

PEDECIBA
Area Biología

TESIS DE MAESTRIA

**Análisis de interacciones específicas entre
motivos poli (dT-dG) y poli (dC-dA) y
proteínas nucleares de epimastigotas de
T. cruzi.**

Lic. María Ana Duhagon

Orientadora: Dra. Beatriz Garat

Co-Orientador: Dr. Bruno Dallagiovanna

TRIBUNAL:

Dr. Ricardo Ehrlich (Presidente)

Dra. Elia Nunes (Vocal)

Dr. Carlos Robello (Vocal)

Sección Bioquímica

Facultad de Ciencias

Iguá 4225.

Montevideo. Uruguay

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	2
CARACTERÍSTICAS DE LA DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA.....	3
Almacenamiento de la información genética en <i>T. cruzi</i>	4
Transcripción.....	5
Procesamiento del ARN y control de la expresión a nivel post-transcripcional para los genes nucleares.....	6
Proteínas de unión al ADN.....	10
Interacciones ADN-proteínas.....	11
EL LOCUS H.....	11
LOS DINUCLEÓTIDOS EN EL GENOMA DE <i>T. cruzi</i>	12
HIPÒTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Análisis computacional.....	16
Parásitos.....	17
Oligonucleótidos y sondas.....	18
Preparación de extractos nucleares.....	18
Tratamientos con ADNasa, ARNasa y proteinasa K.....	19
Marcado de las sondas de ADN.....	19
Reacción de unión y ensayo en gel de retardo (EMSA).....	20
Cromatografía.....	21
Southwestern blot.....	23
RESULTADOS.....	25
Cultivo de parásitos y obtención de extractos nucleares.....	25
Interacciones entre extractos nucleares y la secuencia intergénica de <i>ptr-1</i>	26
Análisis de la frecuencia y ubicación de poli dinucleótidos en el genoma de <i>T. cruzi</i>	28
Caracterización de los complejos específicos entre las sondas poli [dT-dG] ₁₅ y poli [dC-dA] ₁₅ y los extractos nucleares de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	36
Determinación de parámetros fisicoquímicos funcionales de los complejos específicos.....	42
Purificación de las proteínas que intervienen en la formación de los complejos específicos.....	45
DISCUSIÓN.....	50
La secuencia intergénica de <i>ptr-1</i> contiene señales que son reconocidas por factores presentes en los extractos nucleares de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	50
Los repetidos dinucleotídicos poli [dT-dG] _n presentan una frecuencia y ubicación peculiar en el genoma de <i>T. cruzi</i>	52
Los repetidos poli [dT-dG] _n y poli [dC-dA] _n son blancos específicos para proteínas de unión a hebra simple.....	53
Existen proteínas capaces establecer este tipo de interacciones en otras cepas de <i>T. cruzi</i> , en <i>T. brucei</i> y en otras especies.....	55
Los complejos específicos presentan propiedades fisicoquímica comparables a las descritas para proteínas reguladoras de la expresión génica.....	56
Una proteína de 40 kDa podría formar parte de los complejos específicos estudiados.....	57
Especulaciones acerca del posible rol de estos complejos.....	58
Conclusiones.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

RESUMEN:

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, que constituye actualmente un importante problema para la salud en América Latina. Los mecanismos de regulación de la expresión génica en los tripanosomátidos son muy peculiares y permanecen sin ser bien comprendidos. La transcripción policistrónica, característica en este grupo, determina que la regulación de la expresión génica se produzca principalmente a nivel post-transcripcional. Las proteínas responsables de estos procesos interactúan con secuencias contenidas en las regiones intergénicas. El objetivo de esta tesis fue la búsqueda y el análisis de interacciones ácidos nucleicos-proteínas en la región intergénica del *locus* H de *T. cruzi*. En este trabajo identificamos interacciones específicas entre proteínas nucleares de epimastigotas y unas secuencias dinucleotídicas repetidas poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅. La abundancia y localización de estos elementos en las regiones intergénicas de *T. cruzi*, y las funciones que han sido propuestas para ellos en otros organismos sugieren su participación en la regulación de la expresión génica. A través del ensayo en geles de retardo caracterizamos la especificidad y estabilidad de estos complejos. Las propiedades fisicoquímicas determinadas son comparables a las descritas para factores proteicos reguladores de la expresión. Resulta interesante señalar que en diferentes cepas de *T. cruzi* se observan complejos similares. Asimismo, los elementos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n también son reconocidos por factores presentes en extractos nucleares de *T. brucei*, así como de otras especies distantes. Por último, mediante cromatografías de afinidad logramos la purificación parcial de una proteína de 40kDa que es capaz de establecer interacciones con el ADN en hebra simple y que podría ser responsable de la formación de alguno de estos complejos. Teniendo en cuenta las diferentes funciones que han sido propuestas para los repetidos de dinucleótidos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n, los resultados aquí presentados sugieren que los complejos caracterizados podrían ser de relevancia para la biología de este parásito.

INTRODUCCIÓN

LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La **tripanosomiasis** americana o enfermedad de Chagas es una zoonosis tropical causada por *Trypanosoma cruzi*. Esta parasitosis tiene una amplia distribución en América Central y del Sur donde es endémica en 21 países, con 16-18 millones de personas infectadas y 100 millones en riesgo de contraerla (últimos datos epidemiológicos de la OMS, 1998).

La enfermedad de Chagas presenta dos fases en su evolución clínica. Una fase aguda que comprende los dos primeros meses de infección y se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables y por parasitemias más altas que en la fase crónica. Mayormente pasa desapercibida y en algunos casos los síntomas van desde estado febril e inflamación en la zona del ingreso del parásito (Chagoma en la piel y/o "signo de Romaña" en la membrana ocular) hasta la muerte del huésped. Los síntomas generalmente desaparecen a los pocos meses y la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica con parasitemia baja y asintomática. En el 30-40% de los casos se desarrollan síndromes chagásicos (miocardiopatía, megacolon, megaesófago) mientras que el resto de los casos desarrollan la forma indeterminada o asintomática.

Trypanosoma cruzi pertenece a la clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastidae, Género Trypanosomatidae, subgénero Schizotrypanum. Su ciclo de vida transcurre entre dos huéspedes: uno invertebrado, el insecto triatomino o vinchuca (*Triatoma infestans* y *Triatoma rubrovaria* en nuestro país), y otro vertebrado (huésped mamífero) (Figura 1). El parásito presenta tres formas o estadios principales, relacionados con sus distintos entornos: la forma epimastigota replicativa, en la luz del intestino del insecto, la forma tripomastigota no replicativa, que es la forma infectiva, y habita la ampolla rectal del insecto, y la forma amastigota replicativa, que se desarrolla dentro de las células del huésped mamífero. Cuando el triatomino ingiere sangre del vertebrado, deposita las heces contaminadas con tripomastigotas, que pueden ingresar al huésped vertebrado a través de una solución de continuidad. Luego alcanzan el torrente sanguíneo desde donde pueden invadir varios tipos celulares (principalmente células del sistema fagocítico mononuclear, células musculares y células nerviosas). Una vez dentro de la célula los tripomastigotas se transforman en amastigotas. Unas 12 horas antes de la liberación de la célula, comienzan a sufrir una transformación hacia tripomastigota, que es la forma que

circula por la sangre. Cuando la sangre del huésped vertebrado es ingerida por un triatomino, los trypanosomas pasan al intestino de la vinchuca donde se transforman en epimastigotas, comenzando un nuevo ciclo (Pinto Días, 1991). Si bien morfológica y biológicamente similares, podemos distinguir entre el estadio tripomastigota metacíclico que se diferencia a partir de los epimastigotas siendo eliminado con las heces del insecto, y el tripomastigota que se produce en la corriente sanguínea a partir de los amastigotas.

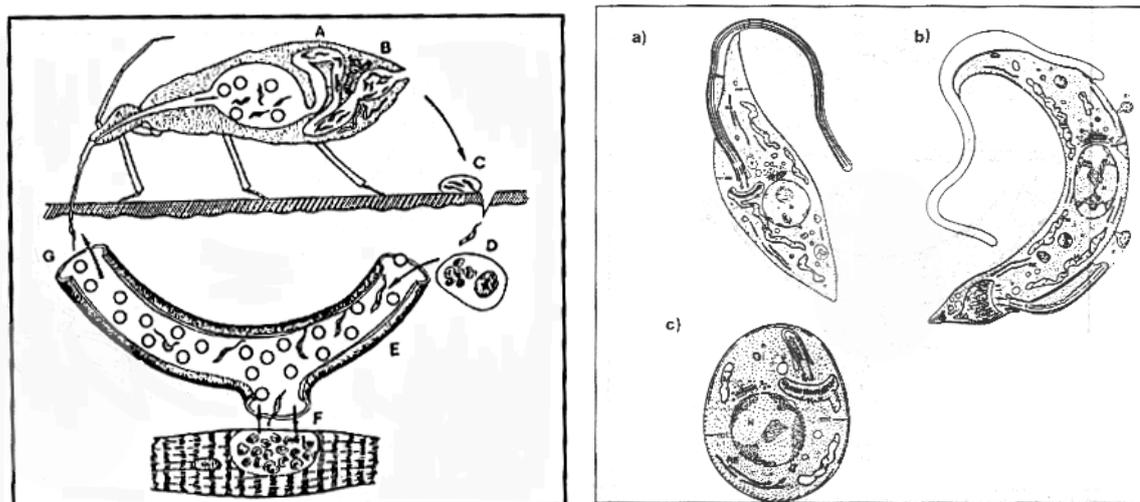


Figura 1. Cuadro izquierdo. Esquema representando el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Los *trypanosomas* en el estadio amastigota se replican en el intestino del insecto (A); en la ampolla rectal (B) se transforman en tripomastigotas metacíclicas, que son eliminados por las heces (C); al penetrar en el huésped vertebrado los parásitos invaden células del sistema fagocítico mononuclear cutáneo (D) donde, bajo la forma de amastigotas comienzan a multiplicarse. Al estallar la célula pasan a la sangre como tripomastigotas (E), diseminándose por el organismo e invadiendo músculos y otros tejidos (F). El ciclo se cierra cuando la sangre del paciente es ingerida por el insecto. **Cuadro derecho.** Esquema de tres de los estadios del parásito. A. Formas epimastigotas, B. Formas tripomastigotas, C. Formas amastigotas. F: flagelo; G: aparato de Golgi; N: núcleo; RE: retículo endoplásmico; K: mitocondria; M: prolongaciones de la mitocondria con doble membrana y crestas mitocondriales.

CARACTERÍSTICAS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN LOS TRIPANOSOMÁTIDOS.

Los flagelados aparecieron en la tierra hace aproximadamente 1.5 billones de años (Woese y col., 1990), y tal vez como resultado de esta distancia filogenética presentan características biológicas excepcionales comparados con otros eucariotas. En lo que se relaciona con la regulación de la expresión génica hasta el 25% del ácido desoxirribonucleico (ADN) celular total se encuentra en una gran mitocondria única denominada *kinetoplasto* (Dvorak y col., 1990). Los transcriptos mitocondriales pueden ser

modificados hasta en un 50% por la adición de uridinas a través de un mecanismo conocido como “*editing*” o edición (Shaw y col., 1988). La *envoltura nuclear* es conservada durante la división celular y el huso mitótico se forma en el núcleo. Además la cromatina no se condensa hasta cromosomas (De Souza & Meyer, 1974). La transcripción policistrónica y la adición de una secuencia conservada (el miniexón) en los extremos 5’ de los mensajeros individuales por un mecanismo denominado *trans-splicing*, también son mecanismos peculiares característicos de este grupo.

Almacenamiento de la información genética en *T. cruzi*

Como sucede en los eucariotas, el ADN de los tripanosomátidos se almacena en dos compartimientos celulares : el núcleo y la mitocondria. Sin embargo dentro de la mitocondria el ADN está organizado de un modo bastante peculiar en dos tipos de estructuras con funciones diferentes: los maxicírculos y los minicírculos. Estas estructuras circulares de ADN se encuentran concatenadas formando una red altamente compleja observable al microscopio electrónico (Chen y col, 1995). Los maxicírculos tiene una tamaño de 40 kb aproximadamente, encontrándose en un número de 20 a 50 por organelo. Ellos contienen los genes codificantes para las proteínas y los ARNs ribosomales, constituyendo el equivalente al ADN mitocondrial de los eucariotas. Los minicírculos tienen un tamaño de 1.4 kb y están en número de alrededor de 30.000 por parásito. Contienen las secuencias codificantes para los ARNs guías necesarios para la corrección de los transcritos mitocondriales (Stuart, 1991; Simpson, 1997).

El tamaño del genoma de *T. cruzi* está estimado entre 100 y 200 Mb variando según el clon estudiado (Henriksson y col., 1996). El 51% del ADN corresponde a secuencias medianamente repetidas, el 23 % a secuencias de copia única y el resto a secuencias altamente repetidas (Castro y col., 1981). Los genes medianamente repetidos suelen presentar una organización en tándem, pudiendo estar esta unidad de repetidos presente en uno o varios cromosomas.

No se ha podido determinar el número exacto de cromosomas de *T. cruzi*, debido a su falta de condensación. Sin embargo a través de electroforesis de campo pulsado sabemos que existe un importante polimorfismo en tamaño y número de cromosomas entre los distintos clones (Henricksson y col., 1990), siendo el número superior a 40, y el tamaño cromosómico entre 0.45 y 4 Mb (Henriksson y col.,1996). La ploidía de este organismo permanece aún sin aclararse; se ha sugerido aneuploidía (McDaniel & Dvorak, 1993) y diploidía (Henricksson y col., 1990).

Transcripción

A diferencia de lo que sucede en la mayoría de los eucariotas, en los tripanosomátidos la expresión de los genes nucleares que codifican proteínas ocurre por **transcripción policistrónica** (Vanhamme & Pays, 1995). Existen regiones de densos agrupamientos de genes que se transcriben en una única molécula de premensajero.

La mayor parte de la investigación en biología molecular de tripanosomátidos se ha realizado en *T. brucei*, el parásito causante de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana. Dada las estrechas relaciones evolutivas y las concomitantes semejanzas fisiológicas y morfológicas entre los kinetoplastídeos parásitos resulta significativo tratar la biología molecular de estos organismos como grupo.

El control del inicio de la transcripción es quizás uno de procesos menos comprendidos entre los que determinan la expresión génica en los tripanosomátidos. Dos grupos de genes de *T. brucei*, los de las glicoproteínas variables de la superficie (VSG) y los de las proteínas acídicas repetitivas (PARP), se encuentran claramente regulados a nivel de la transcripción. Estos genes representan genes codificantes para proteínas que son transcritos por una ARN polimerasa tipo I (resistente a la alfa amanitina), un fenómeno únicamente descrito en los protozoarios kinetoplastídeos (Lee & Van der Ploeg, 1997). Se ha establecido el control a nivel del inicio de la transcripción para los genes de los ARN ribosomales (ARNr), también transcritos por esta polimerasa.

En los tripanosomátidos, los sitios de expresión de los genes VSG y PARP parecen depender fuertemente del contexto cromosómico en el que se encuentren sus promotores. Este contexto es particularmente importante en la determinación de la inactivación de los sitios de expresión que es disparada por efectos posicionales cuyos mecanismos no son bien conocidos aún (Cross y col., 1998; Hotz y col., 1998).

Hasta ahora se han reportados muy pocos promotores para la ARN polimerasa II en los kinetoplastídeos (Ben Amar y col., 1991; Wong y col., 1994; Lee, 1996). Sin embargo, su capacidad para incrementar la probabilidad de inicio de la transcripción no es muy clara. El hecho de que varias regiones intergénicas sean capaces de promover la transcripción en las dos hebras oscurece estos resultados. Más aún, los vectores de expresión comúnmente usados en *T. cruzi* utilizan regiones intergénicas delante del sitio de clonación (Teixeira, 1998) para promover la expresión. Si bien estas

regiones intergénicas muestran actividad promotora, no se ha encontrado ningún elemento promotor clásico en ellas.

Recientemente se comunicó que el cromosoma 1 de *Leishmania major* posee dos únicas unidades de transcripción orientadas “cabeza a cabeza” con absoluta polaridad de hebra, que contienen a todos los genes codificantes para proteínas (Myler, y col., 1999). Esta situación es también observada en el contig de 93.4kb del cromosoma 3 de *T. cruzi*, que constituye la secuencia más larga hasta el momento publicada (Andersson, y col., 1998). Estas evidencias hacen pensar en dos posibles explicaciones para el inicio de la transcripción. Una posibilidad sería la existencia de un promotor para la ARN polimerasa II delante de cada unidad de transcripción. Otra posibilidad sería que la transcripción comenzara de algún modo azaroso en múltiples sitios de baja afinidad a lo largo del cromosoma. La ubicación y estructura de los posibles promotores permanece aún sin ser dilucidada.

Procesamiento del ARN y control de la expresión a nivel post-transcripcional para los genes nucleares

En estos organismos no se habían observado intrones; sin embargo recientemente se reportó que los genes de la poli A polimerasa en *T. brucei* y en *T. cruzi*, se encuentran intervenidos por una secuencia de 653 y 302 nucleótidos respectivamente y son procesados por un mecanismo de cis-splicing (Mair y col., 2000). Los genes contenidos en largos ARNs policistrónicos son procesados por la adición de un miniexón en el extremo 5´ y la poliadenilación del extremo 3´ dando lugar a los ARN mensajeros (ARNm) individuales.

Trans-splicing

Todos los ARNm de tripanosomátidos caracterizados hasta el momento presentan una secuencia llamada mini-exón o “spliced leader” en el extremo 5´. Esta secuencia tiene 39 nucleótidos en *T. cruzi*. (De Lange y col., 1984). El “*trans-splicing*” es una reacción intermolecular de procesamiento del ARN en la que dos moléculas de ARN diferentes, el “sequence leader” (SL) y el pre-mensajero policistrónico, se unen para formar

un ARN maduro. El miniexón, que representa el extremo 5' del mensajero del gen del SL, se une al sitio aceptor de splicing ubicado en la región 5' del gen que va a ser procesado (Figura 2). Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente y es fundamental para la traducción correcta de los mensajeros.

La maquinaria que participa en este fenómeno se denomina ayustosoma o spliceosoma. Si bien no está completamente caracterizada, se conocen los ARN pequeños nucleares que participan en este proceso. Se supone que su estructura es similar a la descrita en los eucariotas superiores, donde participan un grupo de proteínas y ARNs nucleares de pequeño tamaño (ARNsn) homólogos a los que intervienen en el *cis*-splicing en eucariotas superiores (Ullu y col., 1996).

También se ha observado procesamiento alternativo entre sitios distantes. En algunos casos, la abundancia de polipirimidinas en los sitios de splicing podría estar determinando la eficiencia relativa del procesamiento y por lo tanto la abundancia de su ARNm (Ullu y col., 1996).

Poliadenilación

En tripanosomátidos el proceso de poliadenilación es similar al del resto de los eucariotas e implica la participación de una endonucleasa específica que corta el pre-mensajero en su extremo 3'. La enzima poli A polimerasa incorpora adenosina a expensas de ATP. Este evento es un importante punto de regulación de la estabilidad de los mensajeros y por tanto es importante en el establecimiento de la abundancia de los ARNm. No se conoce exactamente la secuencia que actúa como señal de poliadenilación en *T. cruzi*. Se han purificado proteínas de unión a la secuencia poli A en *T. cruzi* y en *T. brucei* (Pitula y col., 1998; Texeira y col., 1994). Por otro lado, varios trabajos han demostrado que los fenómenos de *trans*-splicing y poliadenilación están acoplados temporal y espacialmente, produciéndose primero la adición del miniexón y siendo la señal aceptora del mismo la que determina la poliadenilación del extremo 3' del gen situado corriente arriba (Hug y col., 1993, Lebowitz y col., 1993). Se ha demostrado que un trecho de polipirimidinas gobierna tanto la poliadenilación de los genes corriente arriba como el *trans*-splicing de los genes corriente abajo (Schurch y col., 1994).

Regulación

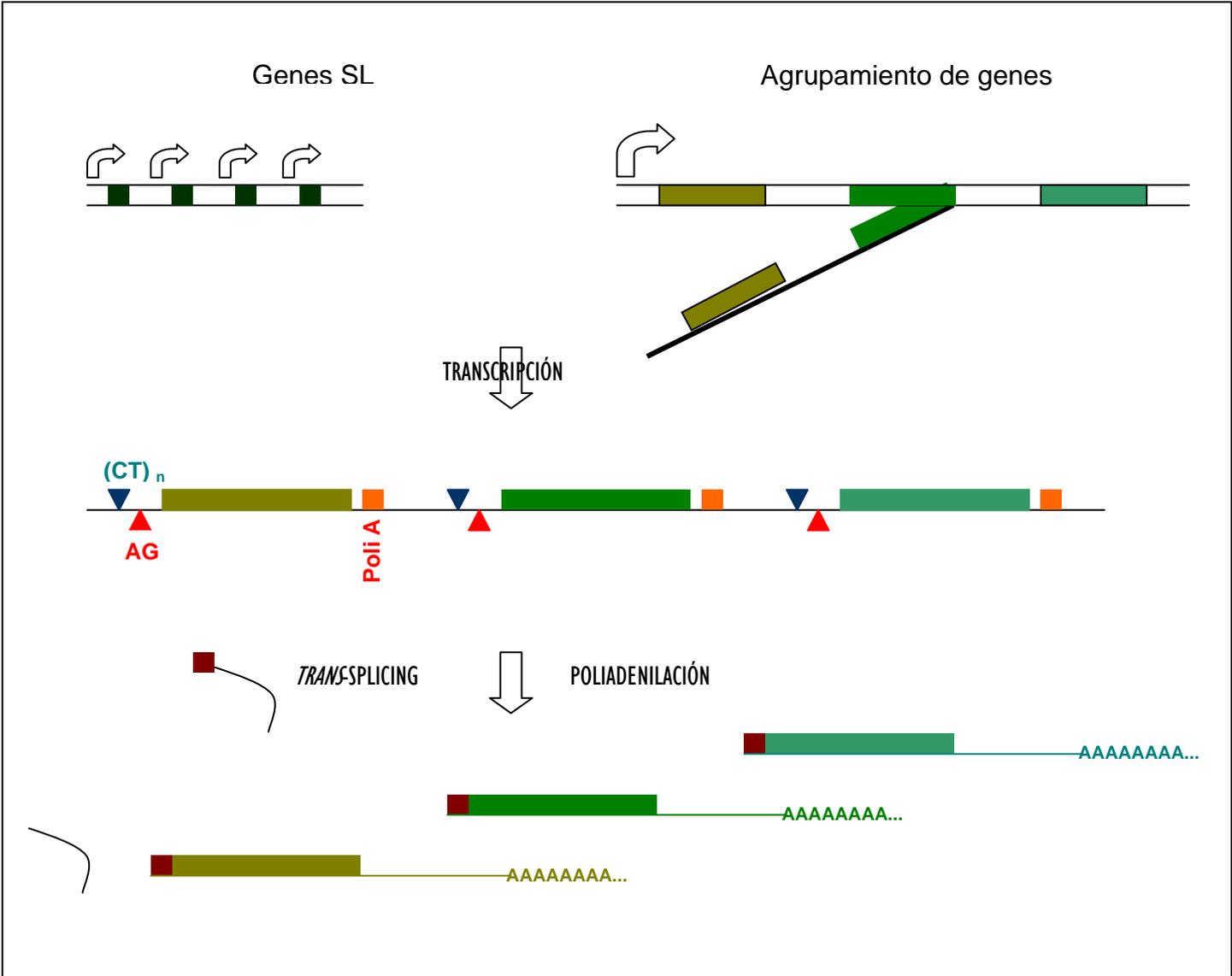
A pesar de su transcripción primaria común, los genes individuales que pertenecen a la misma unidad de transcripción policistrónica muestran diferentes patrones de expresión, por ende, la *regulación* de la expresión génica en los tripanosomátidos opera principalmente a nivel *post-transcripcional*. Los genes codificantes para proteínas están ordenados en largas unidades de transcripción a partir de las cuales se generan los ARNm individuales.

Las regiones no traducidas (UTR) de los mensajeros están involucradas en los mecanismos de regulación post-transcripcional, siendo probablemente blancos de proteínas regulatorias. Con una única excepción, el gen de la *hsp83*, donde la región reguladora está en el 5' UTR (Aly y col., 1994), son las regiones 3' UTR las que confieren la especificidad de expresión de estadio (Nozaki y col., 1995; Teixeira y col., 1998). Muy recientemente se ha sido descrito en *T. cruzi* un elemento rico en nucleótidos A y U en el 3' UTR de los genes de las mucinas, que modula la estabilidad y eficiencia de traducción de los mensajeros (Di Noia y col., 2000).

Se ha demostrado que parte del control de la expresión de los genes VSG de *T. brucei* ocurre a nivel de la elongación del ARN (Vanhamme y col., 2000).

En tripanosomátidos no ha habido aún evidencias de que la exportación del núcleo al citoplasma intervenga en el control de la expresión durante el desarrollo. Existen sí datos indirectos acerca del control traduccional: la probabilidad de traducción de los mensajeros estaría mediada por elementos presentes en el 3' UTR de los genes de las prociclinas (Hotz y col., 1998). Por último, la estabilidad de los productos proteicos de algunos genes podría ser también un mecanismo del control de la expresión (Torri y col., 1993; Priest y col., 1994).

Figura 2. Proceso general de maduración de los ARNm en los tripanosomátidos. La mayoría de los genes de los tripanosomátidos están organizados en grupos. Cada gen se indica como un rectángulo coloreado. En otras ubicaciones cromosómicas hay varios cientos de repetidos directos en tandem que codifican para los ARNm del SL; estos se indican como cuadrados coloreados en la parte superior izquierda de la figura. Un posible sitio de inicio de la transcripción (↷) se encontraría 5' respecto al primer gen del agrupamiento. En el caso del SL, cada repetido parece tener su propio promotor. Después de la transcripción, los pre-ARNm policistrónicos son procesados por *trans*-splicing y poliadenilación, lo que requiere de señales presentes en las regiones intergénicas: una secuencia polipirimidina (C,T)_n (▼), el sitio de adición del miniexón o AG (▲), y el sitio de poliadenilación (■). Los ARNm maduros, que consisten en la secuencia del miniexón (■) el UTR en el 5', la región codificante, el 3' UTR y la cola poli A están representados en el diagrama.



Proteínas de unión a ácidos nucleicos.

En los últimos años se han identificado varias proteínas de unión al ADN en los tripanosomátidos. Algunas de ellas tienen funciones estructurales en el ADN. Por ejemplo se han caracterizado todas las histonas de las principales especies de kinetoplastídeos. Usando técnicas de crosslinking, se han encontrado un número de proteínas ricas en lisina que están involucradas en la condensación y el empaquetamiento del ADN en el kinetoplasto (Xu y col., 1996). Con el ADN de este organelo se han copurificado pequeñas proteínas en *Crithidia fasciculata* (Tittawella, 1993).

Por otro lado se han encontrado proteínas que establecen interacciones con el ADN y que están probablemente vinculadas a la regulación de la expresión. Como resultado del rastreo de una biblioteca de expresión se encontró una proteína de unión a la secuencia específica en hebra simple hexámero (HEXBP) que contiene nueve residuos de cisteína con una organización del tipo dedos de Zinc "CCHC" en *Leishmania major* (Webb & McMaster, 1993) y una proteína tipo HMG que reconoce el elemento octámero (Oct1) en el ADN en doble hebra en *T. brucei* (Erondu & Donelson, 1992).

Del mismo modo se han identificado un número de proteínas de unión al ARN que están involucradas en la biogénesis y la utilización de este ácido nucleico. A través de aproximaciones inmunológicas se ha identificado un homólogo a la proteína ribosomal L25 (Metzenberg y col., 1993). Por otro lado, se ha demostrado que un grupo de proteínas tirosín fosforiladas que contienen el motivo RGG (entre ellas Nopp44/46) y que están reguladas en el desarrollo, tienen ubicación nucleolar (Das y col., 1996; Parsons y col. 1994). También se han purificado y secuenciado proteínas de unión al poli A tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei* (Pitula y col., 1997; Batista y col., 1994).

Asimismo, se han caracterizado un grupo de proteínas que intervienen en el splicing. Entre ellas, se identificó la fibrilarina, que se une al U3 sn ARN (Hartshorne & Agabian, 1993) y un grupo de proteínas de unión a ARNs (Palfi & Bindereif, 1992). Se han identificado una proteína nuclear, RRM1 (Manger & Boothroyd, 1998) y una que contiene el dominio SR (Ismaili y col., 2000), que presentan homología con RNABPs del sistema de *cis*-splicing. Por último se ha reportado el aislamiento, clonación y la expresión de dos proteínas de unión a ARN, p34 y p37, que están además reguladas durante el desarrollo y se localizan en el núcleo (Zhang y col., 1998).

Interacciones ácidos nucleicos-proteínas.

Por medio del análisis del cambio en la migración electrororética de los ácidos nucleicos (ensayo en gel de retardo o EMSA) se han detectado interacciones entre proteínas nucleares y los promotores tipo ARN polimerasa I, de los genes para ARNr, VSG y PARP cuando el ADN se encuentra en forma de hebra simple (Vanhamme & Pays, 1995). Esto podría implicar que se necesita que el ADN esté abierto para iniciar la transcripción. También se ha encontrado actividad de unión al promotor del gen VSG en forma de doble hebra en extractos nucleares de la forma sanguínea (Pham y col., 1997). Recientemente se ha comunicado que una proteína de 40 kDa se une a ADN en hebra simple de las regiones ricas en C de los repetidos teloméricos, del promotor de VSG y del terminador de la transcripción de *T. brucei* (Beberof M. y col., 2000). Estas evidencias apuntan a un papel particularmente relevante de las proteínas de unión a ADN en hebra simple a nivel de la transcripción.

Por lo menos dos regiones ubicadas en el promotor de los genes para el SL ARN son esenciales para la transcripción en células transfectadas en forma estable. Se han identificado proteínas que se unen al elemento proximal en *T. cruzi*, a los dos elementos distales de *Leptomonas seymouri*, y a la secuencia distal de *Leishmania tarantolae*, siempre en forma de doble hebra (Campbell y col., 2000).

EL LOCUS H

El *locus* H de *Leishmania* es una región que contiene varios genes que confieren resistencia a drogas. Esta región, de entre 68-85 kb, resulta amplificada (incrementa el número de copias) frente a la presión con un fármaco: el metotrexato. Este amplicón es capaz de conferir resistencia a esta droga además de otras, al parecer, por mecanismos diversos (Coderre y col., 1983).

En *Trypanosoma cruzi* existe una región del tipo “*locus* H” porque contiene genes homólogos a los del *locus* H de *Leishmania*, que también están involucrados en la resistencia a fármacos. Estos genes incluyen una *p*-glicoproteína que es un transportador del tipo ABC (gen *tcgp2*) y tiene identidad de secuencia con el gen *pgp A* de *Leishmania*; su mensajero poliadenilado se observa sólo en las formas replicativas y no se ha demostrado que su producto intervenga en la resistencia a fármacos (Dallagiovanna y col.,

humanos por ejemplo representan quizás 10% o más del genoma. Independientemente de su origen y/o dinámica se ha sugerido que los repetidos (especialmente los de periodicidades cortas) en sí mismos, producirían estructuras particulares en el ADN, alterarían la estructura de la cromatina y/o constituirían sitios de unión de factores proteicos (Hamada y col., 1984). Hasta ahora la mayoría de la investigación ha recaído sobre los repetidos de patrones cortos (2-5 nucleótidos), presumiblemente porque son relativamente sencillos de detectar a simple vista en las secuencias. Además recientemente han sido objeto de especial atención porque se han encontrado varias enfermedades hereditarias causadas por la amplificación de repetidos trinucleotídicos. Por otro lado, los repetidos en tándem se utilizan mucho actualmente como marcadores de polimorfismos (Edwards y col., 1992).

Recientemente se publicó la secuencia completa de un contig del cromosoma 3 de la cepa CL Brener de *T. cruzi*. En ese trabajo se resalta el hecho de que las secuencias intergénicas son ricas en repetidos de di y trinucleótidos de varios largos, aunque no se realiza ninguna especulación acerca de su función (Andersson y col., 1998).

Nosotros nos preguntamos si esos repetidos, en particular los trechos (dT-dG)_n o (dC-dA)_n, que son llamativamente abundantes en la región intergénica de *ptr-1*, podrían constituir blancos específicos para proteínas nucleares. Hasta el momento se han identificado elementos del tipo (dT-dG)_n(dC-dA)_n, como sitios de reconocimiento del sistema de recombinación, particularmente para la proteína RecA (Dutreix, 1997; Tracy y col., 1997). Estas secuencias también se han visto en elementos reguladores de la transcripción, tal como sitios de terminación a los que se unen factores específicos (Hong y col., 1997) o en elementos que son reconocidos por factores relacionados a la familia Sp1 (Gory y col., 1998). Dada la conservación de su localización cromosómica y su capacidad de adoptar conformación Z (Pardue y col., 1987) se ha postulado también que tendrían roles en el establecimiento de la estructura y función de la cromatina. Por último se ha demostrado que estas secuencias son capaces de incrementar la transcripción cuando se colocan 5' de un gen testigo expresado en células HeLa (Hamada y col., 1984). Asimismo, los tramos poli(dT-dG). poli(dC-dA) son capaces de formar estructuras en hélices cuádruples que son reconocidas por proteínas nucleares del grupo de alta movilidad (HMG1 y 2) (Gaillard & Strauss, 1994).

La presencia de trechos poli(dT-dG)_n en las regiones intergénicas del *locus* H y del cromosoma 3, los antecedentes del rol de estas secuencias en otros organismos y la comprensión de que son las regiones intergénicas las que contienen las señales que

dirigen a las proteínas responsables de regulación de la expresión génica, llevan a preguntarse acerca de un posible papel de estas secuencias como elementos de reconocimiento específico de factores proteicos.

En conclusión, aunque hay cada vez más información acerca de las proteínas que establecen interacciones con el ADN regulando la expresión génica en los tripanosomátidos, estamos todavía lejos de comprender las bases moleculares de estos procesos. No conocemos la totalidad de los componentes básicos de la maquinaria de splicing, ni de la transcripción, ni tampoco los factores responsables de la expresión estadio específica o de la expresión diferencial de los genes. Dada la dificultad en encontrar promotores en estos organismos, la capacidad de las regiones intergénicas de promover fuertemente la transcripción y el control de la expresión fundamentalmente post-transcripcional, las señales para los factores que intervienen en estos procesos deben estar contenidas en las regiones intergénicas. Con estos antecedentes, en este trabajo intentamos contribuir a la comprensión de la información contenida en las secuencias intergénicas de *T. cruzi* y de los mecanismos que éstas median. Para ello nos propusimos la búsqueda e identificación de interacciones específicas entre el ADN de las regiones intergénicas de *T. cruzi* y proteínas nucleares.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de trabajo sostuvo que existen proteínas que interaccionan específicamente con la región intergénica del *locus* H estudiada, y que estas interacciones pueden ser de relevancia para la biología del parásito, en particular, para la regulación de la expresión génica.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general:

Contribuir a la comprensión de la información contenida en las secuencias intergénicas de *T. cruzi* y de los mecanismos que éstas median.

Objetivos específicos:

- a) Determinar la presencia de proteínas capaces de establecer interacciones específicas con las regiones de interés: secuencias intergénicas del *locus* H y elementos (dT-dG).(dC-dA) n.
- b) Determinar si existe actividad de unión a estas regiones en los tres estadios del parásito.
- c) Caracterizar la formación de complejos desde el punto de vista fisicoquímico.
- d) Identificar y caracterizar la/s proteína/s que reconocen estas secuencias.

Durante el transcurso del trabajo experimental, se introdujeron nuevos objetivos a la vez que se volvió imposible alcanzar algunos de los propuestos al comienzo. Dentro de los nuevos objetivos incluimos el análisis computacional de la frecuencia y ubicación de los dinucleótidos repetidos (en particular de (dT-dG)_n y (dC-dA)_n) en el genoma del parásito, el análisis de la presencia de estas proteínas en otras cepas del género y en otras especies, y la purificación de las proteínas caracterizadas. Lamentablemente durante esta tesis no fue posible realizar el cultivo de las formas amastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* con lo que no fue posible concretar el objetivo b).

MATERIALES Y METODOS

Análisis computacional

Se estudió la frecuencia y ubicación de repetidos de poli dinucleótidos para cada una de las combinaciones posibles (AA, TT, GG, CC, AT/TA, AG/GA, AC/CA, TG/GT, TC/CT, GC/CG) en las regiones no codificantes. El análisis se realizó en forma independiente en dos bases de datos distintas. Por un lado, se obtuvieron las tres secuencias solapantes (AF 05281, AF 05282, AF 05283) que dan lugar a un contig de 93.4 Kb, que constituye la secuencia más larga reportada en este parásito (C). Por otro lado, se tomaron las secuencias genómicas de *T. cruzi* reportadas al GeneBank empleando la utilidad *entrez*. Se seleccionaron sólo aquellos genes con anotaciones de secuencia codificante (CDS). Las secuencias fueron divididas en codificantes y no codificantes. En este trabajo se hace referencia indistintamente a las regiones intergénicas y a las no codificantes debido a que para la mayoría de los genes no se conocen exactamente los límites de las regiones no traducidas (UTRs). Sin embargo, esta nomenclatura no es exacta, pues la región intergénica corresponde a la secuencia de ADN que se encuentra fuera de las regiones génicas. Esto es, la región intergénica estrictamente no contiene las UTRs, que si bien no son codificantes están presentes en los ARNm modulando su expresión.

Las porciones no codificantes de las secuencias individualmente enviados al GeneBank se usaron para generar la base de datos SI (494 secuencias con un total 103.971nt). A su vez esta base de datos se subdividió en regiones 5' (34.411 nt) y 3' (69.560 nt) respecto a la CDS. Dada la naturaleza policistrónica de los genes de *T. cruzi* esta distinción es arbitraria en tanto no se conozca el largo de las zonas de regulación (UTRs) para cada gen y no se comprenda la relación funcional entre la región intergénica y los genes flanqueantes. La base de datos C contiene las regiones intergénicas completas mientras que la SI registra regiones de tamaño variable y cercanas a las zonas codificantes.

Para ambas bases de datos (SI y C) se determinó la cantidad de trechos poli dinucleotídicos perfectos, poli [dX-dY]_n, de cada largo para $n \geq 4$. Con estos datos se halló un factor F para cada n que es el producto de la frecuencia (f) de dinucleótidos con un largo dado por el tamaño de la secuencia dinucleotídica ($F = n \cdot f$). Con el objetivo de

representar en un valor único la abundancia de cada repetido perfecto de poli dinucleótido en las regiones estudiadas se obtuvo otro valor que resulta de la sumatoria (Σ) de todos los F para un dinucleótido dado ($\Sigma F(n)$). Cada suma fue normalizada, teniendo en cuenta el tamaño de la base de datos correspondiente, usando los valores: 1.03 para SI, 0.93 para contig, 0, 34 para 5' SI y 0.70 para 3' SI.

A los efectos de incorporar a estos análisis los dinucleótidos imperfectos se utilizó el programa Tándem Repeat Finder (*TRF*) (Benson, 1999) configurado de tal modo de encontrar los repetidos de periodicidad dos (dinucleótidos) con un n mayor o igual a 10. Los datos fueron procesados posteriormente de mismo modo descrito arriba, obteniéndose los valores F y Σ en cada caso. Sin embargo se introdujo una modificación en el valor F que intenta representar el grado de acierto de cada repetido, dado que ahora se consideran también repetidos imperfectos. Por lo tanto, $F = n \cdot F_a$, siendo a un valor entre 0-1 que representa la proporción de bases acertadas en el repetido.

Para determinar la frecuencia esperada de cada repetido polidinucleótido poli(XY) $_n$ para $n \geq 4$ se tuvo en cuenta en cada caso la composición nucleotídica correspondiente a la base de datos analizada. En el caso de la base C, contig, N=93435 nt, A: 24.144, C: 21.734, G: 23.541, T: 24.046. En el caso de la base SI, N=103.971 nt, A: 27.613, C: 20.960, G: 24.360, T: 30.963. En el caso de la base 5', N=34.411 nt, A: 9.770, C: 7.287, G: 7.851, T: 9.503. En el caso de la base 3', N=69.560 nt, A: 17.843, C: 13.748, G: 16.509, T: 21.460. Las frecuencias esperadas de los diferentes repetidos perfectos de polidinucleótidos se calcularon como el cociente entre el producto de la ocurrencia de cada mononucleótido implicado elevado a la potencia n y el número de bases en la secuencia en estudio $[(X.Y)^n/N]$. La significación de la diferencia entre el valor esperado y el observado se determinó mediante un análisis de $X^2 [(O-E)^2/E]$ comparando el valor calculado con el de tablas (Glantz, 1982). Se estudió la prueba de hipótesis de diferencia de proporciones para los pares complementarios de repetidos calculando el valor de Z ($Z = (O_1 - O_2) - (E_1 - E_2) / [O_1(1 - O_1)/N + O_2(1 - O_2)/N]^{1/2}$) y comparando con los valores de tablas.

Parásitos

Durante este trabajo se usó la cepa CL Brener de *T. cruzi* (Brener & Chiari, 1963). Los epimastigotas fueron cultivados a 28°C en medio líquido de infusión hepática y triposa (LIT) suplementado con suero fetal bovino (Sigma) al 10% previamente tratado por calor (20 min. a 65°C) para la inactivación del complemento.

Oligonucleótidos y sondas

Los experimentos con ensayos en gel de retardo se realizaron con oligonucleótidos sintéticos con las secuencias [dT-dG]₁₅ y [dC-dA]₁₅ (Operon Technologies) que fueron purificados en geles de poliacrilamida siguiendo protocolos convencionales. Para los ensayos de competencia se empleó: un oligonucleótido poli [dT] de 15 nt, dos diferentes oligonucleótidos llamados: CR4 (TAATCCGCATGCGTTGCACAGGTAGT) y MP1 (CGCCGGGCGTGTGCTGCCAAACCGCTGACC), y un fragmento *NcoI* de 300 pb que contiene un repetido poli [dT-dG] de 28 pb, obtenido de la región intergénica entre los genes *tcpgp2* y *ptr1* de *T. cruzi* (Robello y col., 1997).

Preparación de extractos nucleares

Los extractos nucleares se prepararon siguiendo básicamente el método de Dignam (Dignam y col., 1983) con las modificaciones reportadas por Brown y Van der Ploeg en *T. brucei* (Brown & Van der Ploeg, 1994). Se cultivaron epimastigotas de *T. cruzi* hasta fase exponencial (aproximadamente 10⁷ parásitos/ml) y se centrifugaron 10 min. a 1.000g. Se agregó en todos los buffers PMSF 1mM, pepstatina 1μM, leupeptina 0.6μM y todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces en PBS y el pellet final fue resuspendido en buffer Tris-HCl 10mM pH 7.6, MgCl₂ 2mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, DTT 0.5mM, EDTA 1mM, espermidina 1mM, y PEG 6%. Luego de 10 min. en hielo, se agregó NP-40 hasta una concentración final de 1.5%. La suspensión celular fue posteriormente homogenizada en un homogenizador Tri-R Stir-R (Model K41) a 3.000 rpm. Se adicionó un volumen de sacarosa 0.64M, Tris-HCl 40mM pH 7.6, KCl 60mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 0.5mM, espermidina 1mM. Las células fueron centrifugadas durante 10 min. a 1.500g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 1ml de buffer Hepes 20mM pH 7.9, KCl 100mM, EDTA 0.2mM, glicerol 20%, DTT 0.5mM, PMSF 1mM. La suspensión fue centrifugada durante 1 hora a 25.000g a 4°C. El sobrenadante fue removido y el pellet fue resuspendido en 500μl de mismo buffer. Los núcleos fueron homogenizados con 20 golpes en el homogenizador de microtubos (K Deltaware). Los extractos fueron guardados a -80°C. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry y col, 1951) usando fracción V de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Los extractos proteicos de otras especies fueron obtenidos de modo similar (Garat, 1995, 1999; Garat y col., 1998), excepto los de *Escherichia coli* que fueron gentilmente cedidos por la Mag. Patricia Cortazzo de la Sección Bioquímica.

Los distintos pasos de método de purificación de núcleos fueron analizados fijando las fracciones con PBS-formaldehído al 2% y observándolas luego al microscopio óptico por contraste de fase y por fluorescencia después de la tinción con colorantes específicos para ADN (DAPI, Hoescht y YOYO-1) según métodos convencionales.

Tratamientos con ADNasa, ARNasa y proteinasa K

Para el tratamiento de los extractos con ARNasa A (Sigma) se incubaron los extractos nucleares con la enzima en una concentración final de 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml y 1.000 μ g/ml durante 15 min. a 4° C.

El tratamiento de los extractos con Proteinasa K (Bohering Mannheim) se realizó durante 20 min. a 4°C una concentración final de enzima de 0.7mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml y 7mg/ml en el buffer de la reacción de unión.

Por último el tratamiento con ADNasa I, se llevó a cabo durante 15 min. a 37° C usando concentraciones de enzima de 0.005U/ μ l, 0.025U/ μ l y 0.05U/ μ l en buffer adecuado. La reacción fue detenida por adición de EDTA hasta una concentración final de 25mM. También se realizó una reacción control sin ADNasa para descartar efectos de las condiciones del tratamiento que no sean producidos por la enzima en sí misma.

En todos los casos la reacción de unión comenzó por la adición de la sonda marcada en las condiciones mencionadas para la reacción de unión rutinaria.

Marcado de las sondas de ADN

El marcado del fragmento *Nco*I de la región intergénica corriente arriba del gen *ptr-1* se efectuó por el método de relleno de los extremos cohesivos (Sambrook y col., 1989). Para esto, se dejó reaccionar 100 ng del fragmento con la enzima Sequenase (Gibco BRL) en presencia de desoxi-nucleótidos fríos, 10 μ Ci de [α ³²P]dATP y el buffer de la enzima durante 15 min. a temperatura ambiente. El fragmento marcado se purificó de los nucleótidos no incorporados por precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio 0.3M. Los precipitados se lavaron con etanol 70% y luego de secados, se resuspendieron en agua hasta una concentración de aproximadamente 1 ng y entre 30.000 y 10.000 cpm/ μ l medida en un contador de centelleo (Beckman Instruments).

Los oligonucleótidos (aproximadamente 100 ng por reacción) fueron marcados en el extremo 5' por medio de la enzima T4 polinucleótido quinasa usando 10 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP durante 30 min. a 37°C de acuerdo a los métodos estándar, y purificados por pasaje a través de columnas Sephadex G-50.

Reacción de unión y ensayo en gel de retardo (EMSA).

El análisis en gel retardo (del inglés electrophoretic mobility shift assay o EMSA) de las interacciones ADN-proteína fue realizado según métodos convencionales (Carey, 1991). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 20 μl con buffer (Tris-HCl 10mM, KCl 10mM, MgCl_2 10mM, DTT 1mM, EDTA 0.1M), espermidina 5 mM y 2 μg de poli[dl-dC].poli[dl-dC]) como competidores inespecíficos. En cada reacción se usó 1 ng de sonda marcado (10-30000 cpm). Para analizar la especificidad de los complejos formados entre las proteínas nucleares y las sondas marcadas radiactivamente, se adicionó a la reacción un ADN competidor no marcado en exceso. De esta forma, todos los complejos inespecíficos con ADN marcado no se desplazan y los complejos que permanecen unidos a la sonda representan las asociaciones específicas. Esto se confirma por la desaparición del complejo en presencia de exceso de sonda fría. Los competidores específicos fueron agregados a la reacción en un exceso molar de 100 veces a temperatura ambiente durante 10 min. antes de la adición de sonda marcada. Las reacciones fueron incubadas durante 20 min. a temperatura ambiente y cargadas en geles nativos al 6 % acrilamida:bisacrilamida (30:0.36). 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 a -80°C usando pantallas amplificadoras. En todos los casos, después de la electroforesis en gel de poliácridamida, el gel se analizó por autoradiografía. En los casos especificados, la concentración de los productos de reacción se determinó por medidas directas de radioactividad de las bandas en el contador de centelleo. Para ello, cada carril del gel fue cortado en pequeños trozos de 1 cm de largo y se adicionó líquido de centelleo (SIGMA). Se determinó la radioactividad retenida por el complejo relativa al total de radioactividad en el carril.

La reacción de unión se realizó en las condiciones descritas variando la naturaleza y concentración del competidor, el tiempo de incubación, o las concentraciones relativas de proteína y ADN-sustrato, en función del parámetro a caracterizar. Además, para los ensayos con sondas en la forma de simple hebra, se utilizaron como

competidores secuencias arbitrarias de ADN en hebra simple o de ARN, con la finalidad de descartar la formación de complejos específicos de reconocimiento estructura, de simple hebra o de ARN.

Las constantes aparentes de equilibrio se determinaron como la relación de las constantes cinéticas de asociación y disociación. Para la reacción: $\text{ADN} + \text{P} \rightleftharpoons \text{ADN-P}$ $K_{eq} = \frac{(\text{ADN-P})}{(\text{ADN})(\text{P})}$. La constante de disociación (K_d) es el inverso de la constante de equilibrio $K_d = 1/K_{eq}$. La constante de disociación se relaciona con las constantes cinéticas de asociación y disociación siendo $K_d = k_d/k_a$. Las constantes de asociación se estimaron variando los tiempos de incubación para concentraciones conocida y en exceso de sonda, empleando concentraciones de oligonucleótido de tal forma que fuera superior al K_d del complejo. En estas condiciones $(\text{ADN-P}) = (\text{Pt})(1 - e^{-k_a t})$ donde k_a es la constante cinética de asociación aparente de primer orden para la concentración particular de oligonucleótido. Los valores de k_d se determinaron mezclando concentraciones conocidas de los reactivos, dejando transcurrir la reacción hasta el equilibrio y luego adicionando ADN competidor específico a los complejos preformados. La constante de disociación para una reacción de primer orden, k_d , es la pendiente de $\ln(\text{ADN-P})/(\text{ADN-P}_0)$ versus tiempo (Stone y col., 1991). Los análisis cinéticos funcionales se realizaron usando el programa de series temporales (TSP) y Excel (Microsoft).

Cromatografía

Los extractos nucleares usados en los experimentos de cromatografía fueron privados de ácidos nucleicos mediante extracciones con KCl a alta fuerza iónica como se ha descrito (Zhang & Williams, 1997). Para ello se resuspendieron los últimos precipitados de la extracción de núcleos en un buffer Hepes 20mM pH 7.6, KCl 1.7M, EDTA 5mM, EGTA 1mM, DTT 0.5mM enfriado, y se homogenizaron con un homogenizador Tri-R Stir-R (Model K41). Se dejó en hielo durante una hora y se centrifugó a 135.000g toda la noche a 4°C. El sobrenadante se dializó luego durante 10 horas a 4°C con un cambio de buffer, contra 50 volúmenes del mismo buffer excepto que la concentración de KCl fue de 100 mM. Luego se sedimentó centrifugando a 1.000g para remover el material precipitado. Las muestras fueron guardadas a -70°C en presencia de inhibidores de proteasas.

Todas las cromatografías se realizaron a partir de una cantidad de proteínas nucleares de epimastigotas de *T. cruzi* entre 10-50 mg. En todos los casos las eluciones

se hicieron usando un gradiente no continuo de concentraciones crecientes de KCl, y se recuperaron fracciones de un volumen de 5ml. La concentración relativa de proteínas se midió, en forma simultánea a la elución, mediante medidas de absorción a 280 nm con un monitor de luz UV (Pharmacia) acoplado. Posteriormente, las fracciones fueron extensivamente dializadas contra buffer con KCl 150mM y luego concentradas con concentradores Centricon-10 (Amicon) hasta un volumen final de aproximadamente 50 μ l. Se utilizó el EMSA con los oligonucleótidos específicos para determinar la presencia o ausencia de actividad de unión en cada fracción. Asimismo, la composición polipeptídica de cada fracción se estudió por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) y tinción con plata o azul de Coomassie siguiendo protocolos convencionales (Sambrook y col., 1989).

Con el objetivo de purificar las proteínas caracterizadas a través del EMSA, efectuamos dos tipos de cromatografías de afinidad basados en dos de las propiedades de las proteínas identificadas:

1. su capacidad de unirse al ADN en hebra simple, por lo que empleamos una columna de ADN bovino en hebra simple. Para ello, la fracción nuclear obtenida luego de la extracción con alta fuerza iónica fue aplicada a una columna de ADN en hebra simple unido a agarosa (Gibco BRL) de un volumen de 2ml y eluída con un gradiente discontinuo que consistió en un buffer Hepes 20mM pH 7.6, EDTA 5mM, EGTA 1mM, DTT 0.5mM, con KCl 150 mM, 300mM, 500 mM, 1M y 2M. Se colectaron fracciones de 5ml que fueron concentradas, desaladas y analizadas como se indicó arriba.

2. su capacidad de unirse específicamente a la secuencia oligonucleotídica blanco. Para ello, la fracción nuclear obtenida luego de la extracción con alta fuerza iónica (aproximadamente 10 mg de proteína) se mezcló con (10 μ g) los oligonucleótidos específicos biotinilados en el extremo 5' (Roswell Park) en aproximadamente 10ml de buffer A (Hepes 20mM pH 7.6, glicerol10%, KCl 100 mM, EDTA 5mM, EGTA 1mM, DTT 0.5mM) en presencia espermidina 1mM y Tritón 1% durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación suave en una plataforma rotativa. A esta mezcla se le adicionó posteriormente 2 ml de estreptoavidina pre-tratada unida a agarosa (SIGMA) y se continuó mezclando en las mismas condiciones durante otra media hora. La estreptoavidina-agarosa se trata previamente con albúmina de suero bovino (BSA) 250 μ g/ml y ADN de esperma de salmón (GIBCO CRL) 1mg/ml para disminuir los sitios de unión no específica a proteínas o ácidos nucleicos presentes en la matriz. Para esto se centrifugó brevemente

2ml de streptoavidina-agarosa en tubos de microcentrifuga y se removió el sobrenadante. Al pellet se le adicionó la BSA, el ADN de salmón y buffer A y se mezcló gentilmente durante 5 min. sobre una plataforma rotativa. Luego se centrifugó nuevamente la mezcla, se resuspendió el precipitado en 2 ml de buffer A, se mezcló y centrifugó. Este lavado fue repetido una vez. Por último se resuspendió el pellet en 1ml del buffer de elución con KCl 3M, se mezcló y centrifugó del mismo modo y se lavó dos veces el precipitado en el buffer A. Luego de la reacción entre los oligonucleótidos con los extractos nucleares y la estreptoavidin-agarosa se procedió al empaquetamiento de la columna. Con este propósito se introdujo lentamente la mezcla de reacción en una columna para cromatografía de baja presión de 10cm de alto por 1cm de diámetro (Econo-Column *BIO-RAD*) sin flujo de salida. Luego de incubar por 10 min., se inició el flujo de salida por presión gravitacional. Como se mencionó anteriormente, se colectaron fracciones de 5 ml que fueron luego concentradas y desaladas.

Southwestern blot.

Para analizar la capacidad de las proteínas visualizadas en el SDS-PAGE de unirse a las secuencias blanco oligonucleotídicas se efectuaron ensayos de southwestern blot siguiendo básicamente protocolos previamente descritos (Miskimins y col., 1985). Para ello las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Protran *Schleicher&Schwell*) en un buffer Tris 30 mM pH7.5, Glicina 233mM, Metanol 20% durante toda la noche a 14V a 4°C.

Luego de la transferencia las membranas se bloquearon durante 60 min. a temperatura ambiente en el buffer de hibridación (NaH_2PO_4 10mM pH 7.2, NaCl 0.5 M, EDTA 1mM, TritónX-100 0.2%) con leche deshidratada al 4%. Las membranas fueron luego sometidas a ciclos de desnaturalización-renaturalización usando hidrocioruro de guanidina (Vinson y col., 1988). Se incubaron en 50 ml de buffer de hibridación conteniendo hidrocioruro de guanidina 6 M durante 5 min. a temperatura ambiente. Las membranas fueron posteriormente incubadas en una solución diluida de hidrocioruro de guanidina 1:1 con buffer de hibridación (por lo tanto reducida un 50% la concentración de la sal) durante 5 min. a TA. Este procedimiento se repitió 4 veces, de tal modo de reducir paulatinamente la concentración de hidrocioruro de guanidina y finalmente la membrana fue lavada dos veces en buffer de hibridación. Se adicionó entonces 10 ml de buffer de hibridación conteniendo la sonda (50ng) con una actividad específica de aproximadamente 2×10^4 dpm/ng. Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Por último se retiró la

solución radioactiva y se lavó la membrana dos veces 15 min. con buffer de hibridación. Las membranas fueron secadas y expuestas para auto radiografía. En algunos casos las membranas fueron des-hibridizadas y re-hibridizadas con otra sonda luego de chequearse la ausencia total de señal de la sonda anterior.

RESULTADOS

Cultivo de parásitos y obtención de extractos nucleares.

En la figura 4 se observa el resultado de una extracción de núcleos, visto por tinción con Hoechst de los parásitos enteros (cuadros A y B) y de la fracción nuclear (cuadros C y D) final obtenida por el protocolo de purificación descrito en materiales y métodos. La figura muestra que la fracción final está claramente enriquecida este organelo. En estas fotos se observan algunos núcleos rotos cuya proporción varía según las extracciones.

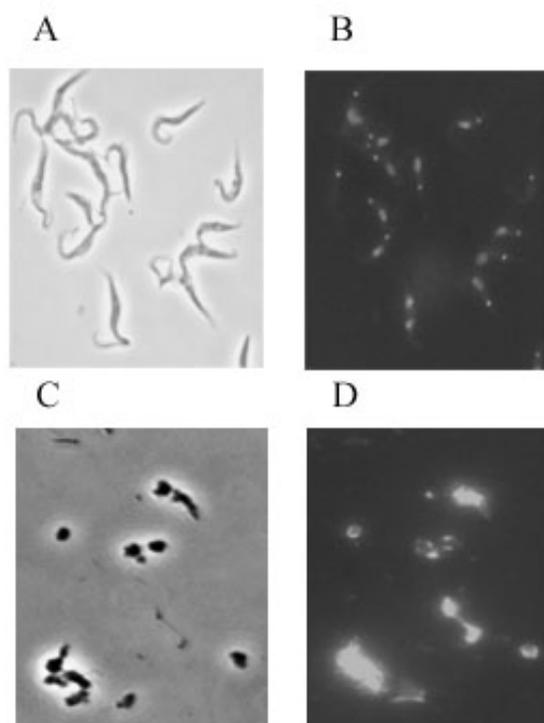


Figura 4. Microscopía óptica de preparados teñidos con Hoescht para el seguimiento de la extracción de núcleos. Se muestran cuatro campos vistos al microscopio óptico con un aumento de 100x. A-B Parásitos provenientes del cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* en medio LIT fijado. C-D Fracción nuclear fijada obtenida según se indica en materiales y métodos. A y C: vistas por contraste de fase; B y D: vistas al microscopio de fluorescencia.

Interacciones entre extractos nucleares y la secuencia intergénica de *ptr-1*

Con el objetivo de buscar interacciones entre la secuencia intergénica 5' del gen *ptr-1* y las proteínas presentes en los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi* realizamos geles de retardo utilizando como sonda el fragmento *NcoI* de 300 pb. Como se observa en la figura 5, en las condiciones utilizadas no encontramos proteínas capaces de establecer interacciones específicas con esta sonda. A medida que se incrementa la concentración de extracto nuclear la sonda retrasa su movilidad, pero este retraso no es desplazado por el competidor específico (carriles +). En estas condiciones no se visualizaron interacciones específicas con la secuencia intergénica en forma de doble hebra.

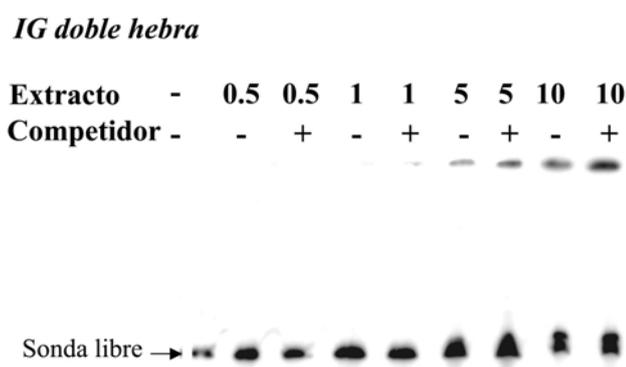


Figura 5. EMSA utilizando como sonda el fragmento *NcoI* de la secuencia intergénica del gen *ptr-1*. La concentración de extracto nuclear utilizada (en µg) se indica en la fila "Extracto". Los signos "+" y "-" señalan respectivamente la presencia y ausencia del fragmento *NcoI* sin marcar en una cantidad 100 veces (100ng) mayor a la sonda marcada (1ng) en la reacción. Este experimento fue realizado en duplicado obteniéndose resultados reproducibles.

Teniendo presente que en tripanosomátidos se han descrito elementos reguladores en forma de hebra simple, repetimos el experimento anterior empleando ahora la misma sonda, pero desnaturalizada por calor. Con este propósito la sonda marcada fue calentada a 95°C durante 10 minutos, colocada rápidamente en hielo y adicionada directamente a la mezcla de reacción con las proteínas nucleares. En estas condiciones se produjo una agregación de la sonda en el pocillo, resultando imposible discriminar la existencia de complejos específicos con las proteínas nucleares (Figura 6).

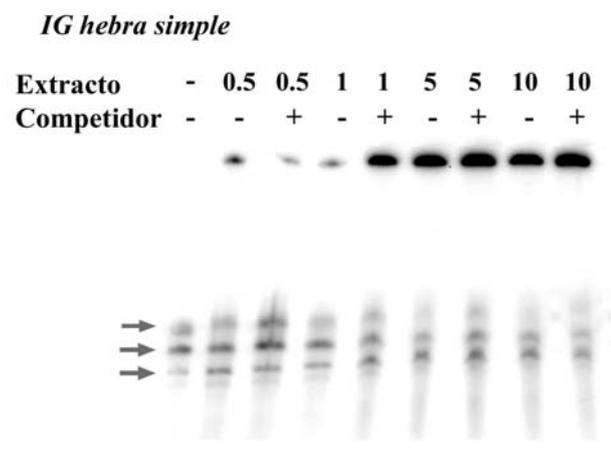


Figura 6. EMSA utilizando como sonda el fragmento *NcoI* de la secuencia intergénica del gen *ptr-1* desnaturalizada por calor. La concentración de extracto nuclear utilizada (en μg) se indica en la fila “Extracto”. Los signos “+” y “-” señalan respectivamente la presencia y ausencia del fragmento *NcoI* sin marcar en una cantidad 100 veces (100ng) mayor a la sonda marcada (1 ng) en la reacción. Las flechas corresponden a la sonda libre en doble hebra, y a cada una de las hebras simples. Este experimento fue realizado cuatro veces obteniéndose resultados reproducibles.

Dada la dificultad para analizar las interacciones con el fragmento de 300 pb de la región intergénica, decidimos trabajar con sondas más pequeñas. La presencia de un largo trecho de repetidos poli [dT-dG] en la intergénica de *ptr-1* nos llevó a comenzar estudiando esta secuencia en particular. En primer lugar, realizamos geles de retardo utilizando el oligonucleótido doble hebra (poli [dT-dG]₁₅.poli [dC-dA]₁₅). En segundo lugar, y dados los antecedentes de proteínas de unión a hebra simple en regiones regulatorias de los tripanosomátidos, empleamos los oligonucleótidos poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ separadamente. Mientras que con la sonda doble hebra no se obtuvo ningún complejo (resultados no mostrados), con los oligonucleótidos se visualizó la formación de varios complejos (Figura 7).

En la figura 7 se observa la migración de las sondas marcadas poli[dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ en el EMSA en presencia y ausencia de extracto nuclear. En los carriles 1 y 3 se ve claramente que los dos oligonucleótidos tienen migraciones diferentes, debido a leves diferencia en el peso molecular y a diferencias conformacionales. Cuando se adiciona el extracto nuclear a la reacción, la migración de la sonda se retrasa

produciéndose por lo menos tres complejos con la sonda poli[dT-dG]₁₅ y un complejo con la sonda poli [dC-dA]₁₅.

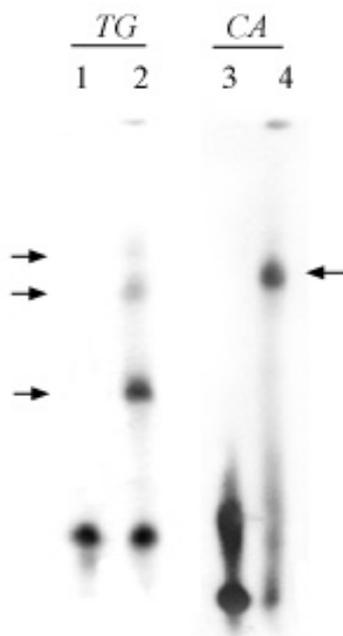


Figura 7. EMSA con las sondas de repetidos dinucleotídicos y extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi*. Sonda marcada radiactivamente: (1-2) poli[dT-dG]₁₅ y (3-4) poli [dC-dA]₁₅. Carril 1 y 3: sonda marcada sin proteínas. Carril 2 y 4: 5µg de extracto nuclear incubado con la sonda durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las flechas indican la posición de los complejos producidos en los carriles 2 y 4.

En este experimento la sonda poli[dC-dA]₁₅ no había sido purificada observándose dos señales en el carril 3. Luego de la purificación del oligonucleótido en geles desnaturalizantes se obtuvo sólo la señal de mayor migración que produce exactamente el mismo retardo cuando se incubaba en presencia de proteínas nucleares en las condiciones descritas. Algo similar sucedió con la sonda poli[dT-dG]₁₅, que en la figura 7 ya había sido purificada del mismo modo.

Análisis de la frecuencia y ubicación de poli dinucleótidos en el genoma de *T. cruzi*.

Para determinar si los repetidos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n, reconocidos por factores nucleares, constituyen una particularidad de la región intergénica *ptr-1* del locus H o son comunes a otras regiones no codificantes, se llevó a cabo un análisis computacional utilizando las secuencias de *T. cruzi* reportadas en la base de datos del GeneBank.

Por un lado se analizó el fragmento contig (C) de 93.4 Kb del cromosoma 3 de *T. cruzi* que incluye algunas fases abiertas de lectura. La proporción de bases de esta región (A 25.8%, C 23.3%, G 25.5% y T 25.7%) concuerda con lo comunicado previamente para el genoma de *T. cruzi* (Alonso y col., 1992) y el contenido en GC varía

según lo esperado, con una distribución heterogénea entre 47% y 55% (Héctor Musto, comunicación personal). Por otra parte se generó una base de datos con las secuencias intergénicas (SI) extraídas de las secuencias enviadas individualmente al GeneBank (103.971nt en total), cuya composición es A 26.6%, C 20.2%, G 23.4%, T 29.9%.

El análisis de la abundancia de cada clase de poli dinucleótido perfecto en las dos bases de datos estudiadas (C y SI) produjo los resultados que se muestran en la Figura 8. Los repetidos más largos y abundantes corresponden a los poli [dA-dA]_n, poli [dT-dT]_n, poli [dA-dT]_n, y poli [dT-dG]_n.

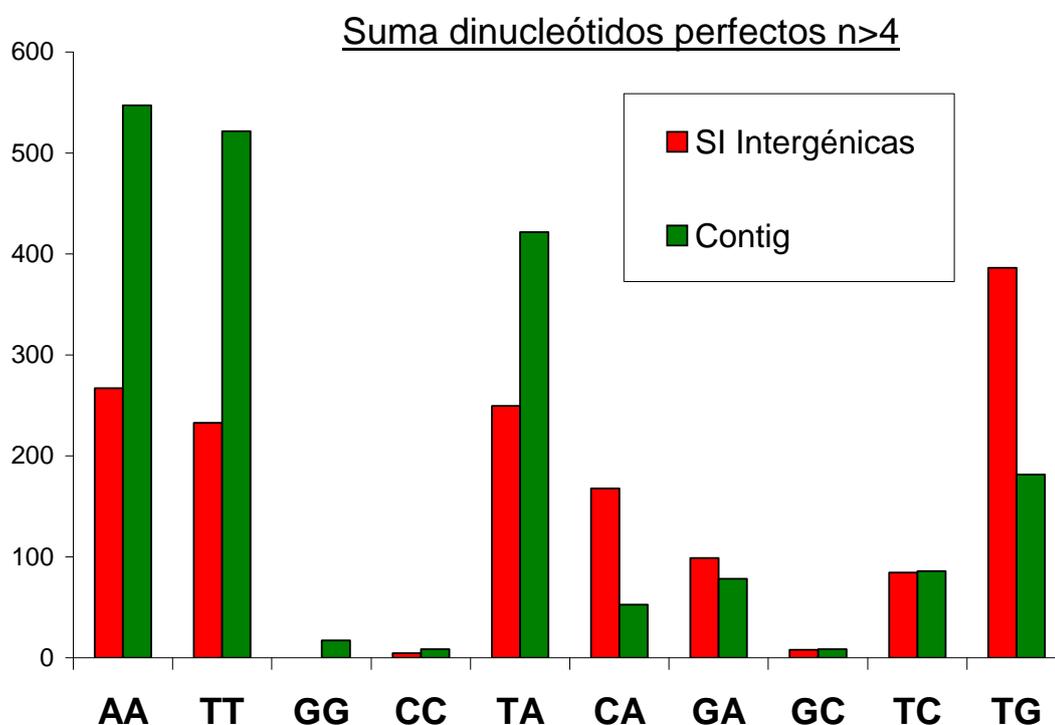


Figura 8 . Gráfico representando la suma $\sum F(n)$ para cada dinucleótido perfecto posible con $n \geq 4$. En el gráfico se muestran los resultados obtenidos utilizando dos bases de datos diferentes. En rojo: regiones que rodean a las CDSs de las 494 secuencias individuales de *T. cruzi* enviados al GeneBank (103.971 bases en total). Se incluyen aquí todas las secuencias flanqueantes reportadas, cuyo largo varía para cada gen. En verde: regiones no codificantes propuestas para el Contig de 93.4 Kb *T. cruzi*. Las sumas fueron normalizadas según se indica en materiales y métodos.

Teniendo en cuenta la composición de bases del contig, los poli dinucleótidos repetidos perfectos con $n \geq 4$, con excepción de poli [dC-dC]_n, poli [dC-dG]_n y

poli [dG-dG]_n, se encuentran representados en números significativamente mayores que lo esperado (prueba de χ^2 $P < 0.0001$) (Tabla 1).

	AA	AC/CA	AG/GA	AT/TA	CC	CG/GC	CT/TC	GG	GT/TG	TT
O	81	9	13	58	2	2	13	3	27	84
E	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Tabla 1. Frecuencia de poli dinucleótidos repetidos perfectos en el contig. Se indican los valores totales de frecuencia de polidinucleótidos repetidos perfectos $n \geq 4$ observados y esperados teniendo en cuenta la composición en bases del Contig de 93.4 Kb (ver materiales y métodos).

Con respecto a la base de datos que incluye a las 494 secuencias individuales con indicaciones de CDSs, los resultados son casi idénticos. La abundancia relativa de los dinucleótidos es semejante a la observada en el contig, los mismos dinucleótidos son los que se alejan de los valores esperados aleatoriamente y con el mismo nivel de significación (Tabla 2).

	AA	AC/CA	AG/GA	AT/TA	CC	CG/GC	CT/TC	GG	GT/TG	TT
O	46	37	17	34	1	2	15	0	77	42
E	3	3	3	4	3	3	3	3	3	7

Tabla 2. Frecuencia de poli dinucleótidos repetidos perfectos en la secuencias independientes. Se indican los valores totales de frecuencia de polidinucleótidos repetidos perfectos $n \geq 4$ observados y esperados teniendo en cuenta la composición nucleotídica de la base de secuencias generada (SI). Se incluyen aquí todas las secuencias flanqueantes reportadas, cuyo largo varía para cada gen. (ver materiales y métodos).

Al igual que lo descrito para C, en SI los repetidos poli (dT-dG) se encuentran preferentemente agrupados y rodeados de repetidos poli (dT-dG) imperfectos. Se observa además que en SI los poli (dT-dA) son los dinucleótidos repetidos más largos.

Las principales diferencias entre las dos bases de datos estudiadas están constituidas por una proporción mayor de dinucleótidos AA, TT y AT en el contig respecto a las regiones que bordean a los genes individuales. Este fenómeno se explica principalmente por la presencia de una región rica en las bases A y T en el contig (Figura 10). La otra diferencia que se destaca está dada por una mayor abundancia de poli (dT-dG) circundando a las CDSs en la SI con respecto a la encontrada en C.

Por otro lado, si comparamos la abundancia de los pares de poli dinucleótidos complementarios, el par poli (dT-dG)-poli (dC-dA) se aparta de lo esperado presentando polaridad de hebra. Este es el único par de dinucleótidos complementarios cuya prueba de proporción de frecuencias se aparta en forma significativa ($Z=3.40$ $P<0.0003$), fenómeno que también se observa en el contig ($Z=2.57$ $P<0.005$).

Durante este estudio se evidenciaron trechos importantes de dinucleótidos imperfectos, que no estaban siendo tenidos en cuenta en el análisis. A fin de incluirlos se utilizó el programa *TRF*. Esta utilidad sólo trabaja con repetidos mayores o iguales a 20 bases ($n=10$). La base de datos de los genes individuales fue dividida en las regiones 5' y 3' respecto a las CDSs de cada gen, basándose en la información extraída del GeneBank, con la intención de investigar la posible distribución preferencial de los repetidos en alguna de estas localizaciones. Los resultados se muestran en la figura 9.

En líneas generales el análisis incluyendo a los repetidos imperfectos y considerando sólo aquellos motivos dinucleotídicos con un $n \geq 10$ da lugar a un perfil similar al observado en la figura 8. Por otro lado, se destaca una abundancia mayor de los poli dinucleótidos poli [dA-dA]_n, poli [dT-dT]_n y poli [dA-dT]_n en las regiones 3' respecto a las 5' respecto de las CDSs. Una tendencia similar, aunque más suave, es mostrada por los repetidos poli [dT-dG]_n.

La ubicación de los poli dinucleótidos perfectos fue estudiada en forma global en el contig (Figura 10). En el esquema se ve claramente la concentración de repetidos poli [dA-dA]_n, poli [dT-dT]_n y poli [dA-dT]_n en la zona entre las bases 1-20.000. Los repetidos poli [dA-dG]_n y poli [dC-dT]_n también se encuentran mucho más representados en esa zona. La distribución y naturaleza de los repetidos de dinucleótidos involucrados sugiere la posibilidad de que esta zona del ADN adopte conformaciones particulares. A continuación se observa una región (aproximadamente entre la posición 25.000 a 40.000) que no contiene información transcripcional, y que coincide a la vez con un cambio en la relación G-C/G+C y con un cambio en la hebra transcripcionalmente activa (Héctor Musto, comunicación personal). Resulta interesante señalar que los repetidos poli [dT-dG]_n con $n \geq 4$ se encuentran en las regiones intergénicas y por lo general agrupados. Además se observaron repetidos imperfectos bordeando a los perfectos obtenidos por este análisis. Estas características también son compartidas por la región intergénica del *locus* H estudiada.

Dinucleótidos imperfectos con $n > 10$.

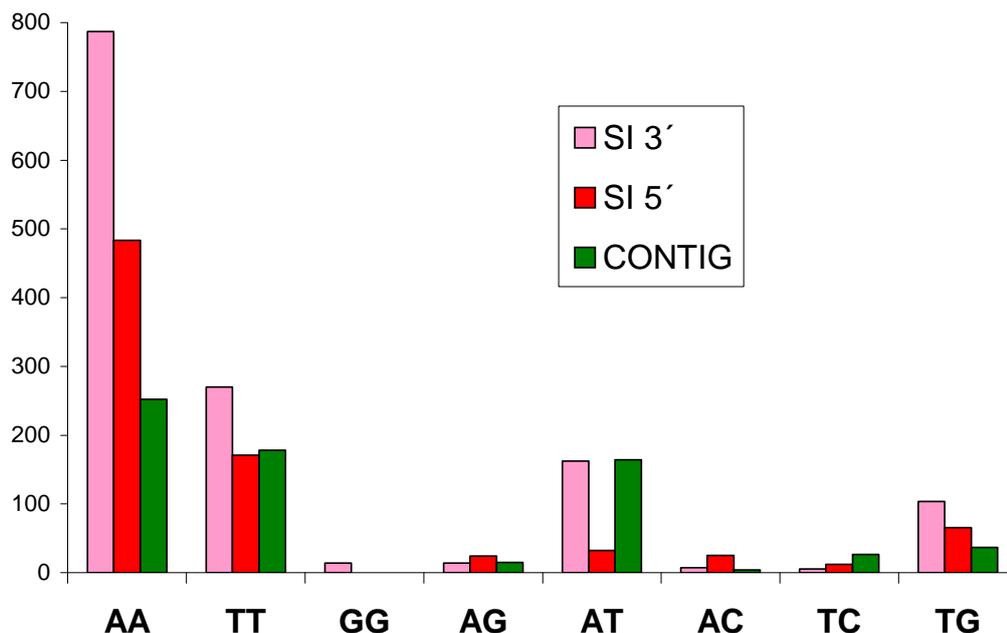


Figura 9. Gráfico representando la suma $\sum F(n)$ para cada dinucleótido posible considerando a los dinucleótidos imperfectos con $n \geq 10$. En el gráfico se muestran los resultados obtenidos utilizando tres bases de datos diferentes. En rojo: regiones 5' respecto a las CDSs de SI. En rosa: regiones 3' respecto a las CDSs de SI. Se incluyen aquí todas las secuencias flanqueantes SI, cuyo largo varía para cada gen. En verde: regiones no codificantes propuestas para el Contig de 93.4 Kb *T. cruzi*.

La ubicación de los repetidos perfectos poli [dT-dG]_n más largos encontrados fue también determinada para SI. La figura 11 esquematiza la ubicación de estas secuencias con respecto a la CDS del gen correspondiente. De la figura se desprende que, si bien no puede establecerse un perfil claro de localización, la distribución no parece al azar. Los genes representados en esta figura se listan en la tabla 3. No se encontró ninguna relación evidente entre la presencia de repetidos poli [dT-dG]_n en las secuencias flanqueantes a las regiones codificantes y características de los genes como: nivel de expresión, estadio de expresión, uso de codones o propiedades de las proteínas codificadas.

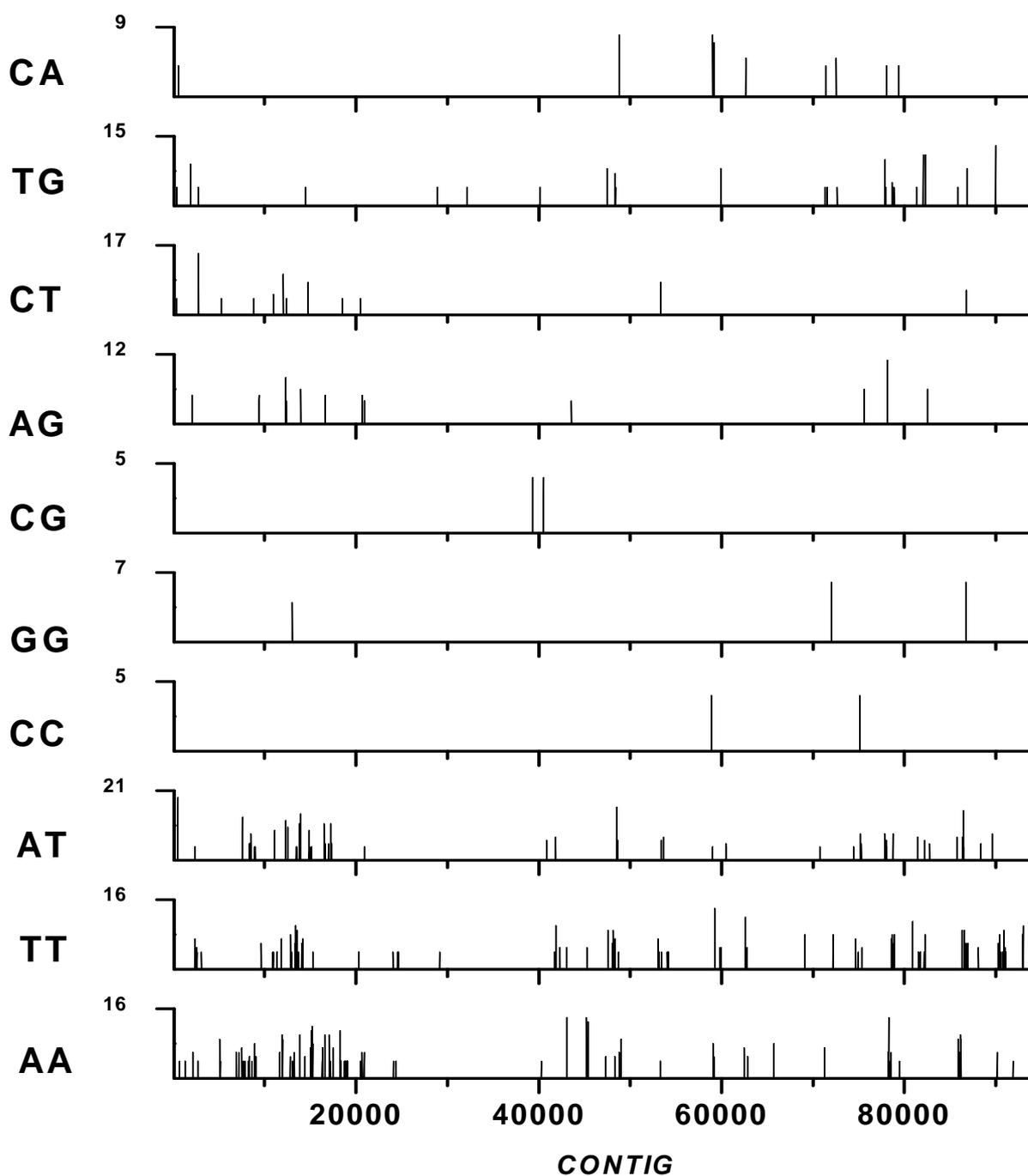


Figura 10 . Esquema representando la ubicación de los dinucleótidos perfectos con $n \geq 4$ a lo largo del contig.

En la abscisa se representa el contig de 93.4 Kb, indicándose las bases desde la posición 1 hasta la 93435. En cada uno de los 10 dibujos se ubican los trechos de dinucleótidos perfectos con $n \geq 4$ en la secuencia. En las ordenadas se indica el n máximo para cada dinucleótido.

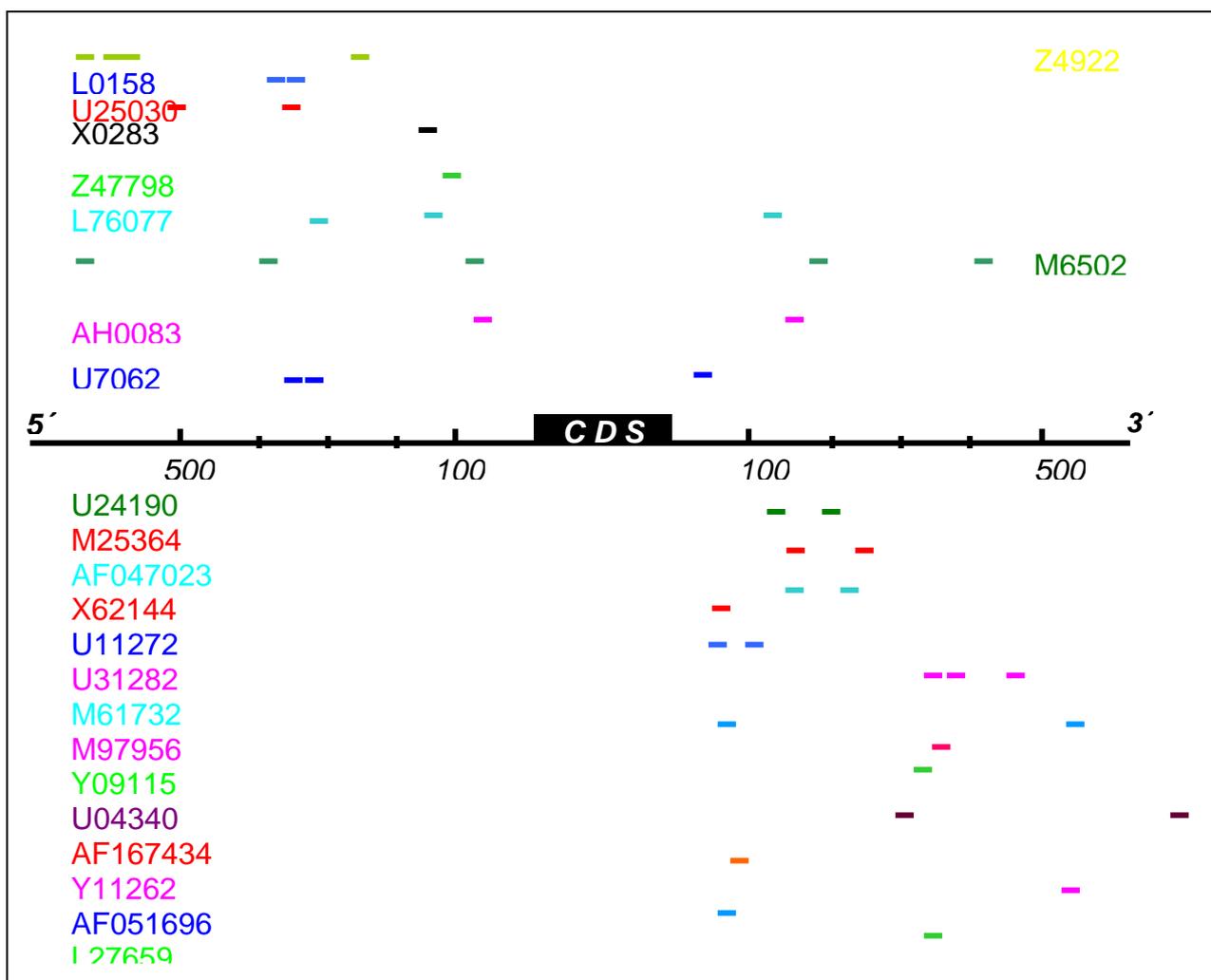


Figura 11. Ubicación de los repetidos poli [dT-dG]_n con $n \geq 4$ respecto a la CDS del gen en que se encuentran. En el esquema central se representa la CDS (región codificante) y se indican las distancias en bases hacia los extremos 5' y 3'. Los repetidos se muestran como pequeñas barras horizontales del mismo color y al mismo nivel que el número de acceso al GeneBank del gen correspondiente.

La frecuencia, distribución y polaridad de hebra que muestran los motivos poli [dT-dG]_n, sumadas al hallazgo de proteínas nucleares de epimastigotas capaces de establecer interacciones con ellos, nos condujo a proseguir el estudio de esta interacción a través de la caracterización primaria de su especificidad y afinidad.

Tabla 3. Lista de las secuencias que contienen los repetidos poli [dT-dG]_n con n≥4. En la columna de la izquierda se encuentra el número de acceso de las secuencias localizadas en la figura anterior. En la columna central se describe brevemente el gen y/o la proteína codificada por este gen indicándose alguna característica interesante cuando se conoce. La columna izquierda muestra el tamaño de los repetidos (n) de cada gen. Para los genes que contienen más de un repetido los n de izquierda a derecha corresponden a los repetidos en la dirección 5'-3'.

Número de acceso	Gen y/o proteína codificada	Largo (n) de poli [dT-dG]
Z47789	Gen de proteína tipo cistatina	11
L76077	Factor de elongación 1-alfa	4, 7, 7
M65021	GP72 un antígeno del estadio epimastigota	5, 7, 6, 6, 5
AH008347	KMP11 una proteína asociada al Citoesqueleto regulada a nivel traduccional	10, 9
U70620	Gen de Ca ²⁺ -ATPasa de expresión elevada en amastigotas	9, 4,4
U24190	Tc40 antígeno	8, 5
M25364	KAP proteína asociada al kinetoplasto en epimastigotas y amastigotas	8, 6
AF047023/AF004380	Par1b Componente de la varilla paraflagelar	6, 5
X62144	P0 Proteína ribosomal	5
U11272/U06070/AF044733	Proteína de unión al poli (A)	4, 7
U31282	Deshidrogenasa homóloga a levadura	7, 4, 6
M61732/X57235/M21582	TCNA neuraminidasa , antígeno de fase aguda	5, 6
M97956	beta tubulina y alpha tubulina	16
Y09115	probable histona H2A	5
U04340	TcA33 amastina	5, 4
X02838	1F8 proteína	9
AF09099	Genes TolT1 (tolT1), TolT2 (tolT2), y TolT3 (tolT3)	7, 16
U25030	Gen de tuzina	5, 5
L01584	Proteína de unión al calcio; relacionada a calmodulina	5, 4
Z49222	P-glycoproteína	14, 5, 4, 4
Y11262	Gen lpd dihidrolipoamida deshidrogenasa;	4
AF051696	P85.2 homologo a sialidasa	4
L27659	Gen de histona H3	4

Caracterización de los complejos específicos entre las sondas poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ y los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi*

Con la finalidad de analizar la **especificidad** de estas interacciones intentamos distinguir entre componentes estructurales y de secuencia. Para ello se llevaron a cabo ensayos de retardo introduciendo diferentes tipos de competidores. En primer lugar se emplearon el oligonucleótido específico y su complementario. Por otro lado se usó ADN del fago M13 para examinar la especificidad por ADN en hebra simple independientemente de la secuencia. También se incluyó ARNt de levadura para analizar especificidad por ARN genéricamente. Asimismo, utilizamos la región intergénica empleada en los primeros ensayos tanto en la forma doble hebra como en la forma desnaturalizada por calor, para estudiar el posible efecto del contexto de la secuencia. Finalmente empleamos poli [dT]₁₅ como una secuencia polipirimidina y dos oligonucleótidos de 30nt elegidos al azar (MP1 y CR4 descritos en materiales y métodos) para distinguir los componentes de secuencia de la especificidad.

La figura 12A muestra el perfil de bandas obtenido usando la sonda poli [dT-dG]₁₅. Se observaron por lo menos tres diferentes complejos específicos (anotados como *TG1*, *TG2*, y *TG3*). Los dos oligonucleótidos poli [dT-dG]₁₅ o poli [dC-dA]₁₅ fueron capaces de competir con la sonda. Cuando se compete con el oligonucleótidos complementario se observa una variación en la migración de la sonda probablemente debida a la formación de una doble hebra. Ni el oligonucleótido poli [dT]₁₅, ni CR4 y MP1 que tienen el mismo largo que la sonda dinucleotídica, pudieron competir en estas condiciones. Una proteína de unión al ARN no específica de secuencia podría estar involucrada en la formación del complejo *TG3* dado que es desplazado por ARNt de levadura. La razón por la cual se incrementa la intensidad de este complejo en presencia de los oligonucleótidos permanece sin ser comprendida. Es interesante destacar que la secuencia intergénica en forma de doble hebra es incapaz de desplazar a ninguno de los complejos en estas concentraciones, mientras que la misma secuencia en hebra simple produce una agregación en el pocillo. A partir de estos resultados concluimos que tanto *TG1* como *TG2* corresponden a interacciones específicas con la sonda.

Un perfil diferente de bandas se obtuvo usando el oligonucleótido poli [dC-dA]₁₅ como sonda (Figura 12B). Por lo menos tres complejos fueron evidenciados (designados *CA1*, *CA2*, y *CA3*). Los dos oligonucleótidos específicos poli [dC-dA]₁₅ y poli [dT-dG]₁₅ compitieron con los tres complejos. *CA1* y *CA2* fueron completamente desplazados por el ARNt de levadura. El complejo *CA3* mostró alta especificidad por la

sonda dado que no pudo ser desplazado por ninguno de los competidores usados, incluyendo los tres oligonucleótidos (poli [dT]₁₅, CR4 y MP1).

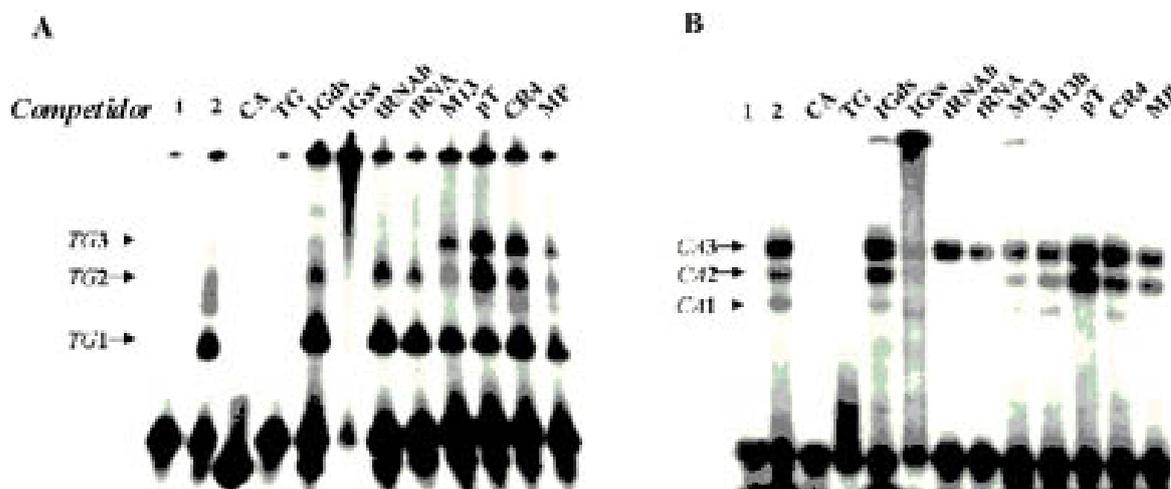


Figura 12. EMSA con las sondas de repetidos dinucleotídicos para estudiar la especificidad de los complejos formados con los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi*. Sonda marcada radiactivamente: (A) poli[dT-dG]₁₅ y (B) poli [dC-dA]₁₅. Se emplearon varios competidores en un exceso de 100-veces respecto a 1 ng de sonda marcada en cada reacción. Carril 1: sonda marcada sin proteínas. Carril 2-12: reacciones de unión con la sonda oligonucleotídica marcada y 5µg de extracto nuclear. Carriles 3-12: reacciones de unión en presencia de competidores (indicados encima de cada carril). Designación de los competidores: CA (poli[dC-dA]₁₅), TG (poli[dT-dG]₁₅), Igds (fragmento *Nco*I de 300 pb, hebra doble), IGss (competidor anterior en forma de hebra simple), tRNA, (ARnt), tRNAh (ARnt previamente calentado), M13 (ADN simple cadena del fago M13), poli[dT]_n, CR4, y MP1. Estos resultados fueron reproducibles en múltiples experimentos.

Para determinar la **naturaleza** de las moléculas que integran estos complejos, los extractos nucleares fueron tratados con diferentes enzimas degradativas. En las condiciones ensayadas el complejo *TG2* fue sensible a la Proteinasa K mientras que el *TG1* no; ambos mostraron resistencia a la actividad ARNasa y ADNasa. (Figura 13). El efecto de estas enzimas sobre el complejo *TG3* no fue determinado. La naturaleza proteica del complejo *TG2* quedó claramente demostrada en este experimento. La intensidad de la banda correspondiente al complejo *TG1* disminuye levemente al aumentar la concentración de proteinasa K. Si bien se requiere de análisis ulteriores para la confirmación, la aparición concomitante de una banda de menor movilidad podría sugerir que el complejo *TG1* contiene un componente proteico.

En el caso de la sonda poli [dC-dA]₁₅ el complejo CA3 se mostró estable frente a la actividad ARNasa y ADNasa y sensible a la actividad proteinasa K.

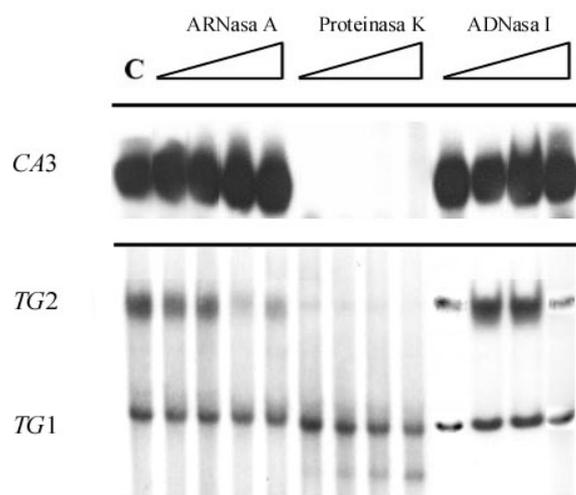


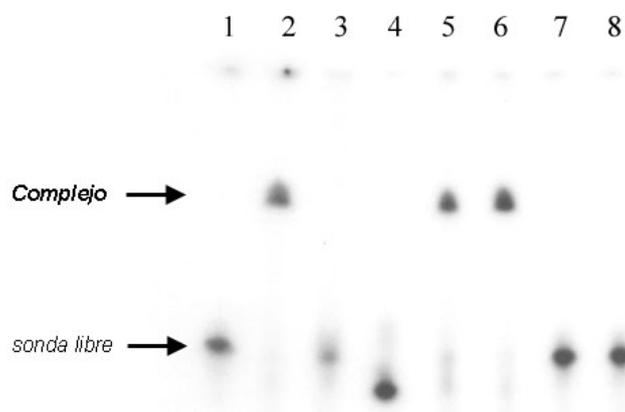
Figura 13. EMSA con extractos tratados con enzimas degradativas. Se observan dos geles diferentes. El superior muestra el complejo CA3 con la sonda poli[dC-dA]₁₅ mientras que el cuadro inferior muestra los complejos formados con la sonda poli[dT-dG]₁₅. Carril C: Reacción control de unión en ausencia de enzimas. Para cada tratamiento las concentraciones de enzima de izquierda a derecha en los cuatro carriles son ARNasa A: 100µg/ml; 250µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml. Proteinasa K: 0.7 mg/ml, 2 mg/ml, 5mg/ml y 7 mg/ml; ADNasa I: 0.005 U/µl, 0.025 U/µl y 0.05 U/µl. El último carril de la derecha es un tubo control de la reacción de la ADNasa I.

No se observaron cambios en el perfil de bandas cuando se usaron diferentes extractos proteicos. Sin embargo la intensidad relativa de las bandas varió un poco dependiendo de los extractos y de las condiciones en que se guardaron, debido probablemente a su degradación. Los complejos más **lábil**es, que tienden a desaparecer más rápidamente luego de procesos de congelado-descongelado, son TG3 y CA2.

Es interesante mencionar que los complejos específicos para cada sonda fueron capaces de formarse aún a una fuerza iónica de 1M de KCl. Cuando se incrementa más la concentración de KCl disminuye la formación de los complejos pero aún son visibles en el EMSA hasta 2M de KCl (resultados no mostrados).

Como se esperaba la proteína de unión a hebra simple (SSBP) de *E. coli* (PROMEGA) fue capaz de formar complejos con ambas sondas oligonucleotídicas. Sin embargo el desplazamiento fue eliminado cuando se emplearon cualquiera de los oligonucleótidos de 30nt (Figura 14).

Figura 14. EMSA con SSBP. Resultados para la sonda poli[dT-dG]₁₅. Carriles 1: sonda libre, 2-8: 1 ng de SSBP, sin competidor (2), y con 100 veces poli[dT-dG]₁₅ (3), poli[dC-dA]₁₅ (4), ARNt (5), poli (dT)₁₅ (6), ADN del fago M13 (7), oligonucleótido MP1 (8).



Con la intención de analizar si esta actividad de unión específica a las secuencias oligonucleotídicas poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ se encuentra conservada entre las **cepas de *T. cruzi***, preparamos extractos nucleares de epimastigotas de las cepas Y y Tuluahén. Como se muestra en la figura 15, las dos cepas estudiadas fueron capaces de retrasar a las sondas oligonucleotídicas dando lugar a un perfil idéntico al observado en la cepa CL Brener.

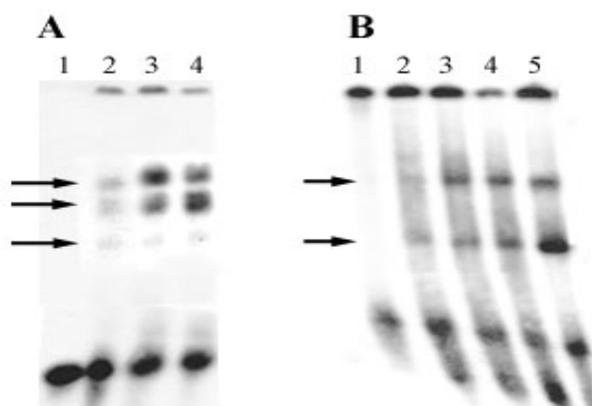


Figura 15. EMSA con extractos nucleares de epimastigotas de distintas cepas de *T. cruzi*. **A.** Sonda poli [dC-dA]₁₅ **B.** poli [dT-dG]₁₅. Carriles. 1: Sondas libres, sin proteínas. 2-5: Reacciones de unión con 10 µg de extracto de las cepas: 2.Tulahuén. 3. Y. 4 y 5. CL Brener. Las flechas señalan los complejos ya caracterizados para cada una de las sondas. Estos resultados fueron reproducibles en varios experimentos.

Durante este trabajo y en el marco de una pasantía en el laboratorio de la Dra. Noreen Williams (Dept. of Mycrobiology, State University of New York at Buffalo) también se estudió la presencia de esta actividad de unión a las secuencias poli [dC-dA]₁₅ y poli [dT-dG]₁₅ en extractos nucleares de *T. brucei*. Con este propósito se cultivaron y se prepararon extractos nucleares de la forma procíclica (forma replicativa que habita en el insecto) de este organismo. A través del ensayo en geles de retardo observamos la formación de complejos muy similares a los vistos en *T. cruzi* (Figura 16). Sin embargo, evidenciamos que a la altura del complejo *TG2* de *T. cruzi*, se visualiza un complejo muy poco intenso en *T. brucei* que es desplazado por los tres competidores inespecíficos analizados. Asimismo se observa claramente un complejo que tiene una migración menor a la del complejo *TG2* de *T. cruzi*, denominado *TG2B*, que parece tener una especificidad similar a la caracterizada para el *TG2* de *T. cruzi*. En la figura 16A se visualizan los complejos *CA1* y *CA3*, y también se observa muy tenue una señal correspondiente al complejo *CA2* que se hace más visible a medida que aumenta la concentración de extracto. No se efectuaron determinaciones de especificidad con esta sonda. La semejanza en los perfiles de retraso en estos dos parásitos sugiere que probablemente existan en *T. brucei* proteínas similares a las caracterizadas en *T. cruzi*.

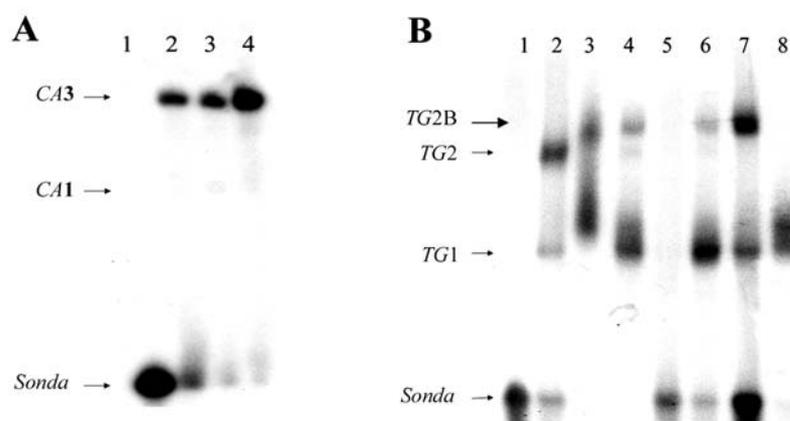


Figura 16. EMSA con extractos nucleares de *T. brucei*. **A.** Sonda poli [dC-dA]₁₅ Las flechas indican los complejos formados por los extractos de *T. cruzi* en el mismo gel. Carril 1, Sonda libre. Carril 2 a 4: extractos nucleares de *T. brucei* con 1µg, 5µg, y 10µg de extracto nuclear respectivamente. **B.** Sonda poli [dT-dG]₁₅ Carril 1, sonda libre. Carril 2, extractos nucleares de *T. cruzi* (10µg). Carriles 3 y 4, extractos nucleares de *T. brucei* (10 µg por carril), recién preparados y guardados a -80 °C. Carriles 5-8, Reacciones de competencia con: poli [dT-dG]₁₅ oligonucleótido, ADN del fago M13, ARNt de levadura tratado por calor y un oligonucleótido de treinta nt con una secuencia al azar, respectivamente. Este experimento se realizó en duplicado y los resultados fueron reproducibles.

Dada la aparente conservación de las actividades de unión a los oligonucleótidos poli [dC-dA]₁₅ y poli [dT-dG]₁₅ nos preguntamos si esta actividad estaba también presente en **otras especies**. Con éste propósito realizamos el EMSA empleando extractos proteicos de los organismo que son modelos de trabajo en nuestro laboratorio: extractos de *Escherichia coli*, extractos totales de *Aspergillus nidulans*, extractos nucleares de protoescólices de *Echinococcus granulosus*, y extractos nucleares de eritrocitos de *Gallus gallus*. Como se observa en la figura 17, todos los extractos fueron capaces de retardar ambas sondas produciendo más de un complejo con migraciones diferentes a las observadas en *T. cruzi*. Un análisis muy preliminar de la especificidad, utilizando ARNt y ADN cadena simple del fago M13 indica que, en este sentido, los complejos tampoco se comportan de modo idéntico a los de *T. cruzi*.

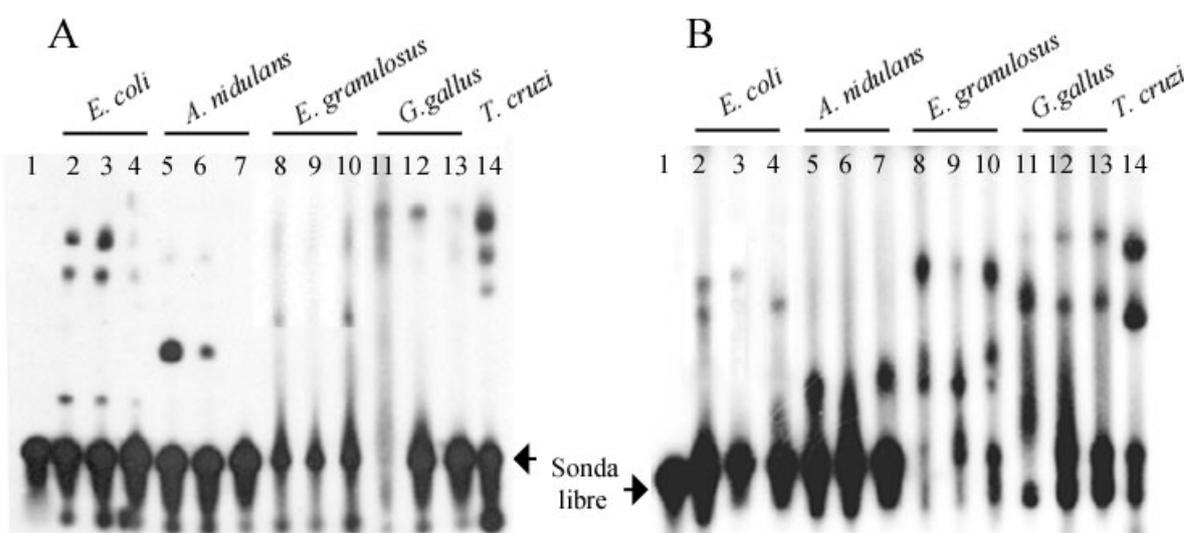


Figura 17. EMSA con extractos nucleares de distintas especies. A. Sonda poli [dC-dA]₁₅ B. Sonda poli [dT-dG]₁₅. **Carriles.** 1: sonda libre. 2-4: extractos totales de *E. coli*, sin competidor (2), con ADN cadena simple del fago M13 (3), ARNt (4). 5-7: extractos totales de *A. nidulans*, sin competidor (5), con ADN cadena simple del fago M13 (6), ARNt (7). 8-10: extractos nucleares de *E. granulosus*, sin competidor (8), con ADN cadena simple del fago M13 (9), ARNt (10). 11-13: extractos nucleares de *G. gallus*, sin competidor (11), con ADN cadena simple del fago M13 (12), ARNt (13). 14: extracto nuclear de *T. cruzi*. En cada reacción se utilizaron aproximadamente 5 µg de extracto de cada una de las especies. El ARNt empleado en las competencias fue previamente tratado por calor.

Determinación de parámetros fisicoquímicos funcionales de los complejos específicos.

Con la finalidad de caracterizar la **afinidad** de los complejos ADN-proteína, intentamos en primer lugar, determinar la cantidad de complejo formado en función de la concentración de proteínas en el equilibrio. En nuestras condiciones, dado que usamos extractos nucleares de *T. cruzi*, la cantidad absoluta de proteína involucrada en la formación de los complejos no puede ser determinada. Por lo tanto se tomó la cantidad de proteína total como referencia. La concentración de la sonda, en cambio, sí puede ser estimada. En estos ensayos se usó la sonda en exceso. Para la sonda poli [dT-dG]₁₅, el complejo *TG1* se observa a partir de concentraciones de extracto de 0.1 µg/20 µl, mientras que el complejo *TG2* es sólo visible a partir de 3.0 µg/20 µl (Figura 18A). Para la sonda poli [dC-dA]₁₅ los complejos *CA1* y *CA3* son también detectados a concentraciones de proteína de 0.1 µg/20 µl mientras que el complejo *CA2* es detectado a concentraciones de 0.75 µg/20 µl (Figura 18B). A medida que se incrementa la concentración de proteínas, el perfil de bandas se vuelve más complejo en ambos casos. Sin embargo no, se evidencian claros efectos de cooperatividad en ninguno de los casos, especialmente para los complejos específicos.

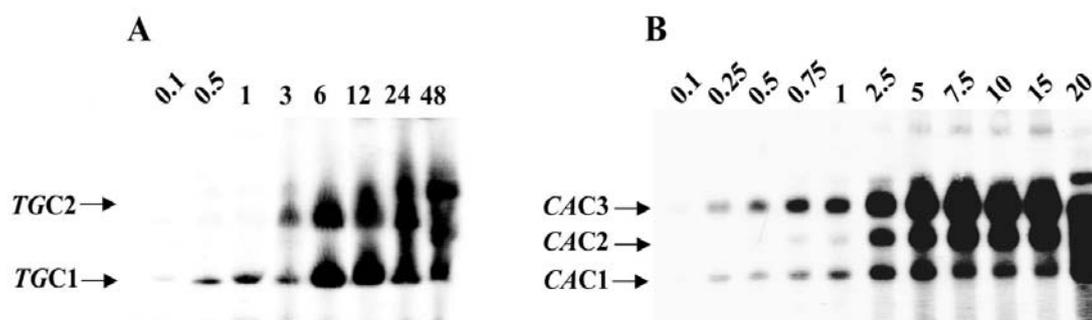


Figura 18. Formación de los complejos en función de la concentración de proteínas. Las reacciones de unión se llevaron a cabo usando concentraciones crecientes de extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi* y 1 ng de sonda marcada: (A) Sonda poli [dT-dG]₁₅ y (B) poli [dC-dA]₁₅. Las concentraciones de proteínas (mg/ml) se indican sobre cada carril. Estos resultados fueron reproducibles por duplicado.

Si bien el EMSA fue desarrollado con proteínas puras, permitiendo el cálculo preciso de parámetros cinéticos y termodinámicos, posteriormente ha sido usado con extractos nucleares para la estimación primaria de las constantes cinéticas tanto de k_a ,

y en forma más general de k_d , así como la constante de afinidad K_d . El ensayo en gel de retardo con los extractos nucleares obtenidos como se describió permitió realizar esta estimación. Con este propósito se establecieron las condiciones para una reacción de pseudo primer orden usando la sonda en exceso y cantidades limitantes de proteínas.

Las proteínas reguladoras que producen interacciones con el ADN se caracterizan por una cinética de formación rápida con valores de k_a de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y K_d del orden de 10^{-9} a 10^{-12} M (Berg, 1988). Se estudió la **cinética de formación** removiendo alícuotas a distintos tiempos a medida que transcurre la reacción. En el caso de la sonda poli [dT-dG]₁₅, las reacciones se llevaron a cabo en la presencia de ARNt a fin de eliminar los complejos inespecíficos. Los resultados para ambas sondas se muestran en la figura 19 A y B respectivamente. Los análisis cuantitativos no revelan diferencias significativas en la estimación preliminar de las constantes de asociación para una reacción de pseudo-primer orden (figura 19C y D) estimadas en el orden de 10^{-2}s^{-1} y que conducen a valores del orden de magnitud esperados.

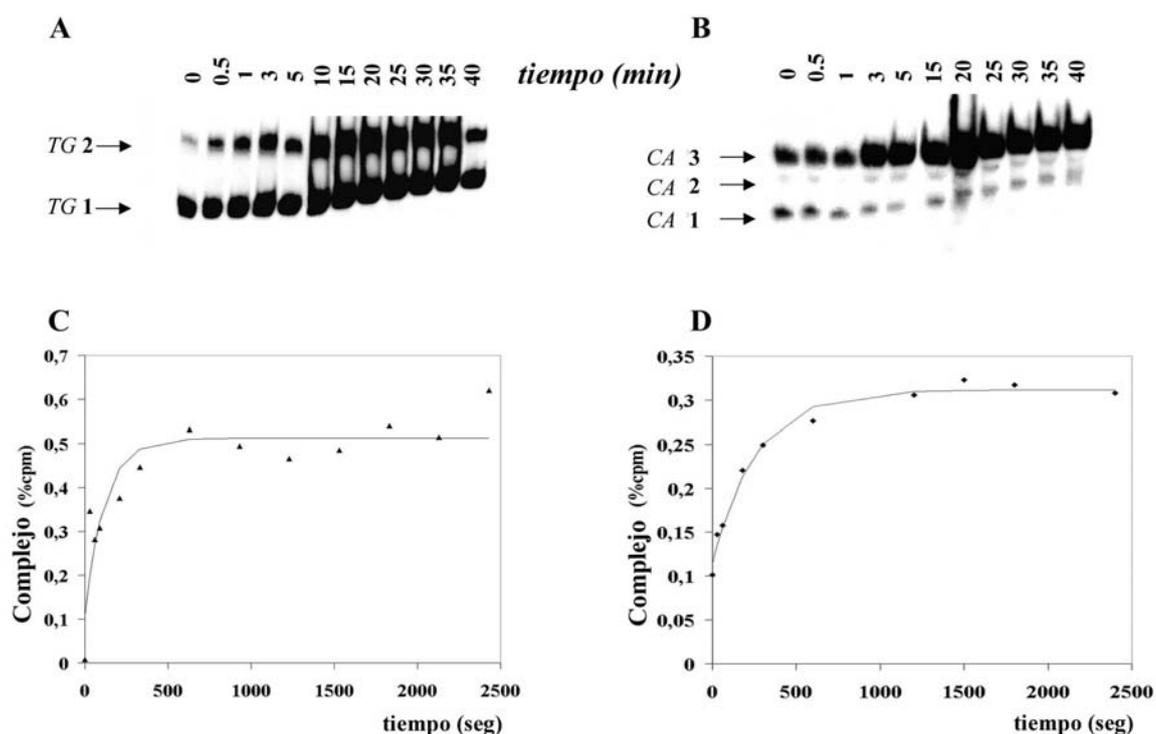


Figura 19. Cinética de formación de los complejos específicos. Paneles superiores. El tiempo desde el comienzo de la reacción hasta que se cargan las muestras se indica encima de cada carril. **(A)** Reacciones de unión con la sonda poli [dT-dG]₁₅. **(B)** Reacciones de unión con la sonda poli [dC-dA]₁₅. Paneles inferiores: los datos derivados de los experimentos de los paneles superiores se grafican como porcentaje de cpm del complejo (dividido el total de cpm del carril) contra el tiempo. **(C)** Complejo TG1 **(D)** Complejo CA3. Las reacciones se llevaron a cabo usando 5 mg de extracto nuclear. Estos resultados fueron reproducibles por duplicado.

Para estudiar la **estabilidad** de los complejos, luego de transcurridos 20 minutos de la reacción de unión, se adicionó el oligonucleótido específico correspondiente sin marcar en un exceso molar de 500-veces. A distintos tiempos, se removieron alícuotas que fueron analizadas en geles de retardo. Como se muestra en la figura 20, los complejos mostraron diferentes perfiles de disociación.

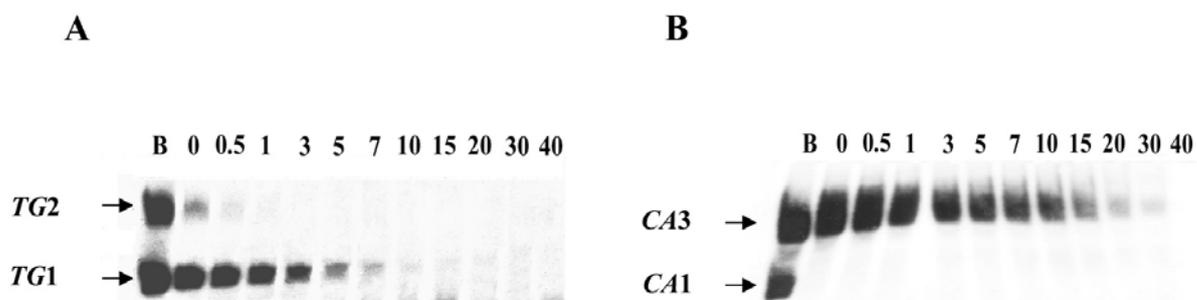


Figura 20. Estabilidad de los complejos. Luego de la formación de los complejos, se adicionó un exceso de 500 veces del competidor específico sin marcar a la reacción para minimizar la re-ligación de las proteínas a la sonda marcada. En los tiempos en minutos indicados sobre cada carril, se removieron alícuotas de la reacción y se analizaron en geles para determinar la cantidad de complejo remanente. **(A)** Sonda poli[dT-dG]₁₅ **(B)** Sonda poli [dC-dA]₁₅. Las reacciones se llevaron a cabo usando 5 µg de extracto nuclear. Estos resultados fueron reproducibles en dos experimentos.

Los análisis cuantitativos de estos experimentos (Figura 21) revelaron que la vida media funcional, $t_{1/2}$, es aproximadamente de 1 min. para el complejo *TG1* y 10 min. para el complejo *CA3*. Mientras tanto, para el complejo *TG2*, al igual que para *CA1*, se encontraron constantes de disociación muy altas, con vidas medias funcionales menores de un minuto. Los resultados obtenidos pueden traducirse en una constante funcional de disociación estimada en 10^{-10} M para *CA3* y 10^{-9} M para *TG1*.

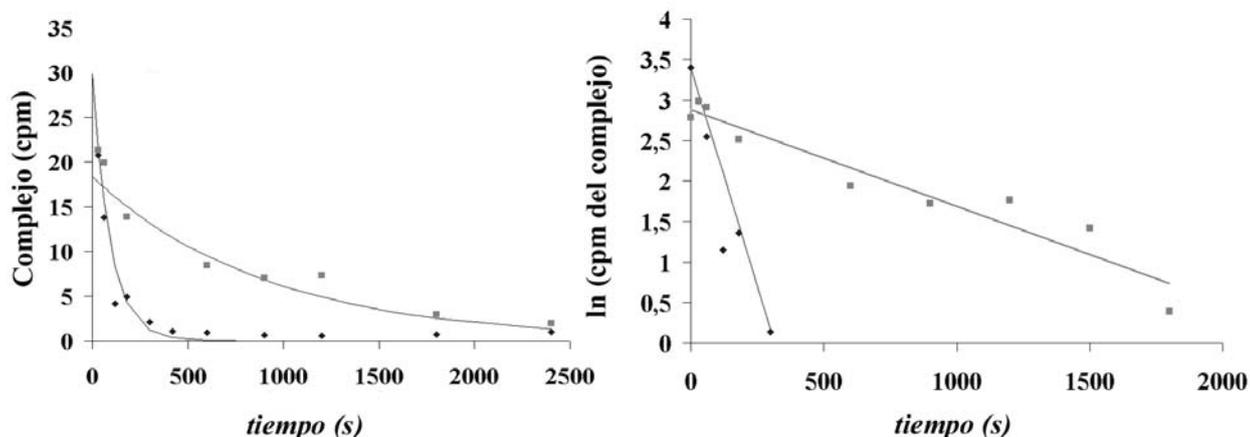


Figura 21. Determinación de la vida media de los complejos. Los datos fueron obtenidos de un experimentos como el descrito en la figura anterior. (◆) Complejo TG1 con la sonda poli [dT-dG]₁₅, (■) Complejo CA3 con la sonda poli [dC-dA]₁₅. **(Izquierda)** Curvas de disociación: cpm del complejo (normalizadas sobre el total de cpm del carril) contra el tiempo. **(Derecha)** Determinación de la $t_{1/2}$ de cada complejo como la pendiente del gráfico de logaritmo de las cpm del complejo en función del tiempo.

Purificación de las proteínas que intervienen en la formación de los complejos específicos.

Para la purificación de las proteínas involucradas en la formación de los complejos caracterizados por EMSA fue necesario un cambio a escala preparativa en el cultivo de *T. cruzi* (aproximadamente 10 litros de cultivo por vez). Los extractos nucleares obtenidos por el método descrito previamente, fueron sometidos a purificación por métodos cromatográficos convencionales. Para detectar los perfiles en SDS-PAGE en las fracciones purificadas se partió de por lo menos 10 mg de proteína de la fracción soluble de los extractos nucleares.

Para eliminar los ácidos nucleicos, la fracción soluble de los extractos nucleares fue sometida a una extracción con alta concentración de sales (1,7M de KCl). La fracción soluble resultante fue dializada extensivamente durante toda la noche a 4° C, con dos cambios de buffer, en presencia de inhibidores de proteasas. Este paso de purificación resultó en una disminución de aproximadamente un 80 % del valor de absorbancia a 260 nm, y en una pérdida de cerca del 50 % del contenido de proteínas iniciales medido por el método de Lowry.

El segundo paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad con ADN bovino en hebra simple unido covalentemente a agarosa. La presencia de las proteínas estudiadas fue ensayada por EMSA con las sondas específicas poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅. En varios experimentos independientes, recuperamos actividad de unión específica a las sondas blanco en la fracción de 500mM de KCl (Figura 22). Por lo general la actividad se concentraba principalmente en esta fracción, aunque en algunos experimentos se observó también actividad en las fracciones circundantes. La actividad de unión CA3 y TG2 co-eluye en esta cromatografía, lo que sugiere que la/s misma/s proteína/s podría/n estar involucradas en el reconocimiento de las secuencias de dinucleótidos complementarias. El rendimiento del procedimiento mejoró cuando se

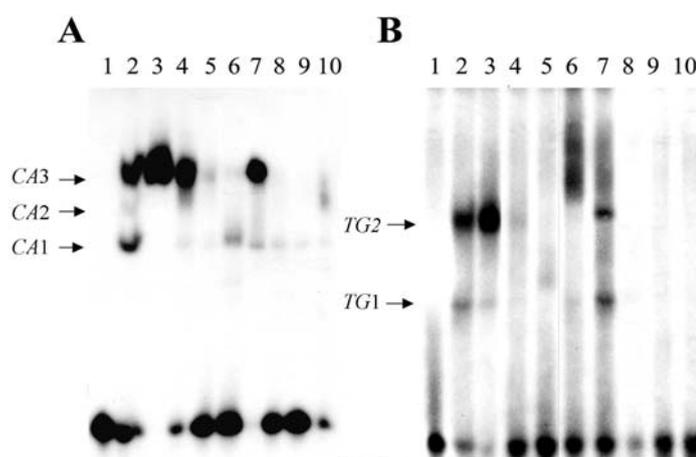


Figura 22. EMSA de las fracciones eluidas de una cromatografía de ADN de hebra simple unido a agarosa con extractos nucleares de *T. cruzi*. **A.** Sonda poli [dC-dA]₁₅. CA1, CA2 y CA3: complejos específicos previamente caracterizados. **B.** Sonda poli [dT-dG]₁₅. TG1, TG3: complejos específicos previamente caracterizados. En ambos casos cada carril corresponde a: 1. Sonda libre. 2. Extractos nucleares antes de la extracción de sales. 3. Fracción aplicada a la columna. 4. Fracción que no se unió a la columna (condiciones de carga 150mM KCl). 5. a 10. Fracciones eluidas con: 150 mM, 300mM, 500mM, 1M, 1.5 M y 2M de KCl respectivamente. Este experimento fue repetido múltiples veces dando lugar a resultados similares.

disminuyó la fuerza iónica del buffer en la reacción de unión utilizando 50mM de KCl (resultado no mostrado). Al usar una fuerza iónica menor en el buffer de unión a la matriz (ADN bovino de hebra simple) se evitó la pérdida de las proteínas que se observaba en el lavado inicial.

Las fracciones también fueron analizadas por SDS-PAGE como se muestra en la figura 23. Todas las fracciones muestran un perfil complejo de bandas, que es reproducible por lo menos en sus polipéptidos más abundantes. Una banda claramente

mayoritaria, correspondiente a un peso molecular aparente de alrededor de 40 kDa, aparece en todas las fracciones de la cromatografía de ADN en hebra simple que presentan actividad de unión específica (Figura 23 C). La proteína de 40 kDa se ve más pura en la fracción de 1M de KCl (Figura 23B, carril 2) y es la única claramente visible por tinción con azul de Coomasie (Figura 23A, carril 3).

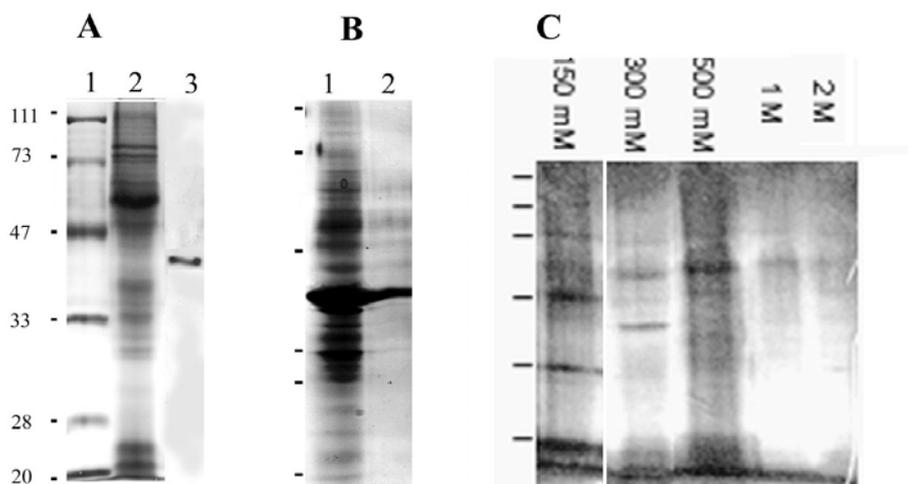
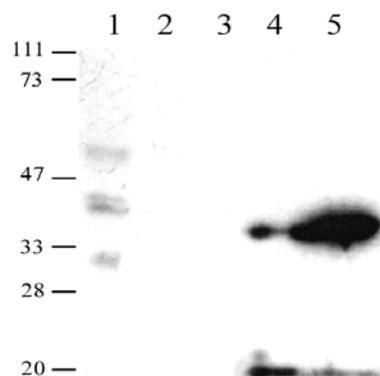


Figura 23. SDS- PAGE de fracciones de cromatografías con ADN en hebra simple-agarosa. **A.** Gel de acrilamida:bisacrilamida al 15%, teñido con azul de Coomassie. Carril 1, Marcadores de peso molecular (en kDa). El mismo marcador fue usado en todos los experimentos; su migración se indica con una barra delante de cada gel. Carril 2, extractos nucleares luego de extracción salina, fracción inicial de la cromatografía (10 μ g). Carril 2, fracción eluída a 500 mM de KCl **B.** Gel de acrilamida:bisacrilamida al 15% teñido con plata. Carril 1, fracción eluída a 500 mM de KCl. Carril 2, fracción 1M KCl **C.** Gel de acrilamida:bisacrilamida al 10% teñido con plata. Fracciones de una misma cromatografía. Sobre cada carril se indica la concentración de KCl usada para eluir cada fracción.

Para determinar cual de las proteínas en cada carril del SDS-PAGE poseía la actividad de unión a la secuencia blanco se efectuaron ensayos de southwestern blot. En las fracciones obtenidas de la columna de ADN en hebra simple que mostraban actividad de unión específica a las sondas poli [dC-dA]₁₅ y poli [dT-dG]₁₅, encontramos una señal intensa que se corresponde con la banda mayoritaria en el SDS-PAGE (Figura 24). También se observa una señal de menor intensidad con mayor migración. Sin embargo, en dos experimentos análogos esta última banda no se visualiza, mientras que sí se marca claramente la señal de aproximadamente 40 kDa.

También es interesante señalar que en el carril correspondiente al extracto nuclear se observan por lo menos cuatro señales, ninguna correspondiente en peso molecular aparente a la que produce la intensa señal en los carriles 4 y 5 del southwestern.

Figura 24. Southwestern blot. El oligonucleótido poli [dT-dG]₁₅ fue marcado y usado como sonda. Carril 1 a 3, extracto nuclear 20μg, 2μg y 0,2μg respectivamente. Carril 4 y 5, fracciones eluidas de una cromatografía de ADN en hebra simple unido a agarosa a 300mM y 500mM de KCl respectivamente.



En segundo lugar, se ensayó una cromatografía de afinidad en columna con el oligonucleótido poli [dT-dG]₁₅ unido a biotina y agarosa unida a estreptoavidina. Los extractos nucleares pre tratados se aplicaron a la columna que fue previamente bloqueada con BSA (albúmina de suero bovino) y ADN de esperma de salmón. La actividad de unión al blanco se recuperó fundamentalmente en la fracción KCl 1M. No se realizaron experimentos con el oligonucleótido poli [dC-dA]₁₅. (Figura 25).

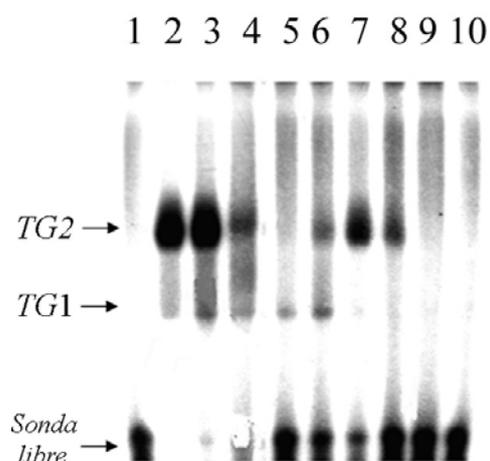


Figura 25. EMSA de las fracciones de cromatografía de afinidad a la sonda poli [dT-dG]. El oligonucleótido poli [dT-dG]₁₅ se marcó radiactivamente y se usó como sonda para el ensayo de geles de retardo. TG1 y TG2 diferentes complejos específicos caracterizados previamente. Cada carril corresponde a: **1.** Sonda libre. **2.** Extractos nucleares antes de la extracción salina. **3.** Fracción aplicada a la columna **4.** Fracción que no se une a la columna (condiciones de carga KCl 150mM). **5 a 10.** Fracciones eluidas con, 300mM, 500mM, 1M, 1.5 M, 2M y 3M de KCl respectivamente. Este experimento fue repetido múltiples veces dando lugar a resultados similares.

Un análisis preliminar de los perfiles de SDS-PAGE de las fracciones muestra que están compuestas por más de un polipéptido, incluso la fracción 2M. En la fracción 1.5M KCl se observa una banda de aproximadamente 40kDa que podría ser la misma que eluye en la fracción 500 mM KCl de la columna de ADN en hebra simple. Sin embargo los resultados hasta el momento obtenidos no permiten afirmar claramente que sea esta la proteína responsable de la formación del complejo con la sonda poli [dT-dG]₁₅.

Los resultados arriba descritos nos permiten concluir que los dos procedimientos cromatográficos empleados son útiles para la purificación de las proteínas de unión específica a los oligonucleótidos que estudiamos.

Durante este trabajo también se ensayaron purificaciones en bache utilizando los oligonucleótidos poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ unidos a vidrio de tamaño de poro controlado (Operon Technologies). Sin embargo con este método no se logró ni el poder de separación ni el rendimiento obtenido en las cromatografías de afinidad en columna arriba descritas.

DISCUSIÓN

La secuencia intergénica de *ptr-1* contiene señales que son reconocidas por factores presentes en los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi*.

En este trabajo utilizamos el ensayo de retardo en geles para buscar interacciones ADN-proteína entre extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi* y regiones del genoma potencialmente vinculadas a la regulación de la expresión génica. En primer lugar, en las condiciones ensayadas, no observamos interacciones específicas entre la región de la secuencia intergénica del gen *ptr-1* estudiada (fragmento *Nco1*) en forma de doble hebra y las proteínas nucleares de epimastigotas de *T. cruzi*. Las condiciones en que se realizaron las reacciones de unión, en particular la presencia de poli [dl-dC], poli [dl-dC] 2 μg como competidor inespecífico y la presencia de cantidades importantes de ADN endógeno en los extractos, disminuyen grandemente las interacciones inespecíficas que podrían producirse con la sonda. De todos modos, cuando se usan concentraciones altas de proteínas se producen interacciones que no son desplazadas por la adición de la sonda fría. Sin embargo no es posible desechar absolutamente que en otras condiciones (cofactores, fuerza iónica, composición del gel, etc) pueda establecerse alguna clase de interacción específica. De hecho, aunque Nunes y col (1997) con extractos nucleares de *T. cruzi* con un protocolo análogo al que aquí ensayamos logra encontrar actividad doble hebra en el promotor del gen que codifica para el miniexón, Yu y col.(1998) trabajando en *Leishmania* y Pham y col. (1997) en *T. brucei* encuentran actividad de unión a doble hebra sólo al usar fracciones parcialmente purificadas ya sea por tratamiento salino o utilizando columnas de heparina respectivamente.

Mientras tanto, cuando utilizamos la misma secuencia intergénica parcialmente desnaturalizada se produce una agregación en el pocillo que no fue posible resolver en el gel. Este resultado podría estar indicando que existen múltiples señales blanco en cada una de las hebras simple cadena. Estas señales podrían ser reconocidas por proteínas nucleares dando lugar a la formación de complejos macromoleculares que no se pudieron discriminar en las condiciones empleadas en este ensayo. La presencia de múltiples señales para el reconocimiento de proteínas de unión a ARN o ADN en forma de hebra simple, concuerda con los reportes sobre esta clase de interacciones en los promotores hasta el momento caracterizados en los tripanosomátidos (Jans y col., 1994;

Brown & Van der Ploeg, 1994). También se correlaciona con la transcripción policistónica y con los mecanismos de regulación post-transcripcional, fenómenos en los que sin duda deben intervenir un importante grupo de proteínas capaces de establecer interacciones con los ácidos nucleicos en forma de hebra simple.

Resulta importante aclarar que en este trabajo no es posible descartar que las interacciones con el ADN cadena simple evidenciadas se deban, en el escenario celular, a interacciones con el ARN. Es decir, no podemos excluir que las posibles señales que encontramos sean reconocidas por proteínas que intervienen en la dinámica del ARN. Un modo de estudiar este aspecto sería construir sondas de ARN con la misma secuencia que las de ADN y hacer en paralelo la caracterización de la interacción desde el punto de vista de la especificidad y la cinética. La purificación y secuenciación de las proteínas involucradas en el reconocimiento de estas señales serían posteriormente la clave para conocer en que clase de ácidos nucleicos están contenidos sus sitios blancos funcionales.

Los resultados obtenidos usando la región intergénica 5' del gen de *ptr-1* indicaron que las condiciones experimentales empleadas no permiten disecar las interacciones que intentábamos estudiar. Son diversas las variables plausibles de ser modificadas para resolver este problema; por ejemplo, naturaleza del competidor, detergentes, tamaño de sonda, etc.. En este caso, evidenciada la existencia de múltiples interacciones con la región intergénica en hebra simple, nosotros optamos por trabajar con sondas más pequeñas que pudieran representar motivos de reconocimiento de proteínas individuales.

La presencia de un largo trecho de dinucleótidos poli (dT-dG) había llamado la atención cuando se secuenció el *locus* tipo H de *T. cruzi*. Asimismo la abundancia de repetidos dinucleotídicos en las regiones intergénicas de *T. cruzi* es una característica que ha sido reportada en estos parásitos (Andersson y col., 1998). Estos antecedentes nos condujeron a preguntarnos si los dinucleótidos poli (dT-dG) constituyen señales específicas para el reconocimiento de proteínas que sean parte de una cascada de eventos en procesos biológicos relevantes. Usando como sonda los oligonucleótidos poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ en el EMSA encontramos factores presentes en el extracto nuclear que eran capaces de establecer interacciones con estas secuencias. Este resultado preliminar nos condujo a efectuar un análisis computacional para investigar si los motivos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n presentaban alguna particularidad genómica que ameritara su estudio ulterior.

Los repetidos dinucleotídicos poli [dT-dG]_n presentan una frecuencia y ubicación peculiar en el genoma de *T. cruzi*.

A pesar de que los proyectos genoma han revelado que las regiones intergénicas de los policistrones de los kinetoplastideos contienen abundantes repetidos de mononucleótidos y dinucleótidos no se ha podido establecer claramente aún su significado funcional. Los resultados de este trabajo confirman esta observación, encontrándose además que los repetidos de dinucleótidos, a excepción de poli [dC-dC]_n, poli [dC-dG]_n y poli [dG-dG]_n, se encuentran representados en números muy significativamente mayores a lo esperado. Este hecho puede atribuirse a fenómenos expansivos debidos a deslizamientos de hebra en la replicación o entrecruzamiento desigual durante la recombinación (Jeffreys y col., 1985). El hecho de que la ADN-polimerasa “resbale” parece ser debido a pausas en la replicación provocadas por estructuras secundarias complejas (conformación Z, estructuras cruciformes, horquillas, codos, triples y tetrahélices) adoptadas por estas regiones o a la presencia de complejos proteicos asociados (Wells, 1996; Weitzmann y col., 1996).

Por otro lado, se encontró una particular distribución de los repetidos de dinucleótidos a lo largo del contig. Su abundancia en las zonas transcripcionalmente activas y su ausencia donde cambia la dirección de transcripción sugiere una función vinculada a la regulación de la expresión a nivel cromosómico. La gran concentración de dinucleótidos repetidos poli [dA-dA]_n, poli [dT-dT]_n, poli [dA-dT]_n, tanto en el contig como en los genes individuales, podría vincularse con algún papel estructural del ADN. Se ha visto que las zonas ricas en A y T (Sinden, 1994) dan lugar a codos en el ADN que a menudo se encuentran en regiones que intervienen en la dinámica génica.

Cuando analizamos las secuencias de *T. cruzi* que flanquean las regiones codificantes y el contig de 93.4 Kb, encontramos que los motivos dinucleotídicos poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ no son una particularidad del *locus* H, sino que abundan en las en las regiones no codificantes. Por lo general se encuentran agrupados y rodeados de repetidos imperfectos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n. Mientras tanto en las regiones codificantes este par de repetidos (con $n > 4$) es muy escaso. Esto se explicaría tanto por su baja probabilidad estocástica y como por la presión selectiva a la que están sometidas las zonas codificantes. En términos aminoacídicos los repetidos de dinucleótidos dan lugar a motivos de alternancia de aminoácidos, Cys.Val para UGU.GUG y His-Thr para CAC.ACA, que no conforman ningún motivo conocido y que pueden incluso ser seleccionados en contra por razones estructurales y funcionales.

Es interesante señalar que los dinucleótidos poli [dT-dG]_n, aparecen entre los más abundantes en ambas bases de datos y presentan algunas particularidades importantes. Cabe recordar que estos repetidos son capaces de generar estructuras en el ADN de tipo Z y tetrahélicas (Sinden, 1994; Gaillard & Strauss, 1994). Por un lado, llama la atención el hecho de que están más representados en la base SI que en el contig, lo que podría indicar que estos motivos se concentran cerca de las regiones codificantes. Por otro lado, son los únicos tándem de dinucleótidos que muestran una marcada polaridad de hebra, estando significativamente más presentes en la hebra codificante. Esta propiedad los vuelve candidatos interesantes a ser señales blanco de proteínas cuya función depende del posicionamiento adecuado respecto a las hebras codificantes y no codificantes. Esta una propiedad característica de los factores que intervienen en la regulación de la expresión génica y en el procesamiento del ARN.

En los diferentes organismos, en forma independiente del contenido en GC de sus genomas, se ha visto una tendencia a que las zonas del promotor de los genes sean más ricas en GC. Los tripanosomátidos no se comportan de este modo lo que es acorde a la ausencia de promotores clásicos, claramente definidos (Alonso y col., 1992). Ha sido propuesto que las regiones 3' son responsables de la expresión específica de estadio (Nozaki & Cross, 1995). La presencia de regiones ricas en A y T en las zonas 3' respecto a las CDSs ha sido vinculada a la estabilización de los ARNm en varios organismos y muy recientemente en *T. cruzi* (Di Noia y col., 2000). El análisis de la frecuencia de repetidos imperfectos que compara las regiones 5' y 3' muestra que los repetidos de dinucleótidos poli [dA-dA]_n, poli [dT-dT]_n, poli [dA-dT]_n, son más abundantes en los 3' UTR, coincidiendo con su posible papel en la regulación de la expresión.

Los repetidos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n son blancos específicos para proteínas de unión a hebra simple.

En este trabajo reportamos la unión específica entre las proteínas presentes en los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi* y los oligonucleótidos con el motivo de repetidos poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅.

El uso de distintos competidores nos permitió establecer una jerarquía de especificidades para los diferentes complejos que fueron observados con cada sonda, permitiéndonos caracterizar sus especificidades estructurales y/o de secuencia. La competencia con ARNt y con ADN hebra simple tuvo como objeto estudiar el reconocimiento debido a afinidad por los ácidos nucleicos en hebra simple

independientemente de la secuencia. La especificidad por la secuencia nucleotídica se analizó compitiendo con oligonucleótidos del mismo tamaño y de composición aleatoria. Teniendo en cuenta el papel de las regiones polipirimidínicas en el procesamiento del ARNm se usó también el oligonucleótido poli[dT]₁₅. Por último, en este trabajo no se realizaron estrategias experimentales que permitieran analizar si las interacciones se deben al reconocimiento de estructuras complejas formadas por los oligonucleótidos.

Utilizando los criterios expuestos arriba nosotros encontramos tres complejos específicos, uno para la sonda poli [dC-dA]₁₅ (CA3) y dos para la sonda poli [dT-dG]₁₅ (TG1 y TG2).

Los experimentos con la proteína de *E. coli* de unión a hebra simple (SSBP) indicaron que las condiciones experimentales empleadas para caracterizar la especificidad de los complejos con las sondas oligonucleotídicas son adecuadas para estudiar la especificidad de secuencia de una proteína de unión a hebra simple. La incapacidad del oligonucleótido poli(dT)₁₅ de desplazar al complejo con SSBP podría deberse a que su tamaño es insuficiente para constituir un blanco para esta proteína.

La especificidad de los factores que reconocen a los dinucleótidos por la naturaleza del sustrato y por la secuencia podría ser estudiada más en profundidad. Con este propósito podrían llevarse a cabo experimentos de competencia con sondas de ARN con la secuencia repetida poli [rU-rG]₁₅ para distinguir la especificidad debida a la naturaleza del ácido nucleico. A partir de los resultados surge la posibilidad de estar en presencia de proteínas que reconozcan trechos de alternancia purinas-pirimidinas. Sin embargo, no se llevaron a cabo competencias con otros oligonucleótidos del tipo poli [dPu-dPy]₁₅, como poli [dC-dG]₁₅, poli [dA-dT]₁₅ para comprobar esta hipótesis, dado que en las condiciones ensayadas estas combinaciones de sondas forman dobles hebras y por lo tanto los resultados se tornan no informativos.

La naturaleza química de los factores responsables de las interacciones con los oligonucleótidos estudiados, fue analizada tratando los extractos con enzimas capaces de degradar sustratos de naturalezas diferentes. Los resultados demuestran claramente que dos de los complejos específicos (TG2 y CA3) son proteínas o contienen por lo menos un componente proteico que le confiere su capacidad de reconocer a estos motivos. Las condiciones del EMSA son particularmente adecuadas para la estabilización de interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos (Chandler 1992). Los retardos podrían deberse a la unión de una molécula de ARN muy estable, libre o formando parte de un

complejo ribonucleoproteico. Los resultados indican que esta última posibilidad no está teniendo lugar para ninguno de los complejos encontrados. La resistencia a la acción de la Proteinasa K mostrada por el complejo TG1, no elimina la posibilidad de que esté compuesto por proteínas. En primer lugar, porque podría no contener los sitios blanco para esta enzima. Si bien la proteinasa K es una proteasa muy activa y posee una amplia especificidad por sustrato, exhibe preferencias en su clivaje (Ebeling y col., 1974), no siendo capaz de degradar toda clase de proteínas. Se han reportado proteínas resistentes a esta serín proteasa; incluso ha sido usada para generar un corte único en una proteína nativa (Wolfe & Wicknet, 1984). En segundo lugar porque no se realizó un tratamiento proteolítico exhaustivo. Para confirmar la resistencia de estos complejos a esta actividad sería necesario usar un buffer que tenga Ca^{++} 1mM y no tenga EDTA, ajustar las condiciones de tiempo y temperatura para potenciar la actividad de la Proteinasa K. También deberían ensayarse otras enzimas proteolíticas.

Existen proteínas capaces establecer este tipo de interacciones en otras cepas de *T. cruzi*, en *T. brucei* y en otras especies.

El mismo patrón de migración observado en la cepa CL Brener fue obtenido cuando se usaron extractos nucleares de otras dos cepas diferentes: Y y Tulahuen. La aparente homología en los perfiles de retraso sugiere que las proteínas involucradas en estas interacciones son conservadas entre cepas y por lo tanto podrían ser de relevancia para la biología del parásito.

El hallazgo de un perfil similar de unión cuando se usaron extractos nucleares de *T. brucei*, apoyan aún más la idea de la posible importancia de estas proteínas.

Asimismo, la observación de diferentes tipos de retardos en el EMSA usando proteínas de diferentes especies indica que en todas ellas existen factores capaces de unirse con cierta especificidad a los motivos poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅. En bacterias esto no resulta sorprendente ya que se han caracterizado proteínas de unión a hebra simple (entre ellas la SSBP) así como la proteína RecA que se une preferentemente a estas secuencias. Se requerirían más estudios para confirmar si los complejos observados son realmente específicos de estas secuencias.

Los complejos específicos presentan propiedades fisicoquímica comparables a las descritas para proteínas reguladoras de la expresión génica.

El ensayo en geles de retardo con extractos nucleares ha sido usado para visualizar complejos ADN-proteína, proporcionando evidencia de la existencia de factores específicos para secuencias blanco definidas y estableciendo las bases para su purificación. Aunque los parámetros fisicoquímicos de estas interacciones solo pueden ser determinados en la presencia de proteínas puras, los extractos crudos permiten estudiar complejos multiproteicos y además hacen posible la estimación de las constantes funcionales de asociación y disociación (Lane y col., 1992). Como los extractos nucleares poseen muchas proteínas de unión al ADN, tanto o no secuencia específicas, no podemos excluir la existencia de interacciones complejas proteína-proteína que o incrementen o enmascaren la formación y el comportamiento fisicoquímico de los complejos en estudio. Por lo tanto, los parámetros determinados en estas condiciones deben ser conceptualizados como parámetros funcionales. Sin embargo, el uso de extractos crudos para la detección y caracterización preliminar de cinética y termodinámica, nos da una información que representa más fielmente la situación que está teniendo realmente lugar en la célula (Carey, 1991).

En primer lugar se estudió la actividad de unión en función de la concentración de proteínas para descartar relaciones de cooperatividad en la formación de los diferentes complejos. La aparente independencia observada hace posible los análisis cinéticos planteados en este trabajo. Sin embargo no podemos afirmar que utilizando una sonda de mayor tamaño este comportamiento se vea alterado, pudiendo representar incluso, un panorama más parecido al que ocurre *in vivo*. A concentraciones altas de extracto se ven efectos artefactuales probablemente causados por la viscosidad y la concomitante formación de agregados.

En segundo lugar los tres complejos específicos caracterizados presentan cinéticas de formación rápidas y dos de ellos mostraron cinéticas de disociación medibles por EMSA. Los resultados dieron lugar a la estimación de las constantes de equilibrio funcionales correspondientes que fueron de 10^9 M^{-1} para TG1 y de 10^{10} M^{-1} para el complejo CA3. El complejo TG2 tiene una cinética de formación similar, pero su velocidad de disociación es demasiado alta para permitir su correcta determinación por EMSA en las condiciones utilizadas. Si bien los resultados son preliminares, estos comportamientos cinéticos son compartidos por proteínas de unión al ADN vinculadas a la regulación de la expresión génica (Berg y col., 1988)., y por lo tanto las vuelven interesantes para su

ulterior purificación y caracterización. Además los análisis funcionales de este tipo tiene especial relevancia para comparar el papel estadio específico de estos complejos.

Los resultados obtenidos con la sonda poli [dT-dG]₁₅ y poli [dC-dA]₁₅ no son comparables. Hasta ahora no sabemos si las proteínas que intervienen en la formación de los complejos específicos son las mismas o no. Es posible que una única proteína esté involucrada en el reconocimiento de ambas sondas pero que presentara diferente afinidad por cada una. También podríamos estar en presencia de una proteína que reconozca el motivo poli Pu-Py y que entonces las diferencias se expliquen por la conformación particular que posea cada oligonucleótido. Un trabajo reciente del grupo de Dutreix, que estudia la preferencia de las proteínas de recombinación por las secuencias dinucleotídicas repetidas demuestra que el repetido poli [dT-dG]₁₅ tiene una estructura secundaria diferente a la del poli [dC-dA]₁₅ (Biet y col., 1999).

Una proteína de 40 kDa podría formar parte de los complejos específicos estudiados.

Los métodos de purificación empleados en esta tesis se basaron en las propiedades que mostraban las proteínas que componen los complejos específicos en el EMSA. La capacidad de unión a ADN en hebra simple fue utilizada en la cromatografía de afinidad con ADN bovino en hebra simple. La elusión de la actividad de unión a las sondas poli [dC-dA]₁₅ y poli [dT-dG]₁₅ a una concentración de KCl 500mM confirma que las proteínas presentan una afinidad alta por el ADN en forma de hebra simple. En esta fracción se recuperan las actividades específicas descritas. Esto podría implicar a la misma proteína formando parte de los diferentes complejos, o a varias proteínas con un grado de afinidad por el ADN en hebra simple similar. El hecho de que los complejos CA3 y TG2 se comporten de un modo similar frente a la proteinasa K apoya la primera posibilidad en este caso.

Los perfiles de SDS-PAGE indican que un polipéptido de alrededor de 40kDa está presente en forma mayoritaria en la fracción en la que eluyen las actividades específicas. Esta misma molécula es reconocida por la sonda oligonucleotídica poli [dT-dG]₁₅ en el ensayo de southwesternblot. Si bien el ensayo de southwesternblot ha sido ampliamente usado para identificar proteínas de unión al ADN específicas de secuencia, la titulación de la sonda puede deberse a la presencia de proteínas de alta afinidad al ADN en hebra simple no específicas de secuencia. En este sentido serían

necesarios ensayos posteriores en presencia de distintos competidores o agentes desestabilizantes para confirmar la especificidad del reconocimiento. De todos modos, en forma preliminar estos resultados en conjunto sugieren que esta proteína podría ser la responsable de la formación de por lo menos alguno de los complejos específicos.

Por otro lado la cromatografía de afinidad con los oligonucleótidos específicos, en particular con el poli [dT-dG]₁₅ demostró ser también una herramienta útil para la purificación. Como se esperaba, la actividad de unión TG2 eluyó a una fuerza iónica mayor que en la cromatografía de hebra simple. Disponemos de resultados preliminares que no se incluyen en este trabajo que indican que los perfiles de bandas en el SDS-PAGE son complejos, observándose varios polipéptidos en cada fracción, entre los cuales se observa uno de aproximadamente 40 KDa.

Por último, si bien los dos procedimientos cromatográficos utilizados demostraron ser adecuados para la purificación de las proteínas en estudio, la combinación de ambas aproximaciones proporcionaría una herramienta poderosa para la confirmación de su identidad en el SDS-PAGE y para su subsiguiente purificación. Sin duda el uso de técnicas convencionales de separación de proteínas es una estrategia a incorporar en el protocolo de purificación.

La proteína de 40 kDa purificada está siendo analizada por espectrometría de masa a fin de determinar exactamente su peso molecular, analizar su perfil de digestión y compararlo con las bases de datos existentes para buscar posibles homologías con proteínas de función conocida. De todos modos, la verificación de que la proteína purificada posea la actividad de unión específica a los motivos poli [dT-dG]₁₅ requerirá de la microsecuenciación, clonación del gen, expresión de la proteína recombinante y análisis posteriores por EMSA para demostrar las propiedades de reconocimiento caracterizadas.

Especulaciones acerca del posible rol de estos complejos.

Las regiones poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n tienen la capacidad de adoptar estructuras particulares de ADN, y pueden ser blanco para proteínas involucradas en la biogénesis y dinámica de los ácidos nucleicos.

Estas proteínas podrían estar involucradas en la maduración del ARNm. En los años recientes, se han identificado un grupo de proteínas de unión a ARN que se cree están relacionadas al procesamiento de ARN en los tripanosomátidos (Das y col., 1996; Pitula y col., 1998; Manger y col., 1998; Zhang y col., 1998). Las proteínas de unión al ARN son de relevancia crucial en la regulación de la expresión génica en estos parásitos, dado que la misma ocurre fundamentalmente a nivel post-transcripcional.

Los repetidos poli [dT-dG]_n se postulan como uno de los elementos recombinogénicos, que llevan a incrementos en los rearrreglos genómicos. Estas secuencias en hebra simple son reconocidas por la proteína recA (Dutreix, 1997) y por sus homólogos en otros organismos (Biet y col., 1999). Por lo tanto, la presencia de estas secuencias en las regiones intergénicas también podría significar señales de recombinación en caso de existir un sistema análogo al de Rec A en este parásito. Dada la plasticidad del genoma en los protozoarios kinetoplastideos, el estudio de las bases moleculares de la recombinación es un tema de gran interés (Gibson & Miles, 1986).

Por otro lado, las secuencias estudiadas pueden ser reconocidas por proteínas del grupo de "alta movilidad" o HMG (high mobility group) (Gaillard y Strauss, 1994). Las proteínas de esta clase intervienen en eventos de recombinación y transcripción (Bianchi, 1995). En *T. brucei* se ha reportado una proteína HMG con actividad de unión a un oligonucleótido Oct1 (Erondy y Donelson, 1991).

Finalmente, cabe la posibilidad de que estas secuencias estén relacionadas con el ensamblaje del complejo de transcripción. En eucariotas superiores los motivos poli dTG y poli dCA son capaces de potenciar el inicio de la transcripción cuando son colocadas en vectores de expresión con un gen testigo (Hamada y col., 1984). Los experimentos de EMSA usando los promotores de los genes VSG y PARP de *T. brucei* mostraron la presencia de actividades de unión a hebra simple sugiriendo que estos promotores necesitan estar en forma relajada para permitir la unión de la ARN polimerasa I, y el aparato de transcripción (Brown & Van der Ploeg, 1994; Janz y col., 1994). El inicio de la transcripción ha sido observado a partir de regiones intergénicas que son normalmente transcriptas como parte de los pre mensajeros policistrónicos (Kelly y col., 1991; Biebinger & Clayton, 1996). Se ha sugerido que la ARN polimerasa II tiene muy poca especificidad y que la transcripción puede deberse a la iniciación en múltiples sitios de baja afinidad a lo largo de la unidad policistrónica. De este modo la transcripción podría iniciarse azarosamente dentro de las regiones intergénicas ricas en ApT las cuales podrían

entrar en una apertura transitoria para permitir el ensamblaje del complejo de la ARN polimerasa II (Swindle 1996). En este contexto, las proteínas de unión a hebra simple podrían estar involucradas no sólo en la unión sino también en el mantenimiento de la forma abierta estable del ADN.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) Los elementos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n que están presentes en la región intergénica de *ptr1*, son reconocidos por proteínas de los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi*
- 2) Los elementos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n son abundantes en otras regiones intergénicas. Se encuentran formando agrupamientos y presentan una marcada polaridad de hebra.
- 3) Algunos factores contenidos en los extractos nucleares de epimastigotas de *T. cruzi* establecen interacciones específicas con ambos elementos.
- 4) Los complejos que resultan de estas interacciones están presentes en diferentes cepas de *T. cruzi*. Un perfil similar se observa cuando se usan extractos nucleares de *T. brucei*. Los elementos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n son también reconocidos por factores presentes otras especies distantes.
- 5) Los valores de los parámetros fisicoquímicos funcionales de las interacciones específicas son comparables con los reportados para proteínas reguladoras de la expresión génica.
- 6) Una proteína de 40 kDa que interacciona con el ADN en hebra simple fue parcialmente purificada y podría formar parte de alguno de los complejos específicos.

Teniendo en cuenta las diferentes funciones que han sido propuestas para los repetidos de dinucleótidos poli [dT-dG]_n y poli [dC-dA]_n, los resultados aquí presentados sugieren que los complejos caracterizados podrían ser de relevancia para la biología de este parásito.

BIBLIOGRAFÍA

- Aly, R., Argaman, M., Halman, S., Shapiro, M. (1994). **A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in leishmania.** *Nucleic Acids Res.* 22: 2922.
- Andersson, B., Aslund, L., Tammi, M., Tran, A.N., Hoheisel, J.D., Pettersson, U. (1998). **Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region.** *Genome Research* 8: 809-816.
- Batista, J.A.N., Texeira, S.M.R., Donelson, J.E., Kirchoff, L.V., Martins de Sa, C. (1994). **Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A) binding protein , its genes..** *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 301-12.
- Beberof, M., Vanhamme, L., Alexandre, S., Lips, S., Tebabi, P, Pays, E. (2000). **A single-stranded DNA binding protein shared by telomeric repeats, the variant surface glycoproteins transcription promoter and the procyclin transcription terminator of *Trypanosoma brucei*.** *Nucleic Acids Res.* 28: 597-604.
- Ben Amar M.F., Jefferies D., Pays A., Bakalara N., Kendall G., Pays E. (1991). **The actin gene promoter of *Trypanosoma brucei*.** *Nucleic Acids Res.* 19: 5857-5862.
- Benson, G. (1999). **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.** *Nucleic Acids Res.* 27: 573-580.
- Biet, E., Sun, J.S., Dutreix, M. (1999). **Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure.** *Nucleic Acids Research.* 27: 2.
- Brener, Z. , Chiari, E. (1963) **Variaciones morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*.** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 5: 220-224.
- Brown, S.D., Van der Ploeg, L.H. (1994). **Single-stranded DNA-protein binding in the procyclic acidic repetitive protein (PARP) promoter of *Trypanosoma brucei*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 65: 109-122.
- Campbell, D.A., Sturm, N.R., Yu, M.C. (2000). **Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene.** *Parasitol. Today.* 16: 78-82.
- Carey, J. (1991). **Gel retardation.** *Methods in Enzymol.* 208: 103-117.
- Castro, C., Hermindez, R., Castafieda, M. (1981). ***Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 975-982.
- Chen, J., Rauch, C. A., White, J.H., Englund, P.T., Cozzarelli, N.R. (1995). **The topology of the kinetoplast DNA network.** *Cell.* 80: 61-69.
- Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T., Santi, D.V. (1983). **Overproduction of a bifunctional thymidilate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2132-2136.
- Cross, A.M, Wirtz, E., Navarro, M., (1998). **Regulation of VSG expression site transcription and switching in *T. brucei*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 77-91.
- Das, A., Peterson, G.C., Kanner, S.B., Frevert, U., Parsons M. (1996). **A major tyrosine phosphorylated protein of *Trypanosoma brucei* is a nucleolar RNA-binding protein.** *J. Biol.*

Chem. 271: 15675-156781.

Dallagiovanna, B., Gamarro, F., Castanys, S. (1996). **Molecular characterization of a P-glycoprotein related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 75: 146-157.

De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D., Borst, P. (1984). **Comparison of the genes coding for the common 5' termini sequence of messenger RNAs in three trypanosome species.** *Nucleic Acids Res.* 12: 4431-4443.

De Souza, W., Meyer, H. (1974). **On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus.** *J Protozool.* 21: 48-52.

Di Noia, J.M., D'Orso, I., Sanchez, D.O., Frasch, A.C. (2000). **AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucyn type family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency.** *J. Biol. Chem.* 275: 10218-10227.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983). **Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.** *Nucleic Acids Res.* 11:1475-1489.

Dutreix, M. (1997). **(GT)_n repetitive tracts affect several stages of RecA- promoted recombination.** *J. Mol. Biol.* 273: 105-13.

Dvorak, J.A., Hall, T.E., Crane, M.S.J., Engel, J.C., McDaniel, J.P., Uriegas, R. (1982). ***Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence.** *J. Protozool.* 29: 430-437.

Edwards A., Hammond H., Jin L., Caskey C., Chakraborty R. (1992). **Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups.** *Genomics.* 12: 241-253.

Erondu, N.E., Donelson, J.E. (1992). **Differential expression of two mRNAs from a single gene encoding an HMG1-like DNA binding protein of African trypanosomes.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 111-118.

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., , Lang, H. (1974) **Proteinase K from *Tritirachium album* Limber.** *Eur. J. Biochem.* 47: 91-97.

Garat, B., Esperón, P., Picón, M., Ehrlich, R. (1998). ***Echinococcus granulosus*: Preparation of protein extracts from protoscolex nuclei for shift mobility assay.** *Parasitol. Res.* 84: 598-600.

Garat, B. (1999). **An experiment illustrating DNA-Protein interactions using nuclear extracts from chicken erythrocytes.** *Biochem. Education* 27: 55-59.

Garat, B. (1995). **Aproximación molecular al estudio de la diferenciación y desarrollo de *Echinococcus granulosus*.** Tesis de Doctorado PEDECIBA.

Gaillard, C., Strauss, F. (1994). **Association of poly(CA).poly(TG) DNA fragments into four-stranded complexes bound by HMG1 and 2.** *Science.* 264: 433-436.

Glantz, S.A. (1982). ***Primer of Biostatistics.*** Mc Graw Hill, NY.

Gory, S., Dalmon, J., Prandini, M.H., Kortulewski, T., De Launoit, Y., Huber, P. (1998) **Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription.** *J. Biol. Chem.* 20: 6750-6755.

Hamada, H., Seidman, M., Howard, B.H., Gorman, C.M. (1984). **Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence.** *Mol. Cell. Biol.* 4: 2622-2630.

- Hartshorne, T., Agabian, N. (1993). **RNA B is the major nucleolar rimethylguanosine-capped small nuclear RNA associated with fibrillarin and pre-rRNAs in *Trypanosoma brucei*.** *Mol. Cell Biol.* 13: 144-54.
- Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R., Franke, B., Cazzullo, J.J., Frasch, A.C.C., Pettersson, U. (1990). **Chromosomal localization of seven cloned antigens provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 213-224.
- Henriksson, J., Aslund, L., Pettersson, U. (1996). **Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitology Today.* 12: 108 - 114.
- Hong, S.B., Kim, S.J., Noh, M.J., Lee, Y.M., Kim, Y., Yoo, O.J. (1997) **Identification of the transcription termination site of the mouse nkx-1.2 gene: involvement of sequence-specific factors.** *Gene* 198: 373-378.
- Hotz, H., Beibinger, S., Flaspohler, J., Clayton, C. (1998). **PARP gene expression: control at many levels.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 131-143.
- Hug, M., Hotz, H.R., Hartmann, C., Clayton, C. (1993). **Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor.** *Mol. Cell Biol.* 14: 7428-7435.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M. (1993). **Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*.** *Genes Dev.* 7: 996-1007.
- Lee M.G. (1996). **An RNA polymerase II promoter in the hsp70 locus of *Trypanosoma brucei*.** *Mol. Cell Biol.* 16: 1220-1230.
- Lee, M.G., Van der Ploeg, L.H. (1997). **Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I.** *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 463-489.
- Lu.Q., Wallrath, L., Granok, H., Elgin.S. (1993) **(CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene.** *Mol. Cell Biol.* 13, 2802-2814.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C. (2000). **A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA.** *RNA.* 6: 163-169.
- Manger, I.D., Boothroyd, J.C. (1998). **Identification of a nuclear protein in *Trypanosoma brucei* with homology to RNA-binding proteins from cis-splicing systems.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 97: 1-11.
- McDaniel, J.P., Dvorak, J .A. (1993). **Characterization of naturally-occurring** Identification, isolation and of *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57: 213-222..
- Metzenberg S., Joblet, C., Verspieren, P., Agabian, N. (1993). **Ribosomal protein L25 from *Trypanosoma brucei*: phylogeny and molecular co-evolution of an rRNA-binding protein and its rRNA binding site.** *Nucleic Acids Res.* 21: 4936-4936.
- Miskimins, W.K., Roberts, M.P., McClelland, A., Ruddle, F.H. (1985). **Use of a protein-blotting procedure and a specific DNA probe to identify nuclear proteins that recognize the promoter region of the transferrin receptor gene.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 82: 6741-6744.
- Myler, P.J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Lemley, C., Magness, C. Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien P., Guoliang, F., Ivens, A., Stuart K. (1999). ***Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 96: 2902-2906.

- Nozaki, T., Cross, G.A. (1995). **Effects of 3' untranslated intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 75: 55-67.
- Palfi, Z., Bindereif, A. (1992). **Immunological characterization and intracellular localization of trans-spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins in *Trypanosoma brucei*.** *J. Biol. Chem.* 267: 20159-63.
- Pardue, M.L., Lowenhaupt, K., Rich, A., Nordheim, A. (1987). **(dC-dA)_n (dG-dT)_n sequences have evolutionarily conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function.** *EMBO J.* 6: 1781-1789.
- Parsons, M., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Nel, A.E., Kanner, .B. (1994). **Developmental regulations of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosin/serin kinase activity in *Trypanosoma brucei*.** *Mol. Biochem. Parasitol,* 63: 69-78.
- Pham, V.P., Rothman, P.B., Gottesdiener, K.M. (1997). **Binding of trans-acting factors to the double-stranded variant surface glycoprotein (VSG) expression site promoter of *Trypanosoma brucei*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 11-23.
- Pinto Dias, J.C., Deane, M.P., Brener, Z. (1991). ***Trypanosoma cruzi* e a doenca de Chagas: A doenca.** Cap 12 en "Parasitologia. Parasitos e doencas parasitarias do homen nas Americas e na Africa. De. Luis Rey. Guanabara Koogan S:A: Rio de Janeiro.
- Pitula, J., Ruyechan, W.T., Williams, N. (1998). ***Trypanosoma brucei*: identification and purification of a poly(A)-binding protein.** *Exp. Parasitol.* 88: 157-160.
- Priest, J. W., Hajduk, S. L. (1994) **Developmental regulation of *Trypanosoma brucei* cytochrome C reductase during bloodstream to procyclic differentiation.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 65: 291.
- Richards R, Holman .K., Yu.S., Sutherland,G. (1993). **Fragile X syndrome unstable element, p(CCG)_n, and other simple tandem repeat sequences are binding sites for specific nuclear proteins.** *Hum. Mol. Genet.* 2: 1429-1435.
- Robello, C., Navarro, P., Castanys, S., Gamarro F (1997). **A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 90: 525-535.
- Robello, C., Dallagiovanna, B., Engel, J.C., Gamarro, F., Castanys, S. (1998). **A new member of YER057c family in *Trypanosoma cruzi* is adjacent to an ABC ransporter.** *Gene,* 220: 1-12.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (Eds.) (1989). ***Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schurch, N., Hehl, A., Vasella, E., Braun, R., Roditi, Y. (1994). **Accurate polyadenilation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich element in the intergenic regions.** *Mol. Cell. Biol.* 14: 3668-3675.
- Shaw, J.M., Feagin, J.E., Stuart, K., Simpson, L. (1988). **Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons.** *Cell.* 53: 401-411.
- Simpson, L. (1987). **The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conumdroms and their solutions.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 86:133-141.
- Stone, S.R., Hughes, M.J., Jost, J.P. (1991). **Qualitative and Quantitative Studies of Protein-DNA Interactions by Gel Mobility-Shift Assay.** *BioMethods.* 5: 163-183.
- Stuart, K. (1991). **RNA editing in *trypanosomatid* mitochondria.** *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 327-

344.

Teixeira, S.M. (1998). **Control of gene expression in *Trypanosomatidae***. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1503-1516.

Tittawella, I. (1993). **Identification of DNA-binding proteins in the parasitic protozoan *Crithidia fasciculata* and evidence for their association with the mitochondrial genome**. *Exp. Cell. Res.* 206: 143-51.

Torri, A. F., Bertrand, K. L., Hajduk, S. L. (1993). **Protein stability regulates the expression of cytochrome C during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei***. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57: 305-315.

Tracy, R.B., Baumohl, J.K., Kowalczkowski, S.C. (1997). **The preference for GT-rich DNA by the yeast Rad51 protein defines a set of universal pairing sequences**. *Genes Dev.* 15: 3423-3431.

Ullu, E., Tschudi, C., Giinzi, A. (1996). **Trans-splicing in *trypanosomatid* protozoa**. Pag.: 115-133, en "Molecular biology of parasitic protozoa". D.F. Smith y M. Parsons (Eds). IRL Press, Oxford University Press.

Vanhamme, L., Pays, E. (1995). **Control of gene expression in trypanosomes**. *Microbiological reviews.* 59: 223-240.

Vanhamme, L., Poelvoorde, P., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H. y Pays, E. (2000). **Differential RNA elongation controls variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei***. *Molecular Microbiology.* 36: 328-340.

Vinson, R.V., LaMarco, K.L., Johnson, P.F., Landschulz, W.H., McKnight, S.L. (1988). **In situ detection of sequence specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage**. *Genes Dev.* 2: 801-806.

Webb, J.R., McMaster, W.R. (1993). **Molecular cloning and expression of of a *Leishmania major* gene encoding a single-stranded DNA-binding protein containing nine "CCHC" zinc finger motifs**. *J. Biol. Chem.* 268: 13994-4002.

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990). **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4576-4579.

Wolfe, P.B., Wicknet, W. (1984) **Bacterial leader peptidase, a membrane protein without a leader peptide, uses the same export pathway a presecretory proteins**. *Cell.* 36: 1067-1072.

Wong, A.K., Curotto de Lafaille, M.A., Wirth, D.F. (1994). **Identification of a cis-acting gene regulatory element from the *lemdr1* locus of *Leishmania enriettii***. *J. Biol. Chem.* 42: 26497-26502.

The World Health Organization. (1998). **Control of Chagas disease**. Geneva.

Zhang, J., Ruyechan, W.T., Williams, N. (1998). **Developmental regulation of two nuclear RNA binding proteins, p34 and p37, from *Trypanosoma brucei***. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92: 79-88.

Yee, H., Wong, A., van den Sande, J., Rattner, J. (1991). **Identification of novel single-stranded d(TC)_n binding proteins in several mammalian species**. *Nucleic. Acids Res.* 19: 949-953.

Xu, C., Hines, J.C., Engel, M.L., Russel, D.G., Ray, D.S. (1996). **Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the *trypanosomatid* *Crithidia fasciculata***. *Mol. Cell. Biol.* 16: 564-76.