulta de relevancia el estudio de las mismas como reguladoras de la expresión génica en tripanosomátidos.

1.6 Antecedentes

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se identificó una proteína con un motivo de unión al ARN del tipo RRM (Perez-Diaz et al., 2007). La identificación se realizó a partir de una secuencia parcial obtenida azarosamente por RT-PCR, la cual fue utilizada como sonda para el rastreo de una biblioteca genómica. Esta proteína, denominada TcRBP19, fue secuenciada, expresada y parcialmente caracterizada. TcRBP19 es una proteína de 17 kDa que está muy conservada en otros kinetoplastídeos (*Trypanosoma brucei* y *Leishmania major* entre otros), sin embargo, hasta el momento no se han encontrado ortólogos en otros eucariotas.

En este mismo trabajo, mediante ensayos de *Southern blot* realizado con diferentes endonucleasas y electroforesis en campo pulsado, se identificó un perfil compatible con un gen de copia única localizado en un cromosoma de alto peso molecular.

La proteína de fusión GST-TcRBP19 recombinante fue purificada en *E. coli* y usada para la producción de un anticuerpo policlonal en conejo. Mediante análisis de *Western blot* se pudo determinar que TcRBP19 se expresa, en niveles muy bajos, principalmente en el estadio amastigota. Por otro lado, los ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal contra TcRBP19 demostraron que la misma queda claramente excluida del núcleo. A través de ensayos de EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) se estudió la especificidad de la unión de TcRBP19 por el ARN con los cuatro homopoliribonucleótidos. Estos estudios revelaron que esta proteína no solo se une a ARN *in vitro*, sino que también es capaz de discriminar entre diferentes ribosondas, mostrando preferencia por la unión a poli C en las condiciones ensayadas.

Debido a que TcRBP19 presenta una expresión diferencial durante el ciclo de vida y que la regulación de la expresión génica en *T. cruzi* parece suceder principalmente a nivel postranscripcional, resulta particularmente interesante el estudio de la funcionalidad de la misma. Como primera aproximación para determinar la funcionalidad de esta proteína, dado que el mecanismo de interferencia no funciona en *T. cruzi* (DaRocha et al., 2004) (Ullu et al., 2004) (Elias and Faria, 2009), se sobreexpresó TcRBP19 mediante transfección de parásitos salvajes con el plásmido pTex-TcRBP19 (Kelly et al., 1992) y posterior selección con neomicina. Se observó el fenotipo de los parásitos y se constató que los epimastigotas que sobreexpresan TcRBP19 no manifiestan un fenotipo diferente a los parásitos salvajes transfectados con el plásmido control pTex (Kelly et al., 1992). Por otro lado, se constató que la capacidad de metacicloogénesis se encontraba disminuida en los transfectantes, mientras que la amastigogénesis era normal. Sin embargo, en ensayos de infección de células VERO en cultivo utilizando parásitos sobreexpresando TcRBP19 se observó un menor número de células infectadas en comparación a la infección por parásitos salvajes en la misma línea celular.

Para la identificación de los ARNs blanco, se realizaron ensayos de *GST-pull down* con ARN de amastigotas. Para esto, se realizó el proceso de amastigogénesis *in vitro* (Contreras et al., 1985) (Contreras et al., 2002) a partir de epimastigotas de *T. cruzi*. La proteína GST-TcRBP19 se acopló a una columna de glutatión sefarosa y se analizaron las interacciones con ARN total de amastigotas de *T. cruzi*. Tanto los ARN capturadas por TcRBP19 como los no capturados, libres en el sobrenadante, fueron amplificados y marcados diferencialmente con fluoróforos (Cy3 y Cy5) para luego ser usados como sonda para hibridar microarreglos de ADN con el fin de identificarlos (**Figura 5**).

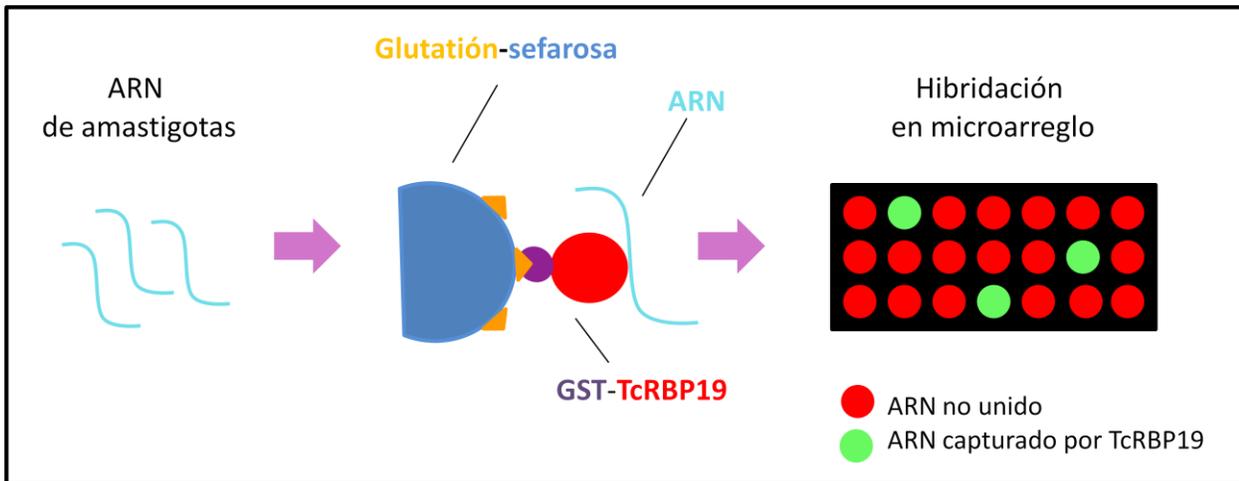


Figura 5: Esquema del ensayo de *pull down* de ARN e hibridación en microarreglo.

En estos experimentos, TcRBP19 capturó los ARNs especificados en la **Tabla 1**. De ahora en adelante voy a referirme a los mensajeros capturados por TcRBP19 según los números mostrados en la primer columna de esta tabla.

Tabla 1: Blancos capturados por TcRBP19 en el ensayo de *GST-pull down*.

N°	ID	Proteína
1	Tc00.1047053504035.84	Proteína hipotética conservada
2	Tc00.1047053506247.74	Proteína hipotética conservada
3	Tc00.1047053506367.50	Proteína hipotética conservada
4	Tc00.1047053506401.360	Proteína hipotética conservada
5	Tc00.1047053506419.69	Proteína hipotética conservada
6	Tc00.1047053506469.139	Proteína con un motivo dedo de Zinc CSL <i>zinc finger</i>
7	Tc00.1047053506661.100	Proteína hipotética conservada
8	Tc00.1047053506825.210	Proteína hipotética conservada
9	Tc00.1047053507801.144	Proteína hipotética conservada
10	Tc00.1047053507981.40	Proteína hipotética
11	Tc00.1047053508737.194	Subunidad del complejo ARP2/3
12	Tc00.1047053509453.30	Proteína GCN5-like, putativa
13	Tc00.1047053510155.30	Proteína hipotética conservada
19	Tc00.1047053507515.60	TcRBP19

En este trabajo pretendemos confirmar la interacción de TcRBP19 con las regiones UTR de algunos ARNm seleccionados de los ensayo de *GST-pull down* mediante ensayos de movilidad electroforética en geles de retardo. Para ello, se propone clonar dichas UTRs en vectores plasmídicos, a partir de los cuales se obtendrá por transcripción *in vitro* y marcado radiactivo, el ARN que será usado como sonda en los EMSA. Mediante análisis *in silico* se buscarán elementos comunes en las regiones 3'UTR de dichos ARNm.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Confirmar y analizar la interacción de TcRBP19 con posibles ARNs blanco.

2.2 Objetivos específicos

- Amplificar, clonar y secuenciar las regiones 3' UTR de algunos de los genes seleccionados en el ensayo de GST-pull down de ARN.
- Analizar la unión *in vitro* de la proteína recombinante, expresada y purificada a partir de *E. coli*, mediante análisis de retardo en gel usando las regiones UTR obtenidas por transcripción *in vitro* marcadas con ³²P.
- Analizar *in silico* todas las 3'UTR de los mensajeros capturados en el GST-pull down de ARN, buscar posibles motivos conservados y estructuras.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Medios de Cultivo

- Medio líquido LB (Luria-Bertani Medium): bacto triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L. Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5N y se autoclava.
- Medio LB agar: medio LB líquido más bacto agar al 1.5%.
- Medio LIT: 4g NaCl, 0,4g KCl, 15g Na₂HPO₄·7H₂O, 2g glucosa, 3g infusión de hígado, 5g triptosa, 2% hemoglobina, 10% suero bovino fetal, 30mg Streptomicina, 50mg Penicilina y agua hasta llegar a un litro.

3.2 Tampones

- Tampón para electroforesis en geles de agarosa TBE 10x: Tris-HCl 89mM pH 8.3, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM.
- Tampón para electroforesis en geles de agarosa TAE 10x: Tris-HCl 0.4M pH 7.2, EDTA 50mM pH 8.0, ácido acético hasta pH 7.2.
- Tampón para electroforesis en geles de acrilamida SDS PAGE.
- Tampón de carga para ADN: Azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25%, glicerol 30%.
- Tampón de carga SDS/Tris 4x para geles de acrilamida: SDS 8%, Tris-Cl 0,25M pH 8,8, Glicerol 40%, β-mercaptoetanol y una punta de espátula de azul de bromofenol.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,14M, KCl 2,6mM, KH₂PO₄ 7mM, Na₂HPO₄ 10mM, pH 7,4.
- Tampón SET: sacarosa 20%, Tris-HCl 50mM pH 7,6, EDTA 6,5mM.
- Tampón de *binding* para EMSA y *crosslinking*: Tris-HCl 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, EDTA 0.1M

3.3 Parásitos

Se utilizaron parásitos de la cepa Dm28 de *T. cruzi* (Contreras et al., 1988). Los epimastigotas fueron cultivados a 28°C en medio líquido de infusión hepática y triptosa (LIT) suplementado con suero fetal bovino al 10% previamente tratado con calor para la inactivación del complemento. Para los transfectantes, se agrega al medio G-418 en una concentración 50µg/mL.

3.4 Cepas Bacterianas

- *E. coli* XL1-Blue (Bullock, 1987). Genotipo: *supE hsdR lac⁻ F' proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*.
- *E. coli* BL21(Grodberg and Dunn, 1988; Studier and Moffatt, 1986) cepa deficiente en proteasas para expresión de proteína recombinante clonada en pGEX4T-1. Genotipo: F-, *ompT, hsdS (rB-, mB), gal*.

3.5 Marcadores de Peso Molecular para ADN

En la **Figura 6** se muestran los tres marcadores de peso molecular utilizados.

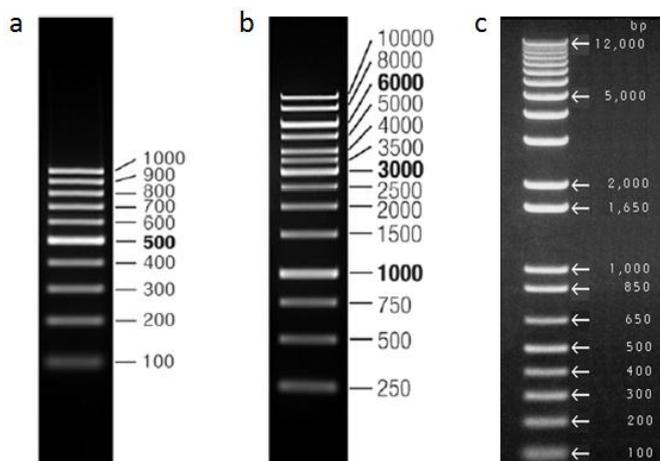


Figura 6: Marcadores de peso molecular.

- a: 100bp DNA ladder (Fermentas)
 b: 1Kb DNA ladder (Fermentas)
 c: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen)

3.6 Cultivos de bacterias

Los cultivos líquidos se hicieron en medio LB a 37°C con agitación. Para el cultivo de células transformadas con plásmidos portadores de resistencia a ampicilina, se agregó al medio dicho antibiótico en una concentración de 100µg/mL. Los cultivos sólidos se hicieron en placas de Petri con LB agar con ampicilina, y según fuera necesario con X-gal e IPTG.

3.7 Transformación de células competentes

Se sacaron 100µL de células competentes guardadas a -80°C y se dejaron descongelar en hielo de 30-60 min. Se agregó ADN en una proporción menor a 25µL de ADN por 100µL de células (se procura usar menos de 0,1µg/100células). Se dejó 20 min. en hielo y se dio un golpe de calor 90 seg. a 42°C . A continuación se colocó en hielo 1-2 min. y se adicionó 4 volúmenes de LB a temp. ambiente. Se dejó a 37°C durante una hora con agitación fuerte y se plaqueó en agar LB.

3.8 Cebadores

Los cebadores para amplificar las 3'UTRs fueron diseñados al final de la secuencia codificante mediante la utilización de paquetes de *software* como el OligoPerfect™ Designer disponible en www.invitrogen.com, así como también el de IDT disponible en www.idtdna.com y el *software* Genamic Expression. Los mismos fueron sintetizados por la empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*). Se usaron oligos complementarios a la cola poliA del ARN mensajero. En la **Tabla 2** se muestran los cebadores utilizados.

Tabla 2: Cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia	Tm	%GC	Longitud
1	GGATTGACTGCGGGATTTTC	53	50	20
4	AAGGCGCAGAATATCGGTTTG	56	48	21
6	GCCTTGTCTCCGTCTAAATGC	53	52	21
11	CACGAGGAAGTAGAAACAATGC	51	45	22
12	AGGACTTGTCGAAACGGTGC	58	57	21
19	TGAGGACTATCGCAGCGCCATAC	62	56	23
OligodT-ancla	CTCTCAAGGATCTTACCGCTTTTTTTTTTTTTTTT	31	42	65

3.9 Manipulación de ácidos nucleicos

3.9.1 Obtención de ARN total de *T.cruzi*

Para la extracción de ARN total de *T.cruzi* se utilizó el kit Rneasy® (QIAGEN) según el protocolo establecido por el comerciante.

Se corrió el ARN previamente calentado a 95°C, en un gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1x y se visualizó por tinción con Bromuro de Etidio.

3.9.2 Aislamiento de ADN plasmídico

Se utilizó el método de lisis alcalina en el cual las células son lisadas en una solución de detergente a pH alcalino lo que provoca la desnaturalización del ADN. Posteriormente, la solución se neutraliza y el ADN plasmídico se renaturaliza por su pequeño tamaño y estructura y permanece en solución, mientras que el ADN genómico precipita junto al detergente y las proteínas.

Se cultivaron células bacterianas conteniendo el plásmido de interés en medio líquido LB hasta la fase estacionaria. Se transfirió cada cultivo a un tubo eppendorf de 1,5mL y se centrifugó por 30 segundos. El *pellet* se resuspendió en 1mL de buffer SET. Se centrifugaron las células 1 min. y el *pellet* se resuspendió en 150µL de buffer SET. A continuación se agregó 5µL de RNasa A (Sigma) (10µg/µL), y se agregó 350µL de la mezcla lítica (SDS 1%, NaOH 0,2 N). Se dejó 5 min. a temperatura ambiente y se agregó 250µL de acetato de sodio 3M pH 4.8 agitando por inversión. Se colocó 30 min. en hielo para ayudar a precipitar el SDS y el ADN cromosómico, se centrifugó 20 min. a 4°C y se guardó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico. Al sobrenadante se le adicionó un volumen de isopropanol, se agitó por inversión, se dejó a temperatura ambiente por 15 min. y se centrifugó 20 min. Se lavó el *pellet* con 200µL de etanol 70%, se volvió a centrifugar por 5 min., se secó el *pellet* y finalmente se resuspendió en 40µL de agua libre de nucleasas.

En los casos en que fue necesaria la obtención de una mayor cantidad de ADN plasmídico se siguió el protocolo descrito por Ausubel para midiprep (Ausubel, 1987).

3.9.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar el estado físico y concentración del ADN y ARN, éstos se corrieron en geles de agarosa 0.7-1.5% en TAE 1x y se midió su densidad óptica a 260nm asumiendo que 1 Unidad de Absorbancia corresponden a 50µg/mL de ADN doble hebra y 40µg/mL de ARN simple hebra.

3.10 PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en distintos volúmenes finales, de 20 a 100µL, conteniendo una mezcla de 0.5µM de los cebadores, 1x tampón STR 10x (Promega) conteniendo 500mM KCl,

100mM Tris-HCl (pH 9), 15mM MgCl₂, 1% Triton[®] X-100 y 2mM de cada dNTP, 0.5 U de enzima *Taq* polimerasa (Fermentas) y distintas cantidades (10 a 50 ng) de ADN como molde. Las condiciones de PCR y el número de ciclos de amplificación fueron variándose hasta obtener el fragmento esperado.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE 1x.

3.11 Reacción de Transcripción Reversa

Para la síntesis de la primera hebra, el ARN molde fue desnaturalizado por calor a 70°C durante 3 minutos. La reacción se llevó a cabo usando el kit RetroScript (AMBION) en un volumen de 20µL según protocolo establecido por el comerciante conteniendo, buffer RT, dNTPs, Rnasin, un inhibidor de la actividad ARNasa, 100 U de la enzima MMLV-RT, 1 a 2µg de ARN total de *T. cruzi* o ARN capturado en el ensayo de *GST-pull down*. Se usó como cebador un OligodT al que se le adicionó un ancla (**Tabla 2**). La transcripción reversa se realizó a 42°C durante una hora.

Para la segunda hebra se ensayaron diferentes condiciones de PCR usando como cebadores al ancla o al oligodT-ancla y cebadores específicos.

3.12 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Se utilizaron geles con un porcentaje de agarosa entre 0,7 y 1,5% según los tamaños de los fragmentos a ser separados. Los geles fueron preparados en tampón TAE 1x. La separación se realizó utilizando un voltaje (8 V/cm) y en un tiempo de 1 a 5 horas. Las muestras fueron cargadas con tampón de carga de concentración final 1x.

El ADN se visualizó mediante tinción con 0,5µg/mL de bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Se usó como marcadores de pares de bases de ADN el marcador 1kb DNA ladder, el 100pb DNA ladder (Fermentas) y 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

3.13 Clonado en vector pGEM[®]-T Easy

Los fragmentos resultantes de los distintos PCRs, fueron purificados por QIAquick[®] Spin (QIAGEN) y Ron's DNA/RNA purification Systems, Gel Extraction Kit (BIORON). Los productos de la purificación fueron clonados según protocolo recomendado por el comerciante en un vector pGEM-T Easy

(Promega, **Figura 7**) con una ligasa T4 provista por el comerciante.

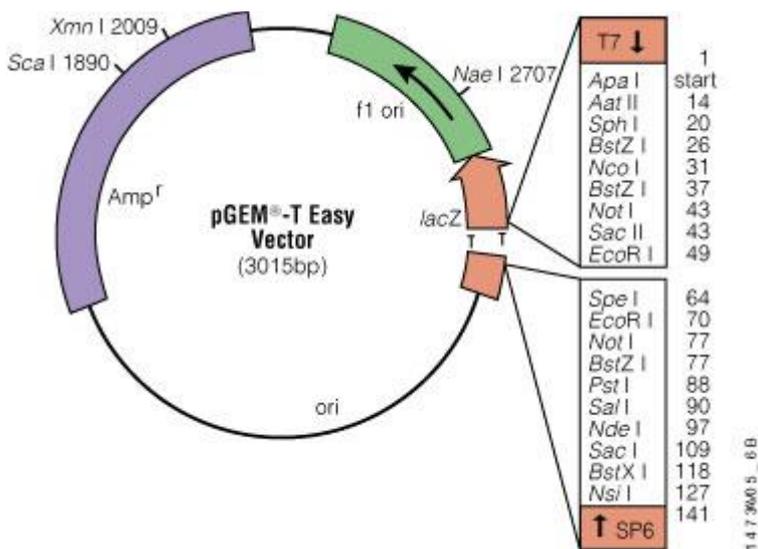


Figura 7: Plásmido pGEM-T Easy (Promega).

Se muestran en el cuadro a la derecha las enzimas de restricción incluidas en el sitio de clonado múltiple.

Amp^r: gen de resistencia a ampicilina.
lacZ: gen que codifica para la β -galactosidasa

Se transformaron bacterias competentes *E. coli* de la cepa *XL1 Blue*, las cuales fueron cultivadas en agar LB suplementado con X-gal e IPTG para identificar los clones que además de haber incorporado el plásmido habían incorporado el inserto.

3.14 Digestión del ADN con enzimas de restricción

La digestión de ADN fue llevada a cabo según protocolos ya establecidos (Sambrook et al., 1989). Las reacciones se hicieron en volúmenes finales de 40 a 300 μ L con 1-10 unidades de enzima por μ g de ADN y se incubó entre una y tres horas a la temperatura recomendada por el comerciante.

3.15 Secuenciación

La secuenciación de ácidos nucleicos fue realizada por secuenciación automática por el servicio *Macrogen DNA sequencing service* (Korea).

3.16 Análisis computacional

Los programas utilizados para análisis *in silico* fueron:

- RNA fold (Gruber et al., 2008).
- BLAST (Altschul et al., 1990).
- MEME (Bailey and Elkan, 1994).

3.17 Vectores de expresión

El vector pGEX-4T-1 (GE Healthcare, **Figura 8**) conteniendo el gen TcRBP19 en fase con la proteína GST fue utilizado para la expresión de la proteína recombinante GST-TcRBP19 ya que se encontraba disponible en el laboratorio.

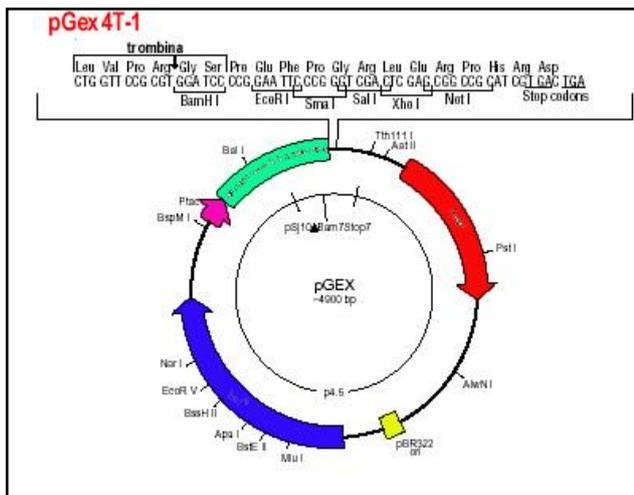


Figura 8: Mapa del vector de expresión pGEX4T-1.

Se muestran los marcos abiertos de lectura y las principales características. Se muestra en rojo el gen de resistencia a ampicilina, en verde el gen de la GST, en fucsia el promotor *taq* inducible por IPTG, en azul el gen *lacI^q*, en amarillo el sitio de origen de replicación del plásmido pBR322. Se muestra el sitio de corte con trombina, el cual permite remover la GST. Extraído y modificado de GE Healthcare.

3.18 Manipulación de proteínas

3.18.1 Obtención de la proteína recombinante a partir de bacterias transformadas

Se creció un cultivo de 400ml de LB ampicilina (100µg/mL) a 37°C con agitación hasta una densidad óptica a 600nm de 0,7. Se indujo con IPTG 0,5mM y se dejó 3 horas a 28°C. El cultivo fue centrifugado a 7000g 15 min a 4°C para sedimentar las células, resuspendido en 20mL de PBS frío suplementado con inhibidores de proteasas (100µL AEBSF 100mM, 3µL DTT 2M, 100µL pepstatina 1mg/mL, 50µL leupeptina 4mg/mL) y sonificado en hielo. Luego de sonificado, se agregó al lisado tritón 20% y se agitó durante 30 min. en hielo para ayudar a la solubilización de la proteína. El lisado fue luego centrifugado 10 min. a 12000g a 4°C y el sobrenadante conteniendo la proteína recombinante soluble fue filtrado en un filtro de 0,45µm.

La proteína de fusión con GST se purificó del lisado bacteriano por cromatografía de afinidad usando glutatión inmovilizado a una matriz de Sefarosa (GE Healthcare) (**Figura 9**). Cuando se aplica al medio, la proteína de fusión se une al ligando y las impurezas son removidas con sucesivos lavados con PBS. Finalmente, se eluye la proteína de fusión compitiendo con glutatión

reducido 50mM, usando condiciones no desnaturalizantes que preservan la integridad de la proteína.

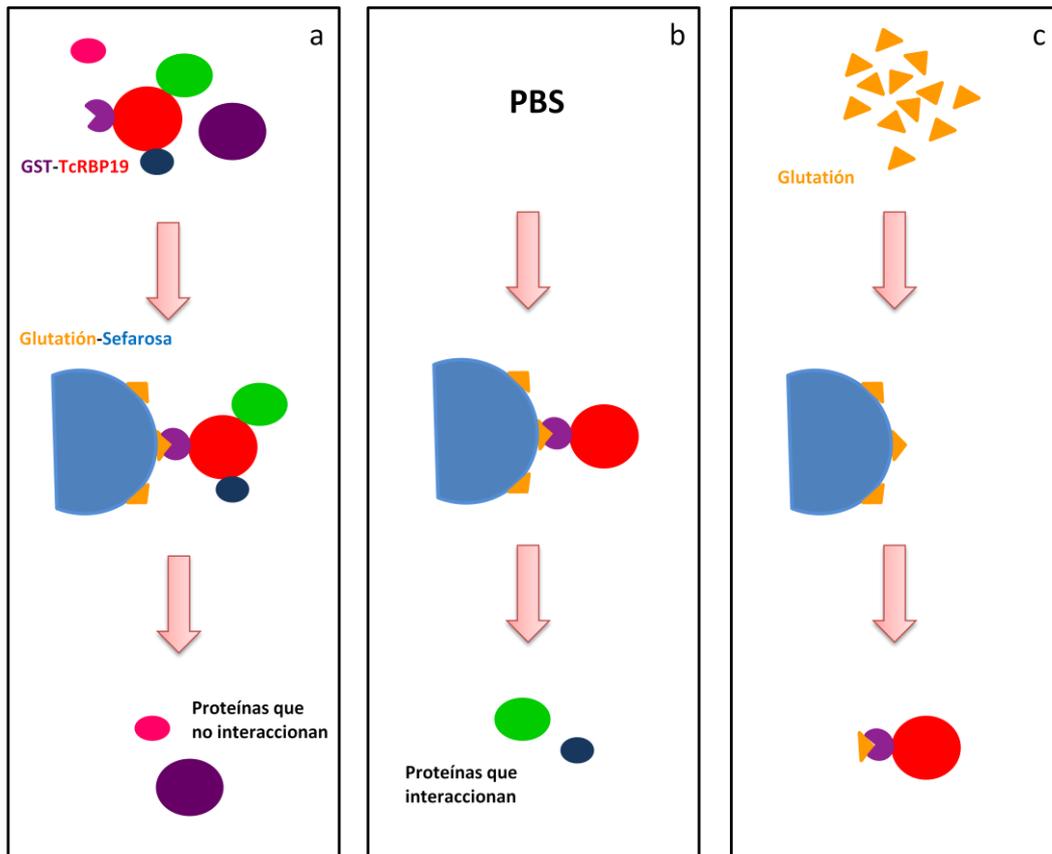


Figura 9: Purificación de proteínas de fusión con GST.

a: Unión de la proteína de fusión a la columna glutación sefarosa. b: Lavados. c: Elución.

3.18.2 Obtención de proteínas totales de *T. cruzi*

La preparación de proteínas solubles se realizó a partir de epimastigotas en fase exponencial de *T. cruzi*. Los parásitos se centrifugaron 15 min. a 1500g y se lavaron 3 veces con PBS 1x frío. Se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 10mM pH 7.5; EDTA 1mM; DTT 5mM; CHAPS 1%; glicerol 10%; 50µg aprotinina; 25µL AEBSF 100mM; 25µg pepstatina; 200µg TLCK; 50µg Leupeptina y 100µL E64 0,5mM) a una concentración de $5E^8$ parásitos/mL y se dejó agitando 30 min. en hielo. Finalmente se centrifugó el lisado 1 hora a 4°C a 20000g y se guardó el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles a -80°C.

3.18.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó usando el kit Protein Assay (Bio-Rad). El mismo se basa en el método de Bradford (Bradford, 1976) e implica la adición de un colorante ácido a la solución proteica y subsecuente medida espectrofotométrica a 595nm. La comparación con una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (Sigma) permite obtener una medida de la concentración proteica en la muestra problema.

3.19 Marcado de sonda ARN por transcripción *in vitro*

El plásmido pGEM-T Easy conteniendo las 3'UTR se trató con la enzima de restricción *Spe* I para linealizarlo. Las digestiones se corrieron en geles de agarosa 1% para recortar la banda correspondiente al plásmido lineal y purificarla.

La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el kit T7-MEGAscript™ (AMBION) según las recomendaciones del comerciante utilizando como molde aproximadamente 1µg de plásmido lineal. Para marcar las UTRs se utilizó 10µCi de [³²P]α-rUTP (PekinElmer). Las sondas obtenidas fueron purificadas utilizando columnas MicroSpin™ G-50 y G-25 (GE Healthcare).

3.20 Marcado de sondas oligorribonucleótidos

Los oligorribonucleótidos sintéticos utilizados se resumen en la **Tabla 3**. Las sondas (aproximadamente 100ng) fueron marcadas en el extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido kinasa (Roche) usando 10µCi [³²P]γ- dATP (PerkinElmer) durante 30 min. a 37°C de acuerdo a los métodos estándar (Ausubel, 1987). Todas fueron purificadas por pasaje a través de columnas MicroSpin™ G-25 (GE Healthcare).

Tabla 3: oligorribonucleótidos utilizados para la marcación radiactiva.

Sonda	Secuencia
ARE	AUUU AUUU AUUU AUUU A
CU	CUUUCUUUCUUUCUUUC
GU	GUUUGUUUGUUUGUUUG-
U-rich26mer	UAAUAUUUUUUUCGUUAUAUUUUUUUG
NRE	AUUU AUUUUGUUGUCGAAAAUUGUACAUAGCC

3.21 EMSA (análisis de retardo en gel)

Para el caso de las sondas sintéticas el análisis en gel de retardo (del inglés electrophoretic mobility shift assay o EMSA) de las interacciones ARN-proteína fue realizado según métodos estándar (Duhagon et al., 2001). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 20µl con tampón de *binding*. Como competidor inespecífico se utilizó espermidina 100mM. En cada reacción se utilizó 0,4ng de oligorribonucleótido marcado (10-20000 cpm) y 1µg de la proteína recombinante. Los competidores específicos fueron adicionados en un exceso molar de 10 y 100 veces a temperatura ambiente durante 10 minutos, antes de la adición de sonda marcada. Las reacciones fueron incubadas 20 min. a temp. ambiente y cargadas en geles nativos al 6% acrilamida. Los geles fueron pre-corridos a 200 voltios a 4°C y luego corridos con las muestras durante 3-4 horas a 250 voltios y 4°C. Luego fueron secados y expuestos a filmes de rayos X usando pantallas amplificadoras a -80°C o mediante la utilización del phosphoimager (Fujifilm, BAS-1800 II).

Los ensayos de EMSA con sondas obtenidas a partir de la transcripción *in vitro* se realizaron en base al trabajo de Thomson y col. (Thomson et al., 1999). Las reacciones se realizaron en un volumen de 20µL y con el tampón de *binding*. Como competidor inespecífico se utilizó espermidina 100mM. Se utilizaron de 60-100000 cpm de los ARNs marcados y 1µg de la proteína recombinante. Las reacciones fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron 10 minutos con 0,5 U de ARNasa T1 (Ambion) y por último con 10µg de heparina por 10 minutos más. Fueron cargadas en minigeles de 1,5mm al 6% acrilamida (36:1). Los geles fueron pre-corridos a 200 voltios a 4°C y luego corridos con las muestras durante 20 minutos a 200 voltios y 4°C. Fueron fijados en 10% de isopropanol, 7% de ácido acético y secados (Thomson et al., 1999). Se expusieron en filmes de rayos X usando pantallas amplificadoras a -80°C o mediante la utilización del phosphoimager (Fujifilm, BAS-1800 II).

3.22 Ensayos de Crosslinking

Las reacciones se llavaron a cabo en un volumen final de 20µL y con el tampón de *binding*. Como competidor inespecífico se utilizó espermidina 100mM. Se utilizaron de 60-100000 cpm de los oligorribonucleótido marcados y 1µg de la proteína recombinante o extracto total en distintas concentraciones. Las reacciones fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron con ARNasa T1 (Ambion) en distintas concentraciones de cero a 10 U en distintos tiempos y por último con 10µg de heparina por 10 minutos. Se crosslinkearon 20 minutos a 254nm

a 1cm de la fuente en hielo. Se incubaron con ARNasa A (Sigma) a distintas concentraciones por distintos tiempos. Por último se les agregó buffer de carga SDS PAGE a las reacciones, se hirvieron durante 3 minutos y se cargaron en minigeles de 1,5mm al 10% acrilamida (36:1). Los geles fueron corridos con las muestras durante 20 minutos a 200 voltios y 4°C. Luego fueron fijados en 10% de isopropanol, 7% de ácido acético y secados. Se expusieron en filmes de rayos X usando pantallas amplificadoras a -80°C o mediante la utilización del phosphoimager (Fujifilm, BAS-1800 II).

3.23 Super-retardo

Para los ensayos de superetardo las reacciones se prepararon según lo descrito para los ensayos de EMSA y crosslinking pero las mismas fueron incubadas con anticuerpo anti-TcRBP19 durante 10 minutos después del *binding*.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

Los eventos de regulación postranscripcionales son fundamentales en la regulación de la expresión génica. En particular, en los tripanosomátidos estos eventos adquieren mayor relevancia ya que la iniciación de la transcripción parece no constituir el punto de regulación principal de la expresión génica. En este contexto, el estudio de las proteínas de unión al ARN se vuelve sumamente interesante ya que son las protagonistas de la regulación génica postranscripcional al cumplir diversas funciones en el metabolismo del ARN. Entre otras cosas intervienen en el transporte, procesamiento, estabilidad, *splicing* alternativo y traducibilidad de sus ARN blancos.

El objetivo de este trabajo es estudiar la interacción de una proteína de unión al ARN de *T. cruzi*, caracterizada previamente en nuestro laboratorio, con sus posibles blancos. Mediante ensayos de GST-*pull down* e hibridación en microarreglos de ADN, utilizando ARN total de amastigotas, fueron seleccionados los posibles blancos de TcRBP19. Como ya se mencionó anteriormente la interacción de las proteínas de unión al ARN con sus blancos ocurre principalmente a nivel de las regiones transcritas no traducidas, generalmente en las 3'UTR. Por esta razón nos proponemos analizar la interacción de TcRBP19 con las 3'UTR de los ARNm capturados en el GST-*pull down*. Para lograr nuestro objetivo se desarrollaron dos abordajes, la estrategia utilizada se esquematiza en la **Figura 10**.

Por un lado se amplificaron las 3'UTR de algunos de los ARNm seleccionados en el GST-*pull down* mediante RT-PCR. Posteriormente, las UTR fueron clonadas en el vector pGEM-T Easy (Promega). Una vez corroboradas las secuencias obtenidas mediante secuenciación se realizaron ensayos de retardo en gel para verificar la interacción de TcRBP19 con las 3'UTR marcadas con ^{32}P mediante transcripción *in vitro*.

Por otro lado se analizaron *in silico* las secuencias de las 3' UTR de todos los ARNm seleccionados en el ensayo de GST-*pull down* de ARN. Se utilizaron los programas MEME y RNAfold con el objetivo de encontrar posibles motivos conservados y posibles estructuras respectivamente. Al constatar que las UTR poseían secuencias ricas en U se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con sondas sintéticas que presentaran este tipo de secuencias.

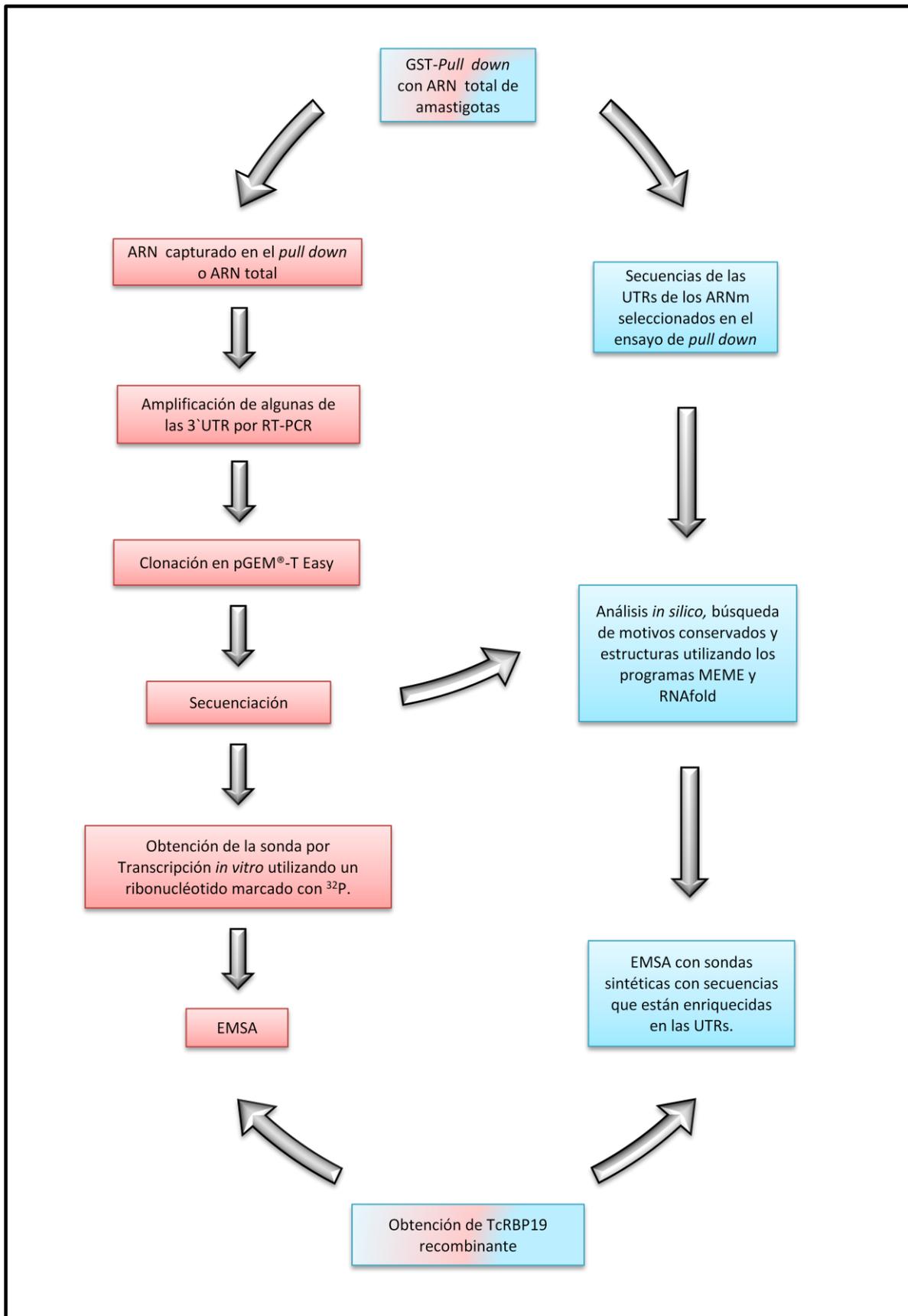


Figura 10: Esquema de la estrategia utilizada en este trabajo

4.1 Selección de los ARNs blanco

De los 14 ARNs capturados por TcRBP19 en el ensayo de *GST-pull down* se seleccionaron los considerados más relevantes: 1, 4, 6, 11, 12 y 19 (ver **Tabla 1**).

En primer lugar se seleccionó el ARNm 19 (TcRBP19) porque resulta interesante el hecho de que la proteína se una a su propio ARNm sugiriendo un mecanismo de autorregulación de su expresión. El ARNm 6 fue elegido por codificar para una proteína hipotética con un dominio tipo *zinc finger*, que es un importante dominio descrito de interacción con ADN y ARN. Esta proteína se expresaría únicamente en tripomastigotas sanguíneos (Minning et al., 2009). El 11, fue seleccionado por ser una subunidad del complejo ARP2/3 que participa en el complejo de polimerización de actina, proceso que se encuentra estrechamente relacionado con el proceso de infección del parásito. La proteína se expresaría en tripomastigotas metacíclicos (Minning et al., 2009). El ARNm 12 codifica para una proteína tipo GCN5 la cual se expresa mayoritariamente en el estadio amastigota (Minning et al., 2009). El dominio GCN5 se encuentra en factores activadores de la transcripción ya que posee actividad histona acetil transferasa permitiendo una desestabilización de las histonas y aumentando la accesibilidad de la maquinaria de transcripción al ADN. Finalmente, se eligieron los ARNs 1 y 4 porque a pesar de codificar para proteínas hipotéticas conservadas poseen puntos isoeléctricos básicos (9,9 y 9,3 respectivamente), lo cual nos haría suponer que podrían interactuar con ácidos nucleicos.

Recientemente se ha determinado que el gen 1 corresponde a la subunidad SDH11 perteneciente al complejo mitocondrial II de *T. cruzi* (Morales et al., 2009), la cual se expresaría en los estadios epimastigota y tripomastigota metacíclico (Minning et al., 2009).

4.2 RT-PCR

La amplificación de las 3`UTR de los mensajeros seleccionados se realizó mediante la técnica RT-PCR.

Para la obtención del ADNc se utilizó como molde el ARN capturado en el ensayo de *GST-pull down* porque se encuentra enriquecido en los ARNm que poseen las UTRs que queremos amplificar. El ARNm molde se retrotranscribió formando una cadena complementaria de ADN de hebra simple. La enzima utilizada en este proceso, conocido como retrotranscripción, es una ADN polimerasa dependiente de ARN denominada transcriptasa reversa. Esta enzima tiene la capacidad de extender un cebador de ADN apareado con un molde de ARNm.

Para la síntesis de la segunda hebra se ensayaron PCRs a diferentes temperaturas de hibridación usando los cebadores específicos para cada UTR y el oligo dT-Ancla o el Ancla solo (ver materiales y métodos).

En la **Figura 11** se observan los PCRs realizados para las UTRs de los mensajeros 1, 4 y 6. En el carril 2 se observa el producto de amplificación de la UTR 1 que tiene un tamaño aproximado de 400pb. El producto de amplificación de la UTR 4 (carril 3) posee un tamaño de 300pb aproximadamente. Para el caso de la UTR 6 el producto de amplificación no está focalizado y posee un tamaño aproximado de entre 300 y 400pb. Se realizó el control negativo sin ADN (no se muestra).

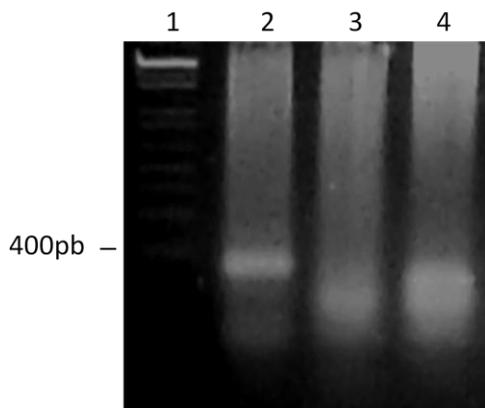


Figura 11: gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

- 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).
- 2: PCR a 52° C con cebador para UTR 1.
- 3 y 4: PCRs a 54° C con cebadores para las UTRs 4 y 6 respectivamente.

Como los productos obtenidos no fueron lo suficientemente nítidos y definidos se aumentó la temperatura de hibridación de los PCRs para aumentar la especificidad del producto de amplificación. Se utilizó una temperatura de hibridación 54° C para la UTR 1 y 56° C para las otras dos. Esto mejoró la definición de los productos obtenidos que fueron posteriormente purificados a partir del gel.

Se realizaron PCRs con distintas temperaturas de hibridación para las otras UTRs seleccionadas pero no fue posible lograr productos de amplificación específicos. Se ensayaron también PCR escalonados sin éxito. Como el ARN del *GST-pull down* podría haber sufrido eventos de degradación, por último y con el objetivo de mejorar la calidad del ARN molde, se realizó una extracción de ARN total de *T. cruzi* (**Figura 12**) que a pesar de no estar enriquecido exclusivamente en los ARNs deseados puede funcionar como molde para la RT-PCR.



Figura 12: ARN total de epimastigotas de *T. cruzi*

Gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.
Las 3 bandas predominantes corresponden a ARNs ribosomales.

A continuación el ARN obtenido se retrotranscribió para obtener el ADNc y se realizaron distintos ensayos de PCR hasta obtener productos de amplificación definidos.

En la **Figura 13**, seleccionado con una flecha, se observa el producto de amplificación de la UTR 11 de un tamaño aproximado de 300pb.

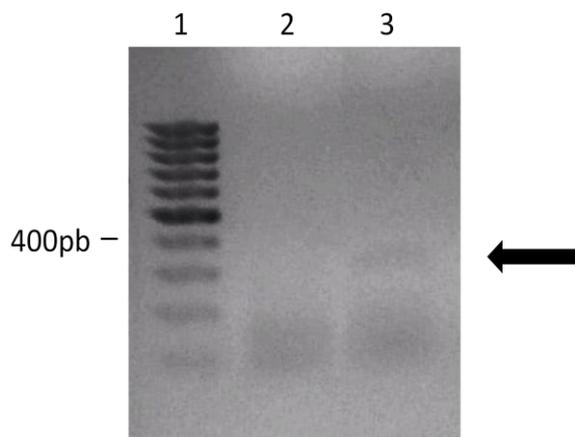


Figura 13: gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).
2: control sin ADN.
3: PCR escalonado de 10 ciclos con una temperatura de 52°, con cebador para la UTR 11.

Como el producto amplificado para la UTR 11 no fue suficientemente abundante, se realizó otro ensayo bajo las mismas condiciones pero con un volumen final de reacción mayor. Posteriormente la banda obtenida fue purificada a partir del gel.

El producto de amplificación correspondiente a la UTR 19 posee un tamaño de 400pb (**Figura 14**) y fue eluído y purificado del gel para su posterior clonado.

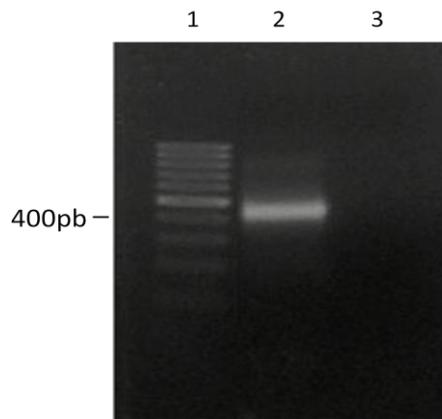


Figura 14: gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

- 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).
 2: PCR a 56° C con cebador para la UTR 19.
 3: control sin ADN.

A pesar de realizar varios intentos bajo distintas condiciones no fue posible obtener un producto de amplificación adecuado para la UTR del mensajero 12 por lo que decidimos continuar con las UTRs que sí logramos amplificar.

4.3 Clonado

4.3.1 Selección del vector

Las bandas obtenidas por PCR de las UTRs de los mensajeros 1, 4, 6, 11 y 19 fueron purificadas del gel y clonadas en el vector pGEM-T easy (Promega).

Este vector fue seleccionado por poseer las siguientes características:

- Posee una alta eficiencia de ligación de productos de PCR porque tiene una timina terminal en el extremo 3' del sitio de inserción que evita que se recircularice sobre sí mismo. A su vez, la timina terminal del vector es complementaria a la deoxiadenosina que la *Taq* polimerasa agrega al extremo 3' de los fragmentos amplificados.
- Contiene un promotor para la ARN polimerasa T7 y sitios de reconocimiento de distintas enzimas de restricción flanqueando el sitio de clonado múltiple, lo que nos permitirá obtener el plásmido lineal y realizar el ensayo de transcripción *in vitro* utilizando dicha ARN polimerasa.
- Posee un sitio de clonado múltiple que se ubica dentro de la región codificante de un fragmento de la β -galactosidasa que es capaz de complementar la funcionalidad de la enzima codificada a nivel genómico en un proceso denominado α -complementación. La inserción de un fragmento de ADN le quita funcionalidad a este gen, lo que permite, en

condiciones de inducción, identificar los clones recombinantes por color en las placas con los indicadores adecuados (X-gal e IPTG).

4.3.2 Verificación de los clones bacterianos recombinantes

Los fragmentos obtenidos mediante PCR fueron ligados al plásmido pGEM-T easy y con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes *E. coli* de la cepa XL1. Éstas fueron cultivadas en medio selectivo LB agar con Ampicilina, Xgal e IPTG. La ampicilina nos permite seleccionar las bacterias que incorporaron plásmido ya que la cepa bacteriana no es resistente a la ampicilina. Por otro lado, el X-gal y el IPTG seleccionan, por color, las bacterias que incorporaron el inserto. El X-gal es un sustrato cromogénico β -galactósido y el IPTG funciona como inductor del promotor *lac*. Las bacterias que incorporaron el plásmido con el inserto de interés tienen un fenotipo blanco ya que la enzima no se expresa en forma funcional. Si no hay inserto no se rompe el marco de lectura teniendo lugar la α -complementación y expresándose la enzima que al reaccionar con el X-gal confiere fenotipo azul a las bacterias.

Para verificar que los clones contuvieran el inserto deseado se realizó PCR de colonias, se analizaron 8 clones para cada UTR, usando el oligo dT- ancla y los cebadores específicos.

En la **Figura 15** se muestra como ejemplo el PCR de colonia de una de las UTRs, la UTR 11.

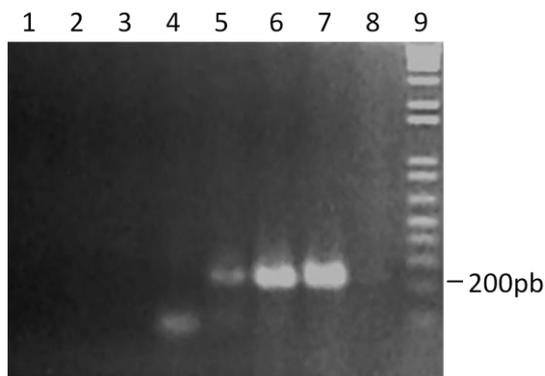


Figura 15: gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

1 al 8: PCRs a 55° C con cebador para UTR 11.

9: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen)

Posteriormente se aisló el ADN plasmídico de los clones positivos (carriles 5, 6 y 7) mediante el método de miniprep lisis alcalina para su posterior secuenciación y confirmar así que poseen el inserto deseado y que la orientación es la correcta para la transcripción. En la **Figura 16** se muestra como ejemplo el ADN plasmídico obtenido a partir de los clones positivos por PCR de colonias de las UTRs de los mensajeros 11 y 19. Se observa el plásmido en su forma superenrollada y circular y sin contaminación de ADN genómico ni ARN.

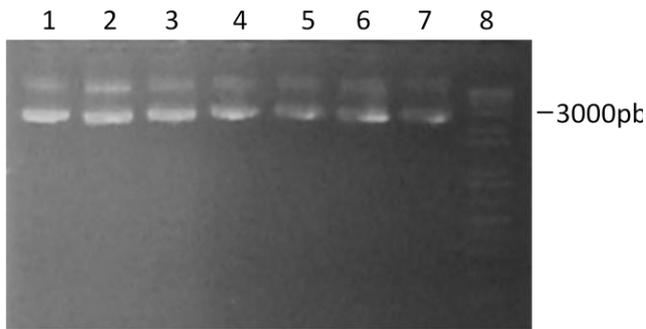


Figura 16: gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

1 al 3: ADN plasmídico de los clones correspondientes a la UTR 11.
4 al 7: ADN plasmídico de los clones correspondientes a la UTR 19.
8: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen)

4.4 Secuenciación

Los clones seleccionados por PCR de colonia fueron secuenciados por el servicio de *Macrogen DNA Sequencing Service* utilizando el cebador universal T7. Los clones de las UTRs 4 y 6 resultaron poseer secuencias inespecíficas mientras que algunos de los clones de las UTRs 1, 11 y 19 poseían las UTRs deseadas en la orientación correcta (corriente abajo del promotor T7). Las secuencias obtenidas para estos clones se muestran en la **Figura 17**.

UTR 1
GGAUUGACUGCGGGAUUUU(1)CAGUCUUUCUUGGAAGGCAUUAAUUGCCAUACUUUGUUCUUGCUUGUUUCUUCAA
 GGCA**UAG****UAGACGAAUUGAAAAUUGUAGGAGAACGAUGAUAAAAAAAAAAAAAAAAA**

UTR 11
CACGAGGAAGUAGAAACAUGC(11)AUAGGAAUAAGAUUAUUCAAUUUAUAAUACUUUCUUGAUGGAUUAUUGAUG
 CUGACAUUGCUGCAAUGAAGUUGAAUGUGAAUCAACGUGCACGUCGAGCAGCGAUGGAAUUCUUCUUGCAUUGAAU
 UUCACA**UGA****ACUUUUUUGUGUUUUUCCCUUUCAUUUUUUUGAAAAAAAAAAAAAAAAA**

UTR 19
UGAGGACUAUCGCGCACAUC(LP1)UCGCCGCGGACGAGAUGAAUCCAACCACGAGAGCGGAAAAGAGGUGCGGU
 UAACGGCAGCAGGCGGAGCAGAUGCACGCGGGAUCGAGGUAGAACGAUGUGACGAGGCUGAAGUUGUUGCAGCACCC
 GAUGACGGAGAGUCAUACAUGGCGUGGAUUGCAAGUCUGGGAUUGGAGAAAAGACAUUGACACAC**UGA****AAAUGAAA**
UGCGUUGCCUGCUGCUUUUGUAUUUUUUUGUCAUUCAGCAUGCGUGUUGUUCUUUUCACAUGGCGGGGAGUG
GGAUUGCCAAGCCAUGAAUGACGGAUGAGAAGGAUGGUGAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 17: Secuencias obtenidas de los clones positivos con las UTRs 1, 11 y 19.

En rojo se muestra el codón de terminación, en violeta la secuencia correspondiente al cebador específico para cada UTR, en celeste la 3'UTR y en verde la cola polyA.

4.5.2 Búsqueda de posibles motivos conservados y estructuras

Como se mencionó anteriormente las señales en *cis* que son reconocidas por las proteínas de unión al ARN pueden ser a nivel de secuencia o de estructura. Por esta razón, una vez definidas, las UTRs fueron analizadas en estos dos aspectos.

Por un lado se buscaron posibles motivos conservados mediante el análisis de las UTRs con el programa MEME (Bailey and Elkan, 1994). Se realizaron búsquedas de motivos con distintos rangos de longitudes variando entre un mínimo de 4 bases y un máximo de 15. El programa identificó varios motivos pero ninguno de ellos poseía un valor E (probabilidad de que el motivo encontrado sea por azar) esperado apropiado.

Por otro lado utilizando el programa RNAfold (Gruber et al., 2008) se modelaron las estructuras de todas las 3'UTRs utilizando los parámetros por defecto, que se acercan a las condiciones fisiológicas de la célula (**Figura 18**). A simple vista no es posible la identificación de un patrón claro de estructura ya que las UTRs presentan estructuras muy diversas. Todas las estructuras modeladas poseen una energía libre negativa, lo cual indicaría que son energéticamente favorables en condiciones fisiológicas. Sin embargo, no se descarta la existencia de estructuras diferentes a las mostradas en la **Figura 18** que podrían estar determinadas y estabilizadas por la interacción de las UTRs con proteínas de unión al ARN.

Por otro lado, el hecho de no haber encontrado motivos consenso ni un patrón de estructura claro puede deberse a que las secuencias utilizadas para el análisis bioinformático delimitadas teóricamente probablemente no corresponden a las secuencias reales.

A pesar de que no se encontraron motivos conservados relevantes ni un patrón claro a nivel de estructura se constató que las UTRs poseían elementos ricos en U y que muchos de estos elementos se encontraban en los *loops* de las estructuras (**Figura 18**, señalados con recuadro). Dado que en trabajos anteriores se determinó que las proteínas de unión al ARN interactúan principalmente con regiones sin estructura definida o con regiones simple hebra en los *loops* de las horquillas (Auweter et al., 2006), las regiones ricas en U señaladas en la **Figura 18** podrían constituir los sitios blanco de unión de TcRBP19, aunque esta hipótesis debe ser demostrada experimentalmente.

Figura 18: Estructuras y secuencias de las 3'UTR.

Se muestran las estructuras según la probabilidad del apareamiento de bases y abajo a la izquierda la barra de referencia de probabilidad según el color. Entre paréntesis se indican los valores de energía libre de las estructuras. Nótese que son todos valores negativos.

En las estructuras se señalan con recuadros negros los elementos ricos en U que se encuentran en los *loops*.

En las secuencias se señalan con distintos colores los distintos elementos, en rojo los ARE (*AU-rich RNA elements*), en verde los CU y en naranja los GU.

Se ha reportado que este tipo de secuencias ricas en U pueden funcionar como señales que al unirse con factores en *trans* afectan la estabilidad de los ARNm. Por ejemplo, en *T. cruzi* secuencias ricas en AU en algunos casos constituyen señales en *cis* en las 3'UTR que determinan la desestabilización selectiva de los mensajeros blanco (D'Orso et al., 2003). Existe además, una importante familia de proteínas de unión al ARN con motivos RRM en mamíferos, las proteínas Hu, que se unen a elementos ARE y también a secuencias ricas en U en las 3'UTRs de sus blancos estabilizándolos, previniendo su degradación. Estas proteínas están involucradas en diversos procesos biológicos e intervienen en muchos aspectos postranscripcionales, desde el *splicing* hasta la traducción de sus blancos. La familia está compuesta por cuatro miembros HuR, HuB, HuC y HuD donde HuR se expresa de forma ubicua mientras que el resto se expresan específicamente en neuronas (Hinman and Lou, 2008). Por otro lado se sabe que la expresión de la proteína HuR humana en *T. brucei* estabiliza los mensajeros que contienen elementos ARE (Quijada et al., 2002).

Por estos motivos este tipo de secuencias podrían constituir señales en *cis* a los que podría unirse TcRBP19 regulando la estabilidad de sus blancos. Entonces, para determinar si TcRBP19 es capaz de unirse *in vitro* a estas secuencias ricas en U, que se encuentran enriquecidas en las UTRs de los mensajeros seleccionados en el ensayo de *GST-pull down*, nos propusimos realizar ensayos de retardo en gel con sondas sintéticas con este tipo de secuencias.

4.6 EMSA con sondas ricas en U

Para la realización de estos ensayos fue necesaria la obtención de la proteína recombinante. Como ya se mencionó, TcRBP19 fusionada a GST fue expresada anteriormente en nuestro grupo de trabajo en el vector de expresión pGex4T-1 en células *E. coli* BL21.

La fusión de la proteína recombinante a GST permite su fácil purificación mediante cromatografía de afinidad usando glutatión inmovilizado a una matriz de Sefarosa. TcRBP19 recombinante fue purificada mediante esta técnica para posteriormente ser utilizada en los ensayos de retardo de movilidad en gel.

La proteína purificada fue cuantificada mediante la adición de un colorante ácido a la solución proteica y subsecuente medida espectrofotométrica a 595nm, obteniéndose una concentración de 5,96 mg/mL.

Por otro lado, las sondas ricas en U utilizadas (ver materiales y métodos) fueron marcadas con [³²P]γ -dATP y purificadas por pasaje a través de columnas MicroSpin™ G-25 (GE Healthcare).

Dos de las sondas utilizadas poseen secuencias ricas en AU, ARE y U-rich26mer. La sonda NRE fue utilizada porque es rica en U y posee un sitio de unión a proteínas de unión al ARN del tipo pumilio. Esta sonda estaba disponible en nuestro laboratorio ya que previamente se ha trabajado en el estudio de proteínas pumilio (Dallagiovanna et al., 2008; Dallagiovanna et al., 2005). Por último las otras dos sondas poseen secuencias ricas en CU y GU (ver materiales y métodos).

Se testó la interacción de la proteína de fusión con las cinco sondas mencionadas, observándose la formación de complejo en todos los casos confirmando de esta manera la interacción (**Figura 19**). Si bien se cargó la misma cantidad de material radiactivo (cpm) en todos los carriles, para determinar certeramente cuál es el complejo de mayor afinidad sería necesaria la determinación de la relación sonda libre (flecha de abajo)/complejo (flecha de arriba).

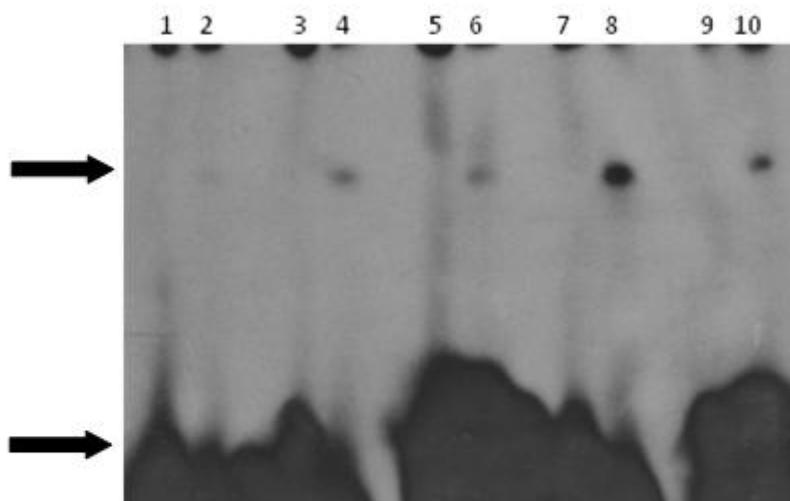


Figura 19: EMSA de TcRBP19-GST con los cuatro oligorribonucleótidos.

Se incubó durante 20 min. a temp. ambiente 1ng de oligorribonucleótido marcado con [32 P] γ -dATP con 1 μ g de proteína de fusión en una reacción de 20 μ L. 1: sonda ARE libre 2: sonda ARE con 1 μ g de proteína GST-TcRBP19 3: sonda CU libre 4: sonda CU con 1 μ g de proteína GST-TcRBP19 5: sonda GU libre 6: sonda GU con 1 μ g de proteína GST-TcRBP19 7: sonda U-rich26mer libre 8: sonda U-rich26mer con 1 μ g de proteína GST-TcRBP19 donde 9: sonda NRE libre 10: sonda NRE con 1 μ g de proteína GST-TcRBP19.

Esto demuestra que la proteína recombinante es capaz de unirse *in vitro* a estas secuencias ricas en U bajo las condiciones ensayadas.

Para testar la especificidad de la interacción de TcRBP19 con NRE, se estudió el efecto de diferentes competidores fríos. Las competencias se realizaron con las otras sondas sin marcar en un exceso de 10 veces por encima de la sonda marcada y también se realizaron competencias usando NRE como competidor específico en un exceso de 10 y 100 veces (**Figura 20**). Para descartar que la interacción de la proteína de fusión con la sonda es debida a la presencia de GST se realizó el ensayo de unión entre GST y NRE marcado como control. Como se observa en el carril 2 de la **Figura 20** en este caso no se observa formación de complejo.

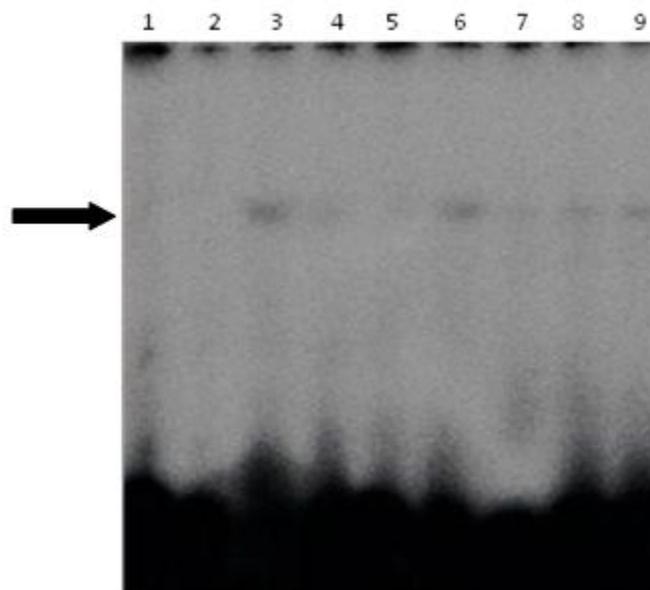


Figura 20: EMSA de TcRBP19-GST con NRE marcada con [32 P] α -dATP. y competencias específicas.

1: sonda NRE libre; 2: sonda NRE con 1 μ g de GST; 3: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19. 4: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19 competido con NRE frío 10x. 5: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19 competido con NRE frío 100x. 6: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19 competido con ARE frío 10x. 7: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19 competido con CU frío 10x. 8: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19 competido con GU frío 10x. 9: sonda NRE con 1 μ g de GST-TcRBP19 competido con U-rich26mer frío 10x.

Como en la figura anterior aquí también se observa la formación de complejo (señalado con flecha) con las sonda NRE (carril3). Comprobamos que esta interacción es específica ya que la sonda NRE fría en un exceso de 10x es capaz de desplazar la sonda NRE marcada casi en su totalidad (carril 4) y con un exceso de 100x el complejo desaparece totalmente (carril5). En el caso de las competencias 10x con las sondas CU, GU y U-rich26mer frías se observa un desplazamiento del complejo que no es total (carriles 7, 8 y 9). La interacción TcRBP19 NRE casi no es desplazada usando un exceso ARE 10x (carril 6), lo que demostraría que el complejo formado con NRE parece ser más estable que el formado con la sonda ARE. Como la competencia 10x que genera el mayor desplazamiento es con la propia NRE fría podríamos decir que es la sonda que posee una mayor afinidad por TcRBP19, aunque para confirmarlo deberíamos hacer este mismo ensayo con cada una de las otras sondas marcadas y sus respectivas competencias.

4.7 Obtención de la sonda por transcripción *in vitro*

Por otro lado continuamos con el otro abordaje de este trabajo en donde nos propusimos testar la interacción de algunas UTRs de los mensajeros del GST-*pull down* con la proteína recombinante.

De las 3' UTRs clonadas se siguió trabajando con los 3 clones que fueron confirmados mediante secuenciación, conteniendo las UTRs 1, 11 y 19. Mediante la técnica de lisis alcalina se obtuvo el ADN plasmídico de estos clones. El plásmido obtenido se trató con la enzima de restricción *Spe I*, que corta al final del fragmento clonado, (**Figura 21**) para obtener el plásmido en su forma lineal.



Figura 21: esquema del plásmido lineal por tratamiento con *Spe I* conteniendo la UTR.

Las digestiones realizadas fueron analizadas mediante electroforesis (**Figura 22**). Todas fueron digestiones parciales ya que se observan las tres conformaciones del plásmido: circular, lineal y superenrollado.

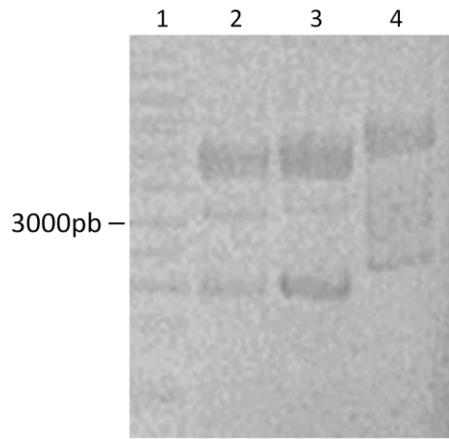


Figura 22: Gel de agarosa 1% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

- 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas),
- 2: Digestión del ADN plásmidico con la UTR 1.
- 3: Digestión del ADN plásmidico con la UTR 11.
- 4: Digestión del ADN plásmidico con la UTR 19.

Como la cantidad de ADN plasmídico obtenida no fue suficiente se partió de un volumen mayor de cultivo para las próximas extracciones. El ADN plasmídico se trató con la enzima de restricción *Spe I* y las digestiones se corrieron en geles de agarosa 1% para recortar la banda correspondiente al plásmido lineal y purificarla. Posteriormente, una alícuota de la purificación se corrió en un gel de agarosa 0,7% para corroborar que no hubiera plásmido en conformación circular ni superenrollado. En la **Figura 23** se muestra que la purificación fue exitosa, ya que se observan bandas únicas en los tres casos, correspondientes al ADN plasmídico en su conformación lineal. Para el caso de los plásmidos que contienen las UTRs 1 y 19 el producto obtenido fue más escaso.

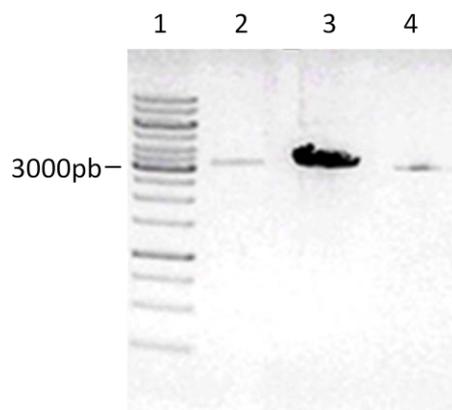


Figura 23: Gel de agarosa 0,7% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

- 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas).
- 2: Purificación de la conformación lineal de la digestión del ADN plásmidico con la UTR 1.
- 3: Purificación de la conformación lineal de la digestión del ADN plásmidico con la UTR 11.
- 4: Purificación de la conformación lineal de la digestión del ADN plásmidico con la UTR 19.

Las muestras conteniendo el ADN plasmídico lineal fueron cuantificadas mediante medidas de absorbancia a 260nm. Las concentraciones obtenidas se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Cuantificación del ADN plasmídico lineal. Las relaciones de Absorbancia a 260/Absorbancia 280 fueron entre 1,8 y 1,9.

UTR	DO 260 nm	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	0,96	48
11	3.6	180
19	0.62	31

4.7.1 Transcripción *in vitro*

Una parte de los plásmidos lineales purificados fueron utilizados como molde para poner a punto el ensayo de transcripción *in vitro* que se realizó utilizando el Kit T7-MEGAscript™ (AMBION). En la **Figura 24** se muestra el resultado del ensayo en un gel de agarosa 2%. Se observa producto de transcripción solo en el caso de la UTR del mensajero 11, de un tamaño de aproximadamente 200pb, probablemente porque era la que poseía más cantidad de molde plasmídico (ver **Tabla 5**).

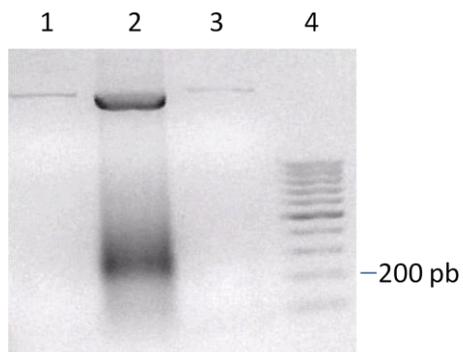


Figura 24: Gel de agarosa 2% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

- 1: Transcripción *in vitro* de la UTR 1.
- 2: Transcripción *in vitro* de la UTR 11.
- 3: Transcripción *in vitro* de la UTR 19.
- 4: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).

Para los plásmidos que contienen las UTRs 1 y 19 se volvió a realizar el mismo procedimiento (aislamiento de ADN plasmídico, digestión y purificación) hasta obtener la cantidad de plásmido lineal purificado suficiente para el ensayo de transcripción *in vitro* (1 μg).

Finalmente se obtuvieron las concentraciones mostradas en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Cuantificación del ADN plasmídico lineal. Las relaciones de Absorbancia a 260/Absorbancia 280 fueron entre 1,8 y 1,9.

UTR	DO 600 nm	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	2.46	123
19	2.21	110

En la **Figura 25** se muestra el resultado de la transcripción *in vitro* de los plásmidos con las UTRs 1 y 19. En ambos casos se observa producto de transcripción. Para la UTR1 se observan varias bandas de distintos tamaños (carril 1) que podrían ser productos de transcripción abortivos o de la formación de distintas estructuras secundarias ya que si bien se hirvió la muestra 5 minutos antes de cargar, se trata de un gel no desnaturalizante. Sin embargo en el caso de la UTR 19 se observa una banda única de un tamaño de aproximadamente 300pb.

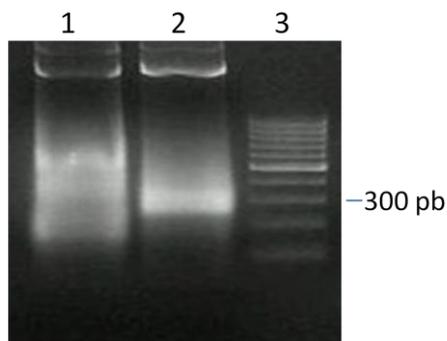


Figura 25: Gel de agarosa 2% en tampón TAE 1x teñido con Bromuro de Etidio.

- 1: Transcripción *in vitro* de la UTR 1.
- 2: Transcripción *in vitro* de la UTR 19.
- 3: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).

4.7.2 Marcado radiactivo

Una vez obtenidas las cantidades suficientes de plásmidos lineales conteniendo las tres UTRs y puesta a punto la técnica de transcripción *in vitro*, se realizó el mismo ensayo pero utilizando uno de los ribonucleótidos de la reacción marcado con ^{32}P .

Los productos fueron purificados utilizando columnas MicroSpinTM G-50 y G-25 (GE Healthcare). Posteriormente fueron tratados con ADNasa para evitar que el ADN plasmídico funcionara como un competidor intrínseco en el *binding* del EMSA. De esta manera obtuvimos las tres 3' UTRs marcadas radiactivamente para luego utilizarlas en los ensayos de retardo.

4.8 EMSA con sondas obtenidas por transcripción *in vitro*

Para determinar si la proteína recombinante se une *in vitro* a las UTRs de los mensajeros capturados en el ensayo de GST-*pull down*, se realizaron ensayos de retardo de movilidad en gel con las sondas obtenidas a partir de transcripción *in vitro*.

La técnica se puso a punto probando distintas concentraciones de ARNasa T1, distintas relaciones acrilamida/bisacrilamida y distintos tiempos de incubación hasta llegar a las condiciones óptimas (ver materiales y métodos). En ausencia de ARNasa T1 se constató que las sondas migran de forma

difusa a lo largo de todo el carril (**Figura 26** carriles 1 y 5) mientras que el tratamiento de las mismas con esta enzima permite su focalización (carriles 2 y 6).

En las condiciones ensayadas la proteína de fusión se une a las sondas 1 y 11 generando la formación de complejos (Señalados con la flecha en la **Figura 26**). Se puede observar que los complejos presentan un patrón difuso probablemente por la presencia de estructuras secundarias ya que se trata de un gel nativo. Como se mencionó previamente, para descartar que la interacción de la proteína de fusión con la sondas es debida a la presencia de GST se realizó el ensayo de unión entre GST y las sondas 1 y 11 (carriles 3 y 7 respectivamente) donde efectivamente no se observa formación de complejo.

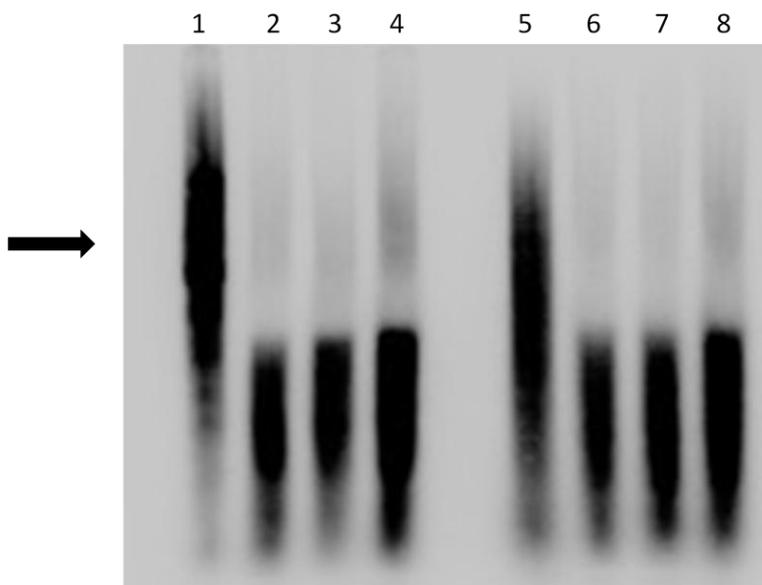


Figura 26: EMSA de TcRBP19-GST con las sondas 1 y 11.

Se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente 1 μ L de sondas 1 y 11 con 1 μ g de proteína de fusión en una reacción de 20 μ L. Se trató con RNasa T1 en los casos en que se menciona.

1: sonda 1 libre. 2: sonda 1 libre con RNasa T1. 3: sonda 1 con RNasa T1 y con 1 μ g de proteína GST. 4: sonda 1 con RNasa T1 y con 1 μ g de proteína TcRBP19-GST. 5: sonda 11 libre. 6: sonda 11 libre con RNasa T1. 7: sonda 11 con RNasa T1 y con 1 μ g de proteína GST. 8: sonda 11 con RNasa T1 y con 1 μ g de proteína TcRBP19-GST.

Por otro lado, la sonda 19 también interacciona con TcRB19 formando un único complejo señalado con flecha en la **Figura 27** (no se muestra el control con GST).

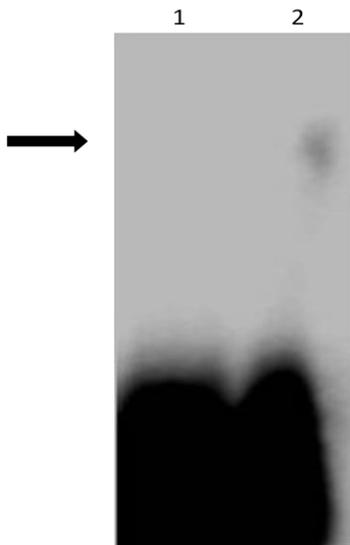


Figura 27: EMSA de TcRBP19-GST con la sonda 19.

Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente 1 μ l de sonda 19 con 1 μ g de proteína de fusión en una reacción de 20 μ L. Se trató con ARNasa T1.

1: sonda 19 libre

2: sonda 19 con 1 μ g de proteína GST-TcRBP19.

Se realizaron también ensayos de retardo en gel con las UTRs obtenidas por transcripción *in vitro* y se utilizaron como competidores las sondas sintéticas pero no se pudo poner a punto este ensayo.

Resumiendo, sabemos que la proteína recombinante interacciona con las UTRs 1, 11 y 19 y que esta interacción no es debida a la presencia de GST. Ahora bien, para determinar si la proteína nativa también es capaz de interactuar con las UTRs, se realizaron ensayos de EMSA pero utilizando extractos totales de *T. cruzi*. Como en el estadio epimastigota, que es el que se cultiva en el laboratorio, la proteína casi no se expresa se usaron extractos totales de parásitos transfectantes disponibles que sobreexpresan TcRBP19. En estas condiciones se observa la formación de un complejo con la UTR 19 (**Figura 28**, carril 2, señalado con flecha).

Por otro lado, para corroborar que la formación del complejo es debida a la interacción de la sonda con TcRBP19, se realizaron ensayos de super-retardo. La reacción es incubada con el anticuerpo anti-TcRBP19 que al interactuar con la proteína o bien, no permite la interacción por lo que no debería observarse la formación de complejo, o si hay interacción, el mismo debería presentar una migración menor. Como se observa en el carril 3 de la **Figura 28** el complejo desaparece cuando la reacción es incubada con el anticuerpo. Esto demuestra que el mismo efectivamente corresponde a la interacción de la sonda con TcRBP19.

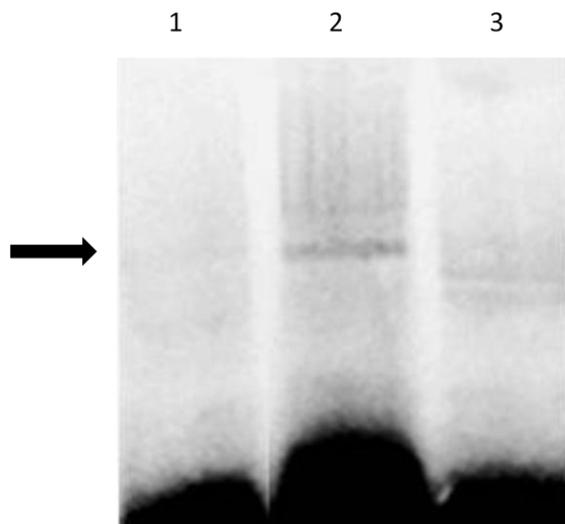


Figura 28: EMSA de extracto del transfectante con la sonda 19 y super-retardo.

Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente 2 μ L de sonda 19 con 7 μ g de extracto en una reacción de 20 μ L conteniendo: Tris-HCl 10mM, KCl 10mM, $MgCl_2$ 10mM, DTT 1mM, EDTA 0.1M. Se incubó por 10 minutos con el anticuerpo anti TcRBP19 la reacción correspondiente al carril 3. Posteriormente se trató con ARNasa T1 y con heparina.

1: sonda 19 libre

2: sonda 19 con 7 μ g de extracto del transfectante.

3: sonda 19 con 7 μ g de extracto y anticuerpo anti TcRBP19.

Este mismo ensayo se realizó para las otras dos UTRs pero lamentablemente no se obtuvieron resultados concluyentes.

Se realizaron también ensayos de crosslinking con las tres UTRs en distintas condiciones pero no se obtuvo en ninguno de los casos evidencia de interacción con las UTRs probablemente porque ninguna de las condiciones ensayadas permitieron discernir la formación de un complejo nítido. Se realizaron ensayos con la proteína recombinante, con extracto total del transfectante y del salvaje. Se probaron también distintas concentraciones de ARNasa T1 y ARNasa A, distintas relaciones acrilamida/ bisacrilamida entre otras variables.

4.9 Conclusiones

De los seis genes elegidos del ensayo de *GST-pull down* de ARN se lograron amplificar y clonar correctamente, con secuencia y orientación adecuadas, tres regiones 3' UTRs. Posteriormente, se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* las UTRs marcadas radiactivamente para ser utilizadas como sonda en ensayos de retardo de la movilidad en gel, donde se constató que las tres UTRs son capaces de unirse *in vitro* a la proteína recombinante. Utilizando extracto total del transfectante que sobreexpresa TcRBP19 fue posible comprobar la interacción *in vitro* de la proteína nativa con una de las UTRs utilizadas.

Por otro lado, las UTRs de todos los genes del *GST-pull down* fueron analizadas *in silico* utilizando los programas MEME y RNAfold con el objetivo de encontrar motivos conservados y posibles estructuras respectivamente. Aunque no se encontraron motivos conservados ni patrones claros a

nivel de estructura se constató que las UTRs poseían secuencias ricas en U, por lo que se realizaron ensayos de retardo en gel con sondas sintéticas que presentaran este tipo de secuencias. Se comprobó que TcRBP19 es capaz de unirse *in vitro* a este tipo de secuencias mostrando distintas actividades de unión según la sonda utilizada.

5 PERSPECTIVAS

En primer lugar, para continuar con el estudio de la interacción de TcRBP19 con sus blancos, sería interesante realizar el mismo procedimiento con las otras UTRs (3' y 5') que no fueron estudiadas en este trabajo. Esto nos permitiría determinar si la interacción de todos los mensajeros blancos ocurre a través de las 3'UTR y/o de las 5'UTR. Esto también mejoraría en gran medida el análisis bioinformático ya que contaríamos con las secuencias reales de todas las UTRs.

Por otro lado, teniendo el antecedente de que TcRBP19 es capaz de unirse a regiones ricas en U y que a su vez estos tipos de regiones se encuentran en las UTRs de sus blancos, como trabajo futuro nos planteamos realizar ensayos de mutaciones en estas regiones para determinar qué tipo de señales son las que intervienen en la interacción.

También sería relevante poder identificar qué efecto tiene sobre sus blancos la interacción con TcRBP19, si genera estabilización y/o desestabilización de los mismos.

Otro aspecto que nos permitiría acercarnos a determinar la funcionalidad de esta proteína sería identificar los compañeros proteicos de la misma, lo cual podría llevarse a cabo mediante ensayos de inmunoprecipitación y posterior análisis en espectrometría de masas.

6 BIBLIOGRAFIA

- (CDC), C. f. d. c. (2006). American trypanosomiasis fact sheet, vol. 2006.
- Agabian, N.** (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* **61**, 1157-60.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Aly, R., Argaman, M., Halman, S. and Shapira, M.** (1994). A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in Leishmania. *Nucleic Acids Res* **22**, 2922-9.
- Archer, S. K., Luu, V. D., de Queiroz, R. A., Brems, S. and Clayton, C.** (2009). Trypanosoma brucei PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS Pathog* **5**, e1000565.
- Ausubel, F. M.** (1987). Current protocols in molecular biology. New York: Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.
- Auweter, S. D., Oberstrass, F. C. and Allain, F. H.** (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res* **34**, 4943-59.
- Avila, A. R., Yamada-Ogatta, S. F., da Silva Monteiro, V., Krieger, M. A., Nakamura, C. V., de Souza, W. and Goldenberg, S.** (2001). Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **117**, 169-77.
- Bailey, T. L. and Elkan, C.** (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28-36.
- Bangs, J. D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A. and Boothroyd, J. C.** (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* **267**, 9805-15.
- Batista, J. A., Teixeira, S. M., Donelson, J. E., Kirchhoff, L. V. and de Sa, C. M.** (1994). Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **67**, 301-12.
- Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C. and Guilbride, D. L.** (2005). Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **143**, 125-34.
- Bercovich, N., Levin, M. J., Clayton, C. and Vazquez, M. P.** (2009). Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* **166**, 190-3.
- Bolognani, F., Contente-Cuomo, T. and Perrone-Bizzozero, N. I.** Novel recognition motifs and biological functions of the RNA-binding protein HuD revealed by genome-wide identification of its targets. *Nucleic Acids Res* **38**, 117-30.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short.** (1987). XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli Strain with β -Galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378.
- Campos, P. C., Bartholomeu, D. C., DaRocha, W. D., Cerqueira, G. C. and Teixeira, S. M.** (2008). Sequences involved in mRNA processing in Trypanosoma cruzi. *Int J Parasitol* **38**, 1383-9.
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J. and Vazquez, M. P.** (2005). Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of Trypanosoma cruzi: implications for their functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **333**, 1017-25.
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J. and Vazquez, M. P.** (2006). Trypanosoma cruzi: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. *Exp Parasitol* **113**, 112-24.

- Chagas, C.** (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**, 159-219.
- Chen, J., Rauch, C. A., White, J. H., Englund, P. T. and Cozzarelli, N. R.** (1995). The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell* **80**, 61-9.
- Clayton, C. and Shapira, M.** (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* **156**, 93-101.
- Clayton, C. E.** (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* **21**, 1881-8.
- Clery, A., Blatter, M. and Allain, F. H.** (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 290-8.
- Contreras, V. T., Araujo-Jorge, T. C., Bonaldo, M. C., Thomaz, N., Barbosa, H. S., Meirelles Mde, N. and Goldenberg, S.** (1988). Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **83**, 123-33.
- Contreras, V. T., Navarro, M. C., De Lima, A. R., Arteaga, R., Duran, F., Askue, J. and Franco, Y.** (2002). Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 1213-20.
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M. and Goldenberg, S.** (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* **16**, 315-27.
- Corden, J. L.** (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**, 383-7.
- D'Orso, I., De Gaudenzi, J. G. and Frasch, A. C.** (2003). RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol* **19**, 151-5.
- Dallagiovanna, B., Correa, A., Probst, C. M., Holetz, F., Smircich, P., de Aguiar, A. M., Mansur, F., da Silva, C. V., Mortara, R. A., Garat, B. et al.** (2008). Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **283**, 8266-73.
- Dallagiovanna, B., Perez, L., Sotelo-Silveira, J., Smircich, P., Duhagon, M. A. and Garat, B.** (2005). *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. *Exp Parasitol* **109**, 260-4.
- Dallagiovanna, B., Plazanet-Menut, C., Ogatta, S. F., Avila, A. R., Krieger, M. A. and Goldenberg, S.** (2001). *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp Parasitol* **99**, 7-16.
- DaRocha, W. D., Otsu, K., Teixeira, S. M. and Donelson, J. E.** (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **133**, 175-86.
- Das, A. and Bellofatto, V.** (2009). The non-canonical CTD of RNAP-II is essential for productive RNA synthesis in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **4**, e6959.
- de Carvalho, T. U. and de Souza, W.** (1986). Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **28**, 205-12.
- De Gaudenzi, J., Frasch, A. C. and Clayton, C.** (2005). RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. *Eukaryot Cell* **4**, 2106-14.
- De Gaudenzi, J. G., D'Orso, I. and Frasch, A. C.** (2003). RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific

transcripts in vivo. *J Biol Chem* **278**, 18884-94.

De Lange, T., Berkvens, T. M., Veerman, H. J., Frasch, A. C., Barry, J. D. and Borst, P. (1984). Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res* **12**, 4431-43.

De Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* **8**, 269-85.

Di Noia, J. M., D'Orso, I., Sanchez, D. O. and Frasch, A. C. (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem* **275**, 10218-27.

Duhagon, M. A., Dallagiovanna, B. and Garat, B. (2001). Unusual features of poly[dT-dG].[dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 98-103.

Duncan, R. (2004). DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol* **20**, 211-5.

Elias, M. C. and Faria, M. (2009). Are there epigenetic controls in *Trypanosoma cruzi*? *Ann N Y Acad Sci* **1178**, 285-90.

Evers, R., Hammer, A., Kock, J., Jess, W., Borst, P., Memet, S. and Cornelissen, A. W. (1989). *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. *Cell* **56**, 585-97.

Furger, A., Schurch, N., Kurath, U. and Roditi, I. (1997). Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol* **17**, 4372-80.

Gerber, A. P., Herschlag, D. and Brown, P. O. (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* **2**, E79.

Gilinger, G. and Bellofatto, V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* **29**, 1556-64.

Grodberg, J. and Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**, 1245-53.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R. and Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* **36**, W70-4.

Haile, S. and Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* **10**, 569-77.

Hertz-Fowler, C., Peacock, C. S., Wood, V., Aslett, M., Kerhornou, A., Mooney, P., Tivey, A., Berriman, M., Hall, N., Rutherford, K. et al. (2004). GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucl. Acids Res.* **32**, D339-343.

Hinman, M. N. and Lou, H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3168-81.

Ivens, A. C. Peacock, C. S. Worthey, E. A. Murphy, L. Aggarwal, G. Berriman, M. Sisk, E. Rajandream, M. A. Adlem, E. Aert, R. et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436-42.

Keene, J. D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**, 533-43.

Kelly, J. M., Ward, H. M., Miles, M. A. and Kendall, G. (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* **20**, 3963-9.

- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L. and Beverley, S. M.** (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev* **7**, 996-1007.
- Lunde, B. M., Moore, C. and Varani, G.** (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 479-90.
- Maris, C., Dominguez, C. and Allain, F. H.** (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* **272**, 2118-31.
- Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martinez, L. E., Manning-Cela, R. G. and Figueroa-Angulo, E. E.** (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 525241.
- McCarthy, J. E.** (1998). Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1492-553.
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, J., 3rd, Orlando, R. and Tarleton, R. L.** (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **10**, 370.
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Omura, S. and Kita, K.** (2009). Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric lp subunit. *J Biol Chem* **284**, 7255-63.
- Morking, P. A., Dallagiovanna, B. M., Foti, L., Garat, B., Picchi, G. F., Umaki, A. C., Probst, C. M., Krieger, M. A., Goldenberg, S. and Fragoso, S. P.** (2004). TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 169-77.
- Noe, G., De Gaudenzi, J. G. and Frasch, A. C.** (2008). Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol* **9**, 107.
- Norton, P. A.** (1994). Polypyrimidine tract sequences direct selection of alternative branch sites and influence protein binding. *Nucleic Acids Res* **22**, 3854-60.
- Nozaki, T. and Cross, G. A.** (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **75**, 55-67.
- Parisi, M. and Lin, H.** (2000). Translational repression: a duet of Nanos and Pumilio. *Curr Biol* **10**, R81-3.
- Pays, E., Vanhamme, L. and Berberof, M.** (1994). Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* **48**, 25-52.
- Perez-Diaz, L., Duhagon, M. A., Smircich, P., Sotelo-Silveira, J., Robello, C., Krieger, M. A., Goldenberg, S., Williams, N., Dallagiovanna, B. and Garat, B.** (2007). *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of an RNA binding protein differentially expressed in the parasite life cycle. *Exp Parasitol*.
- Pitula, J., Ruyechan, W. T. and Williams, N.** (1998). *Trypanosoma brucei*: identification and purification of a poly(A)-binding protein. *Exp Parasitol* **88**, 157-60.
- Queiroz, R., Benz, C., Fellenberg, K., Hoheisel, J. D. and Clayton, C.** (2009). Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. *BMC Genomics* **10**, 495.
- Quijada, L., Guerra-Giraldez, C., Drozd, M., Hartmann, C., Irmer, H., Ben-Dov, C., Cristodero, M., Ding, M. and Clayton, C.** (2002). Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **30**, 4414-24.

- Sambrook, J., Frisch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Shaw, J. M., Feagin, J. E., Stuart, K. and Simpson, L.** (1988). Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell* **53**, 401-11.
- Simpson, L.** (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **41**, 363-82.
- Smith, J. L., Levin, J. R., Ingles, C. J. and Agabian, N.** (1989). In trypanosomes the homolog of the largest subunit of RNA polymerase II is encoded by two genes and has a highly unusual C-terminal domain structure. *Cell* **56**, 815-27.
- Souza, W.** (2008). Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**, 313-25.
- Stern, M. Z., Gupta, S. K., Salmon-Divon, M., Haham, T., Barda, O., Levi, S., Wachtel, C., Nilsen, T. W. and Michaeli, S.** (2009). Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. *RNA* **15**, 648-65.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- Sturm, N. R. and Simpson, L.** (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* **61**, 879-84.
- Talice, R. V., Salvatella, R., Basmadján, Y., Calegari, L., Lena, A., Bulla, D., Sarasua, M. W., Cerecetto, H., González, M., Gambino, D., Otero, L., Pieñeyro, M. D., Parodi, A., Robello, C., Piacenza, L., Alvarez, M. N., Irigoín, F., Peluffo, G., Radi, R., Comini, M., Medeiros, A., Manta, B., Ortiz, C., Boiani, M., Tórtora, V., Thomson, L., Denicola, A., Duhagón, M., Pérez-Díaz, L., Pastro, L., Dallagiovanna, B., Garat, B., García-Silva, M.R., Tosar, J.P., Bonilla, B., Cayota, A., Panzera, F., Panzera, Y., Ferrandis, I., Ferreiro, M. J., Calleros, L., Pérez, R., .** (2009). A 100 años del Descubrimiento de la Enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay. Montevideo.
- Thomson, A. M., Rogers, J. T., Walker, C. E., Staton, J. M. and Leedman, P. J.** (1999). Optimized RNA gel-shift and UV cross-linking assays for characterization of cytoplasmic RNA-protein interactions. *Biotechniques* **27**, 1032-9, 1042.
- Tyler, K., Olson, C. and Engman, D.** (2002). The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. In *World Class Parasites: Volume 7. American Trypanosomiasis*, vol. 7 eds. K. Tyler and M. MA), pp. 1-11. Chicago. USA: Kluwer Academic Publishers.
- Ullu, E., Matthews, K. R. and Tschudi, C.** (1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* **13**, 720-5.
- Ullu, E., Tschudi, C. and Chakraborty, T.** (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* **6**, 509-19.
- Vanhamme, L. and Pays, E.** (1995). Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* **59**, 223-40.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-9.
- Wurst, M., Robles, A., Po, J., Luu, V. D., Brems, S., Marentije, M., Stoitsova, S., Quijada, L., Hoheisel, J., Stewart, M. et al.** (2009). An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **163**, 61-5.

Young, R. A. (1991). RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **60**, 689-715.