

TESIS DE DOCTORADO

PEDECIBA

Área Biología



**Estudio de la función de TcRBP19 en la expresión
génica de *Trypanosoma cruzi***

Orientador: Dra. Beatriz Garat

Co-orientador: Dr. Bruno Dallagiovanna

Leticia Pérez-Díaz

Facultad de Ciencias, UdelaR

Diciembre, 2012

Gracias....

...A Beatriz por la oportunidad y la confianza que ha depositado en mí. Por todo el apoyo y por toda la ayuda. Por su invaluable dedicación, y porque a pesar de todos los problemas y compromisos, siempre tuvo un momento para escucharme y para darme aliento cuando las cosas no “caminaban” y para alentarme también en los buenos momentos. También gracias por las enriquecedoras discusiones. Por su cariño y buena onda, y por hacerme sentir desde el primer día parte de la gran familia del LIM generando un inigualable ambiente de trabajo.

A Bruno y a María Ana por su apoyo ya desde el inicio del trabajo, cuando aún comenzaba con mi trabajo de graduación. Por todo lo que me enseñaron.

A mis compañeros del LIM que compartieron el día a día a lo largo de este trabajo, a Lucía, Pablo, Caro, Rafa, Santiago, Lore y Guggeri. Por las reuniones (académicas) de “vinito”, por los mates, por las charlas. Todos ellos (junto con Fiona) han contribuido de las más diversas maneras con la gestación de este trabajo. También a los “amigos de la casa”: a los vecinos de BMV, en especial a Marcel y a Titi; a Méndez y su lab; a Carmen por endulzarnos el alma y el estómago; a Laura por las clases de inglés más divertidas. A todos los compañeros de Bioquímica y del IQB.

A ANII, CSIC, PEDECIBA por el apoyo económico recibido.

A mi familia toda, por todo su apoyo desde siempre. En especial a mis hijas Paula y Agustina por sobrevivir a estos últimos meses de escritura de tesis, a ellas va dedicado este trabajo...

Resumen del trabajo presentado

TcRBP19 es una proteína exclusiva de kinetoplastidos que se había identificado en *Trypanosoma cruzi* en el transcurso de nuestro trabajo previo. Dicha proteína presenta un motivo de unión al ARN del tipo RRM y posee actividad de unión al ARN *in vitro* discriminando entre diferentes ribosondas. TcRBP19 se expresa diferencialmente a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi* detectándose únicamente en el estadio amastigota del parásito y sólo en muy bajos niveles. En un parásito donde la regulación de la expresión génica se da básicamente a nivel *post*-transcripcional, el estudio de la funcionalidad de proteínas de unión al ARN es particularmente relevante para revelar y entender los posibles mecanismos peculiares subyacentes. Con el fin de contribuir con la comprensión de la regulación *post*-transcripcional en este organismo nos centramos por un lado en el análisis de la función de TcRBP19, y por otro lado, en entender los mecanismos responsables de su regulación a lo largo del ciclo de vida. En primer lugar se analizó el efecto de la expresión ectópica de la proteína TcRBP19 sobre el desarrollo del ciclo de vida. Se encontró que la expresión forzada de TcRBP19 en epimastigotas provoca una disminución significativa en la tasa de metaciclogénesis. Por otro lado, aunque el número de amastigotas intracelulares por célula infectada no se vio afectado, se constató que la sobreexpresión de TcRBP19 afecta la tasa de infección de los metacíclicos transfectantes, teniendo éstos una capacidad disminuída de infección de nuevas células. En base a estos hechos se propone una función de TcRBP19 en el progreso del ciclo de vida de *T. cruzi*. A través de análisis por inmunofluorescencia se constató que TcRBP19 exhibe una localización subcelular citoplasmática con un patrón difuso. Más precisamente, por fraccionamiento subcelular, se determinó que esta proteína se asocia en el citoplasma a los polisomas. Estos resultados sugieren una función de TcRBP19 en la modulación de mecanismos de localización polisomal de ARNm para ser traducidos, o en la modulación del propio proceso de traducción. Se analizaron los ARNm traducionalmente activos que estaban alterados como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19 mediante análisis del transcriptoma tanto de epimastigotas como de amastigotas. Se observó que los transcritos afectados identificados no son los mismos en los dos estadios por lo cual se propone que TcRBP19 estaría participando en diferentes cascadas regulatorias involucrando factores auxiliares estadio específicos. Mediante cromatografías de afinidad, se identificaron algunas proteínas que serían capaces de interactuar con TcRBP19. Entre ellas se destaca un grupo de proteínas que podrían intervenir en el proceso de invasión y supervivencia del parásito en la célula hospedera y una proteína asociada al proceso de elongación de la traducción. Se identificaron además los ARN blanco de TcRBP19. Se demostró que TcRBP19 es capaz de unirse a su propio ARNm sugiriendo la existencia de un posible mecanismo de auto-regulación. Esta interacción se da a través de la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*. Por otro lado, ensayos con genes reporteros demostraron que la región 3'UTR de *tcrbp19* confiere regulación diferencial a lo largo del ciclo de vida. Finalmente se constató que la expresión ectópica de TcRBP19 afecta negativamente la estabilidad de diferentes ARNm blanco testados en epimastigotas.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la hipótesis de que TcRBP19 cumple un rol en el control de la expresión génica de jerarquía alta o temprana, probablemente modulando procesos que afectan el desarrollo del ciclo de vida del parásito. A su vez, experimentos aquí presentados, indican que la proteína TcRBP19 cumple una función auto-reguladora negativa que contribuye a asegurar el bajo nivel de proteína en la forma epimastigota, necesario para que se mantenga un desarrollo eficiente del ciclo de vida. Los resultados obtenidos también permiten proponer un modelo que ayuda a explicar por qué, a pesar de la existencia de transcripción constitutiva en *T. cruzi*, los niveles de TcRBP19 en epimastigotas son indetectables. Este modelo considera que TcRBP19, mediante su unión a la región 3'UTR del ARNm que la codifica interaccionaría directa o indirectamente tanto con factores de la traducción, aplacando la producción de proteína, como de degradación del ARNm *tcrbp19* que está siendo traducido, evitando así nuevas rondas traduccionales.

El trabajo aquí presentado ha dado lugar a los siguientes manuscritos:

- *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of an RNA binding protein differentially expressed in the parasite life cycle. **Leticia Pérez-Díaz**, María Ana Duhagon, Pablo Smircich, José Sotelo-Silveira, Carlos Robello, Marco Aurelio Krieger, Samuel Goldenberg, Noreen Williams, Bruno Dallagiovanna and Beatriz Garat. **Experimental Parasitology**. (2007) 117: 99–105.
- The overexpression of the trypanosomatid exclusive TcRBP19 RNA binding protein affects the cellular infection of *Trypanosoma cruzi*. **Leticia Pérez-Díaz**, Alejandro Correa, Mariana P. Moretão, Samuel Goldenberg, Bruno Dallagiovanna and Beatriz Garat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. (2012). Aceptado para su publicación
- Evidence for a Negative Feedback Control Mediated by the 3' Untranslated Region Assuring the Low Expression Level of the RNA Binding Protein TcRBP19 in *T. cruzi* Epimastigotes. **Leticia Pérez-Díaz**, Lucía Pastro, Pablo Smircich, Bruno Dallagiovanna and Beatriz Garat. 2012. Sometido

1	Introducción.....	8
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas	9
1.2	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	10
1.3	Organización estructural del parásito	15
1.4	Organización genómica de <i>T. cruzi</i>	18
1.5	Organización proteómica de <i>T. cruzi</i>	20
1.6	Transcripción y maduración de ARNm.....	21
1.6.1	Regulación de la transcripción y maduración en tripanosomátidos.....	24
1.7	Etapas de procesamiento <i>post</i> -transcripcional y su regulación	25
1.7.1	Transporte núcleo-citosol en la regulación <i>post</i> -transcripcional.....	27
1.7.2	Rutas de degradación de ARNm.....	27
1.7.3	Localización subcelular de ARNm.....	29
1.7.4	Regulación de la traducibilidad de los ARNm	29
1.8	Elementos en <i>cis</i> y regulones <i>post</i> -transcripcionales	30
1.9	Proteínas de unión al ARN	31
1.10	El dominio RRM.....	34
1.10.1	Proteínas de unión al ARN en <i>T. cruzi</i>	35
2	Antecedentes.....	38
3	Objetivos.....	42
3.1	Objetivo General	43
3.2	Objetivos específicos.....	43
4	Materiales y Métodos.....	44
4.1	Células	45
4.1.1	Bacterias competentes.....	45
4.1.2	Parásitos.....	45
4.1.3	Células de mamíferos.....	45
4.2	Vectores plasmídicos	45
4.2.1	Vectores de clonado.....	45
4.2.2	Vector de expresión de GST-TcRBP19.....	46
4.2.3	Vectores de transfección de <i>T. cruzi</i>	46
4.3	Soluciones y tampones	47
4.4	Medios de cultivo	49
4.5	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i>	50
4.5.1	Cultivo de estadio epimastigota.....	50
4.5.2	Metacicloogénesis <i>in vitro</i>	50
4.5.3	Amastigogénesis <i>in vitro</i>	50
4.5.4	Amastigogénesis en células de mamíferos	51
4.6	Manipulación de bacterias.....	52
4.6.1	Cultivo de bacterias.....	52
4.6.2	Preparación de células competentes y transformación	52

4.7	Aislamiento de ácidos nucleicos	52
4.7.1	Aislamiento de ADN genómico de parásitos	52
4.7.2	Aislamiento de ADN plasmídico	53
4.7.3	Aislamiento de ARN total de parásitos	53
4.7.4	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	54
4.8	Electroforesis de ácidos nucleicos	54
4.8.1	Electroforesis en geles de agarosa	54
4.8.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	55
4.9	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	55
4.10	Reacción de transcripción inversa	55
4.11	PCR cuantitativo (PCR en tiempo real).....	56
4.12	Secuenciación de ADN	58
4.13	Preparación de proteínas.....	58
4.13.1	Obtención de la proteína GST-TcRBP19 recombinante	58
4.13.2	Obtención de proteínas totales de parásitos.....	59
4.13.3	Cuantificación de proteínas	59
4.13.4	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes: SDS PAGE.....	59
4.14	Ensayos de <i>Western blot</i>	60
4.15	Fraccionamiento subcelular y análisis de polisomas	61
4.16	Marcado radiactivo de ácidos nucleicos	62
4.17	Clonado de regiones 3'UTR de genes seleccionados en el GST-pull down de ARN	64
4.18	Clonado de la región 5'UTR del ARNm <i>tcrbp19</i>	64
4.19	Construcción de vectores de transfección de <i>T. cruzi</i>	65
4.19.1	Clonado de la región 3'UTR de <i>tcrbp19</i> corriente abajo del gen reportero <i>cat</i>	65
4.19.2	Construcción de la fusión TcRBP19-TAP-tag.....	66
4.20	Condiciones de electroporación y selección de transfectantes.....	66
4.21	Análisis de expresión del gen reportero <i>cat</i>	67
4.21.1	Cuantificación del ARNm <i>cat</i>	67
4.22	Análisis de estabilidad de ARNm <i>tcrbp19</i> en parásitos transfectantes	67
4.23	Técnicas inmunológicas	68
4.23.1	Purificación del antisuero anti-TcRBP19	68
4.23.2	Inmunohistoquímica	69
4.24	Técnicas de estudio de interacciones proteína-proteína.....	70
4.24.1	Cromatografía de afinidad con GST-TcRBP19 unida a Affi Gel-10™	70
4.24.2	Inmunoprecipitación de proteínas.....	70
4.24.3	GST-pull down de proteínas	72
4.24.4	Purificación de proteínas asociadas a TcRBP19 en <i>tandem</i> de afinidad.....	72
4.24.5	Precipitación de proteínas con TCA y acetona.....	74
4.25	Identificación de proteínas por espectrometría de masas	74
4.26	Técnicas de análisis de interacción ARN-proteína	75
4.26.1	Inmunoprecipitación de ARN	75
4.26.2	GST-pull down de ARN	75
4.27	Microarreglos de ADN.....	76
4.27.1	Preparación de ARN para hibridación en microarreglos de ADN.	76
4.27.2	Hibridación en microarreglos de ADN.....	77
4.28	Ensayo de cambio de movilidad electroforética de ARN (REMSA).....	80
4.29	Análisis computacional.....	81
5	Resultados y Discusión.....	83

5.1	Análisis de aproximaciones de genética reversa para el estudio de la función de TcRBP19.....	84
5.2	Análisis del efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 en el ciclo de vida del parásito	87
5.3	Análisis de la localización subcelular de TcRBP19.....	93
5.3.1	Asociación polisomal de TcRBP19 en epimastigotas transfectantes	94
5.4	Efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 en el transcriptoma de <i>T. cruzi</i>	97
5.4.1	Análisis del transcriptoma de epimastigotas que sobreexpresan TcRBP19	98
5.4.2	Análisis del transcriptoma de amastigotas que sobreexpresan TcRBP19	103
5.5	Identificación de las de las proteínas de unión a TcRBP19	111
5.5.1	Cromatografía de afinidad de TcRBP19 acoplada a Affi Gel-10™	111
5.5.2	GST-pull down de proteínas	111
5.5.3	Identificación de proteínas de unión a TcRBP19 mediante afinidad en <i>tandem</i> : TAP-tag	112
5.5.4	Inmunoprecipitación de proteínas de unión a TcRBP19.....	115
5.5.5	Resumen de las posibles interacciones de TcRBP19 con proteínas de epimastigotas	120
5.6	Identificación de los ARN blanco de unión de TcRBP19	127
5.6.1	Identificación de los ARNm que interaccionan con TcRBP19 en epimastigotas.....	128
5.6.2	Identificación de los ARNm que interaccionan con TcRBP19 en amastigotas.....	133
5.7	Identificación de las regiones regulatorias reconocidas por TcRBP19	145
5.7.1	Delimitación de las regiones UTRs de los genes blanco de TcRBP19 seleccionados en el estadio amastigota	145
5.7.2	Interacción <i>in vitro</i> de la proteína TcRBP19 con regiones 3'UTR de tres genes seleccionados.....	148
5.7.3	Interacción de la proteína TcRBP19 con elementos ricos en U	151
5.8	Análisis de la función regulatoria de la región 3'UTR de <i>tcrbp19</i>	154
5.8.1	Cuantificación del ARNm reportero <i>cat</i>	154
5.9	Efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 en la estabilidad de los ARNm blanco	157
6	Conclusiones y Perspectivas	162
7	Bibliografía	168
8	Anexo	203
	Cebadores utilizados.....	204
	Análisis de los cebadores utilizados en qPCR	205
	Abreviaturas.....	210

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI* Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Tripanosomiasis Americana ó enfermedad de Chagas fue descubierta hace un siglo por el Dr. Carlos Chagas [1]. El agente causante de esta enfermedad es el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi* perteneciente a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida. *T. cruzi* es un organismo unicelular digenético, que se transmite al hospedero mamífero donde se desarrolla la patología, principalmente a través de insectos triatominos hematófagos que funcionan como vectores [2]. Además de este mecanismo natural de transmisión, la infección puede ser congénita, por transfusión sanguínea, por trasplante de órganos e incluso por transmisión oral por contaminación de la ingesta con heces del vector [3-5].

T. cruzi constituye una población muy heterogénea que consiste en un gran número de cepas con diferentes características relacionadas con la morfología, la tasa de crecimiento, las curvas de parasitemia, virulencia, patogenicidad, sensibilidad a drogas, perfil antigénico, etc. [6]. La gran diversidad genética observada entre las diferentes cepas y aislados de *T. cruzi* permitieron en un inicio, agrupar las poblaciones de parásitos en dos grandes grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Actualmente, existe un consenso internacional que reconoce la existencia de 6 cepas principales: *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* III, *T. cruzi* IV, *T. cruzi* V y *T. cruzi* VI [7,8].

La enfermedad de Chagas constituye un problema prevalente de salud en América Latina y es localmente transmitida en Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, Méjico, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela. Con el objetivo de disminuir la transmisión vectorial y transfusional, en 1991, la Organización Panamericana de la Salud lideró un plan para eliminar el vector de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas. Ya en 1997, Uruguay fue certificado por haber logrado el objetivo, al ser declarado país libre de transmisión de Chagas [9,10]. Se estima que entre 15 y 18 millones de personas en el mundo están afectadas por esta potencialmente letal enfermedad que afecta el sistema cardiovascular, gastrointestinal y nervioso en el hospedero humano. De este gran número de personas afectadas, se estima que 50 mil mueren cada año por complicaciones en las fases aguda y crónica de la enfermedad. Debido a las altas tasas migratorias desde zonas endémicas hacia zonas no endémicas, el número de casos ha ido aumentando en Europa, Estados Unidos y el oeste del Pacífico. Este incremento se debe mayoritariamente a los riesgos adicionales de transmisión a través de transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos (**FIGURA 1.1.1**) [11,12].

Las tasas de contaminación en los bancos de sangre de algunas ciudades del continente americano varían del 3% hasta casi el 53%, indicando que la prevalencia de sangre contaminada por *T. cruzi* puede exceder la prevalencia de los virus VIH y Hepatitis B y C en los *stocks* de bancos de sangre (http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB124/B124_17-en.pdf). Por otro lado, en América Latina, la

enfermedad de Chagas provoca más muertes por año que cualquier otra enfermedad transmitida por parásitos, incluyendo la malaria [13]. La enfermedad de Chagas ha sido clasificada como una enfermedad tropical “descuidada” (*neglected tropical disease*), dado que no existen vacunas disponibles. De hecho, a más de 100 años del descubrimiento de la enfermedad, los tratamientos disponibles aún se basan en dos drogas de amplio espectro y de eficacia limitada debido a la resistencia desarrollada de parte del parásito y efectos secundarios severos ocasionados por la alta toxicidad de las mismas (www.who.int/mediacenter/factsheets/fs259/en/).

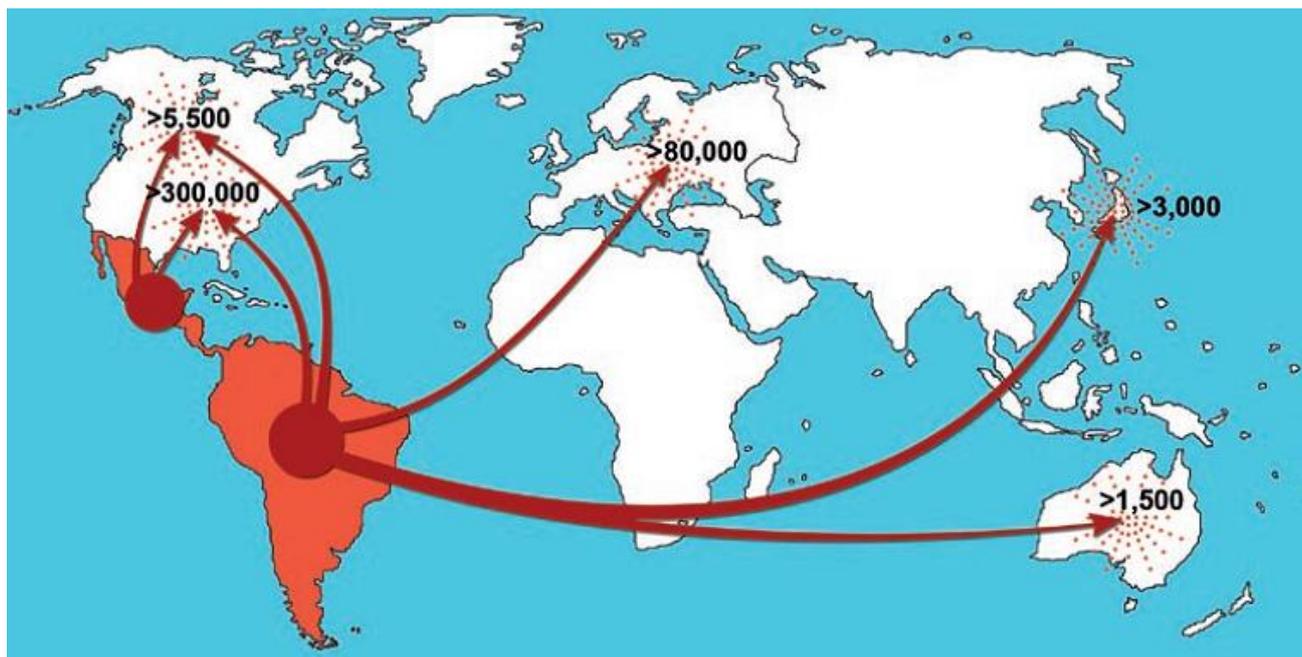


FIGURA 1.1.1 Rutas de migración desde América Latina y estimación del número total de individuos infectados en países no endémicos. Extraído y modificado de Coura y cols. [14].

1.2 CICLO DE VIDA DE *T. CRUZI*

T. cruzi tiene un ciclo de vida complejo que transcurre entre dos hospederos (insectos triatominos y mamíferos, incluyendo seres humanos) y al menos cuatro estadios de desarrollo bien diferentes entre sí (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas sanguíneos y amastigotas, **FIGURA 1.2.1**).

El ciclo comienza cuando el insecto ingiere la sangre del hospedero mamífero conteniendo tripomastigotas infectivos circulantes. En el insecto, los tripomastigotas se diferencian hacia la forma **epimastigota** que es capaz de replicarse. En la parte final del tracto digestivo, los epimastigotas se transforman en **tripomastigotas metacíclicos** infectivos que no son capaces de dividirse y que son eliminados en las heces del insecto. Los tripomastigotas metacíclicos tienen gran movilidad y pueden invadir la piel dañada o las mucosas incluyendo el tracto digestivo [15]. Una vez en el mamífero, los tripomastigotas se internalizan en

las células en vacuolas endocíticas conocidas como *vacuolas parasitóforas*. Luego de la acidificación del medio, y a medida que los tripomastigotas se van diferenciando, el parásito comienza a secretar la proteína lítica TcTox que en conjunto con la actividad *trans*-sialidasa lleva a la ruptura gradual de la vacuola parasitófora y a la liberación de los parásitos en el citoplasma [16]. Una vez libres en el citoplasma, los parásitos disminuyen su tamaño y sufren dramáticos cambios morfológicos que culminan en la formación de **amastigotas** replicativos que proliferan en el citoplasma de la célula hospedera por 5 a 6 días hasta que ocupan la mayoría del volumen citoplasmático celular [17,18]. En esta etapa, los amastigotas dejan de replicarse y, por algún estímulo aún no caracterizado, comienzan a diferenciarse en tripomastigotas no replicativos que pueden romper la membrana plasmática [2,19,20]. Se ha demostrado la existencia de una forma tipo epimastigota intracelular que constituiría un intermediario obligatorio entre la diferenciación de amastigotas a tripomastigotas dentro de la célula hospedera [21].

Tras la ruptura de la membrana plasmática, los **tripomastigotas sanguíneos** son libres para infectar células vecinas, diseminarse a otros órganos, o ser capturados por otro insecto vector que se alimente con sangre contaminada. En la sangre contaminada puede haber también amastigotas que fueron liberados prematuramente de las células infectadas o derivados de la diferenciación extracelular de los tripomastigotas sanguíneos. Estos amastigotas también pueden infectar otro mamífero u otras células del mismo hospedero [22-28]. Estas formas del parásito participan en una estrategia alternativa de proliferación en el hospedero mamífero y pueden contribuir a la persistencia de la infección [17,29,30]. Como parásito intracelular obligado en el hospedero vertebrado, la localización intracelular de *T. cruzi* es un proceso crítico para el establecimiento y permanencia de la infección.

En el laboratorio, se cultivan de forma rutinaria parásitos en su forma epimastigota replicativa. El proceso de metaciclologénesis puede simularse *in vitro* en condiciones de estrés nutricional [31-33]. Estos metacíclicos pueden usarse para infectar monocapas de células de mamíferos para obtener amastigotas celulares. Existen además disponibles, protocolos para generar amastigotas *in vitro* a mayor escala [34]. Estos amastigotas generados en cultivo axénico, también conocidos como “esferomastigotas”, son bastante similares morfológicamente a los amastigotas obtenidos por infección de líneas celulares de mamíferos (intracelulares) aunque existen diferencias en el perfil de las proteínas y glicoproteínas [35].

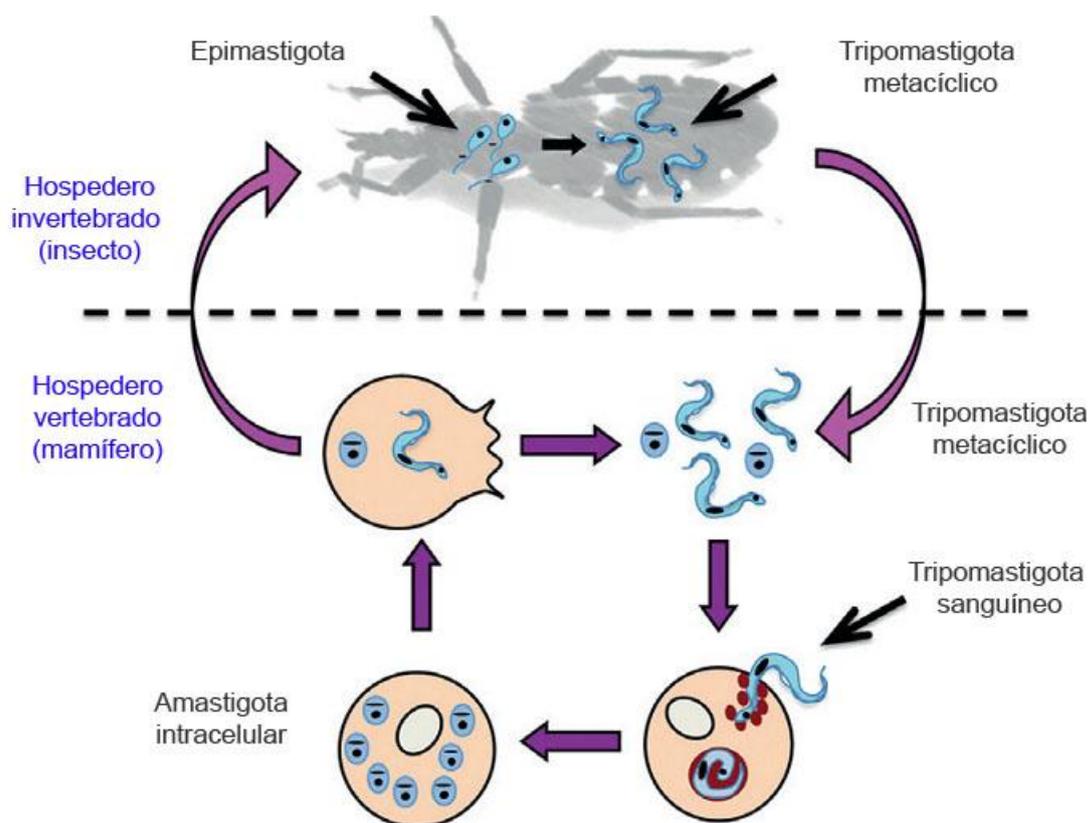


FIGURA 1.2.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Los tripomastigotas metacíclicos provenientes de los epimastigotas en el insecto vector son transmitidos al hospedero mamífero a través de las heces. Una vez en el mamífero, los tripomastigotas invaden células y son internalizados en una vacuola derivada del lisosoma (vacuola parasitófora). Dentro de la vacuola, los tripomastigotas comienzan su diferenciación a amastigotas (2-8 horas) hasta que comienza a romperse la vacuola parasitófora y los parásitos se localizan en el citoplasma de la célula (8-16 horas). Los amastigotas citosólicos comienzan a dividirse a las 24 h *post*-invasión y continúan dividiéndose cada 12 h por 5-6 días. Finalmente, los amastigotas se diferencian a tripomastigotas rompiendo la célula hospedera y al entrar en la circulación sanguínea disemina la infección. Extraído y modificado de Caradonna y cols. [36].

El proceso de invasión celular de la clásica forma infectiva del parásito en el mamífero, ha sido bien estudiado [37], y está generalmente aceptada la idea de la existencia de un paso inicial de adhesión del parásito a la membrana del hospedero, como paso previo a la invasión ([36] y referencias contenidas). Con respecto a los procesos de reconocimiento de células e invasión, los antígenos de superficie mejor caracterizados son los miembros de la familia polimórfica gp85/TS que se expresan en los estadios infectivos para el mamífero [38-40]. En el proceso de infección, las moléculas de ácido siálico en la superficie del parásito juegan un rol muy importante, sin embargo *T. cruzi* no es capaz de sintetizar ácido siálico por lo que expresa una enzima llamada *trans*-sialidasa (TS) que está involucrada en la transferencia de ácido siálico del hospedero al parásito [41]. La superfamilia de TS consiste en varias subfamilias funcionalmente diferentes que comparten un dominio sialidasa característico en su región N-terminal [42,43]. Varios miembros de la

familia gp85/TS tienen la propiedad de unirse a componentes de la matriz extracelular tales como laminina, colágeno, fibronectina y proteoglicanos heparín-sulfato [39,44-48]. Se han descrito otras moléculas que están involucradas en el proceso de invasión por metacíclicos [49]. Entre ellas se destacan la proteína tipo mucina gp35/50 y la proteína de superficie gp82 que promueve la entrada a la célula activando cascadas de señalización y movilización de Ca^{2+} en las células del hospedero y del parásito. [50]. Además de las mucinas [51] y proteínas asociadas a mucinas (MASPs) [52], se han identificado y estudiado otras familias de proteínas tales como las proteínas DGF-1 (*dispersed gene family-1*) y las gp63 [53] que se consideran importantes en la interacción temprana hospedero-parásito, y su implicancia en el mecanismo de adhesión a la membrana de la célula hospedera y en el proceso de invasión aún continúan siendo objeto de estudio (revisado en [39]). Las proteínas cruzipáinas, son cisteín proteasas de *T. cruzi* que también participan en la invasión a la célula, desarrollo intracelular y evasión inmune [54] así como en la degradación proteolítica de tejidos del hospedero [55]. Se ha propuesto además, la existencia de moléculas secretadas por el parásito implicadas en este proceso [56].

En la **FIGURA 1.2.2** se esquematiza el paso de adhesión que involucra el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie tanto del parásito como de la célula hospedera.

A diferencia de la expresión mono alélica de la mayoría de los antígenos de superficie observados en algunos parásitos protozoarios [57,58] varios estudios sugieren que las poblaciones de tripomastigotas son heterogéneas en la expresión de las glicoproteínas de superficie [59,60]. Aunque se desconoce en detalle el mecanismo de expresión diferencial de los genes de glicoproteínas de superficie durante la infección por *T. cruzi* [61], se cree que ocurre algún tipo de *switching* que permite a la población de parásitos, exponer nuevas variantes de superficie al sistema inmune del hospedero tal como se ha descrito para otros parásitos protozoarios [62-64].

Las variadas estrategias de invasión usadas por el parásito, incluyendo la capacidad infectiva de diferentes estadios (ej. tripomastigotas sanguíneos, tripomastigotas metacíclicos y amastigotas extracelulares) así como la existencia de distintas cepas caracterizadas por diferentes infectividades, lleva a que el entendimiento del proceso de internalización del parásito sea un obstáculo difícil de superar. Además del estudio de los componentes del hospedero y parásito implicados en la invasión de tripomastigotas [29,65-67], también se están estudiando los componentes implicados en la invasión por amastigotas [68-70]. Entre estos componentes se encuentran miembros de la superfamilia de las *trans*-sialidasas [68], epítopes de carbohidratos en la superficie de glicoproteínas [70] y posiblemente otros componentes secretados [71]. La

existencia de otros componentes específicos de amastigotas pone de manifiesto el uso de estrategias diferentes por parte de esta forma infectiva del parásito [28,56,72-74].

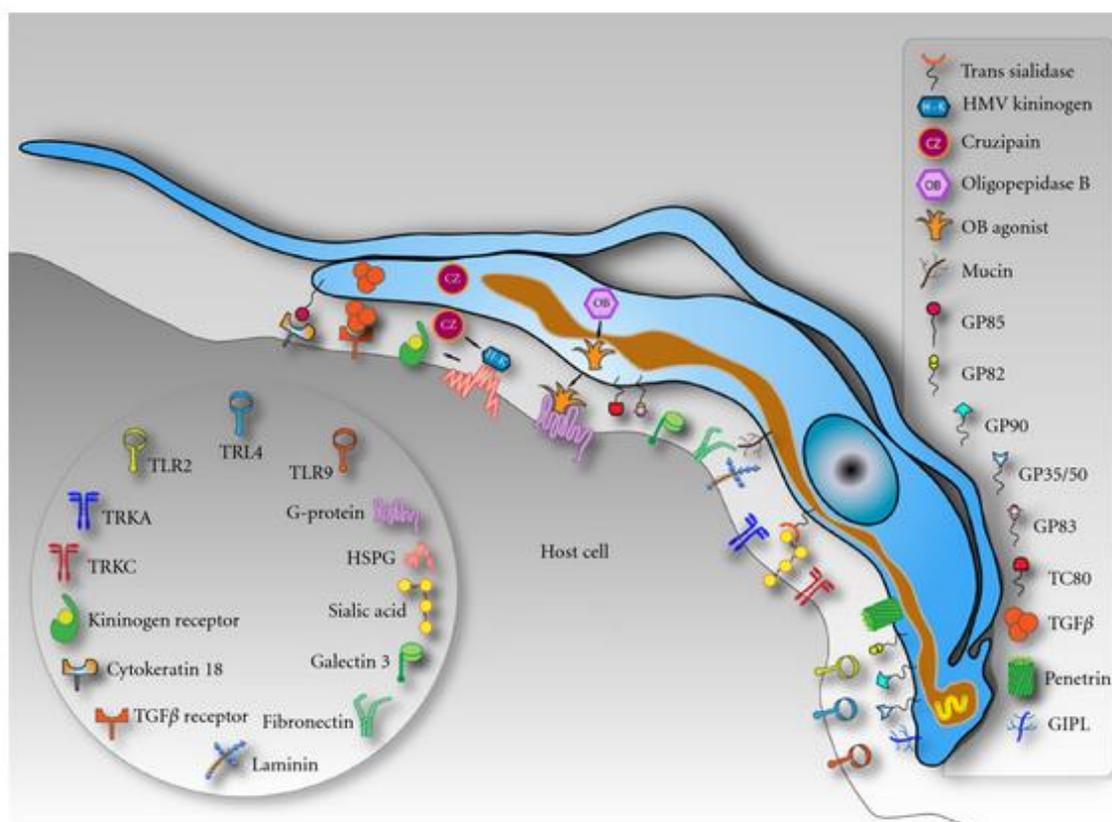


FIGURA 1.2.2 Modelo esquemático donde se indican algunas moléculas involucradas en la interacción hospedero-parásito. El proceso de adhesión implica el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie tanto del hospedero (derecha) como del parásito (círculo a la izquierda). Tomado de De Souza y cols. [56].

Finalmente, en cuanto al mecanismo exacto de cómo *T. cruzi* es capaz de dañar al hospedero mamífero, no es mucho lo que se sabe y, si bien se han descrito varios factores de virulencia, la contribución de cada uno en el mismo aún se desconoce [75]. Durante diferentes fases del ciclo de vida del parásito, muchos factores de virulencia actúan de forma secuencial y concertada. Los tripomastigotas metacíclicos invaden básicamente macrófagos, fibroblastos y otras células mesenquimáticas en el sitio de la infección primaria donde deben expresar moléculas antioxidantes de resistencia al estrés oxidativo que le permitan detoxificar su entorno [76]. *T. cruzi* tiene una batería de enzimas de detoxificación tales como las enzimas ditiol tripanotión, el homólogo a la tiorredoxina llamado triparredoxina y diferentes peroxidases con diferentes localizaciones celulares [77-80]. Una vez que *T. cruzi* entra al hospedero mamífero, experimenta el ataque por el sistema inmune. Ante este desafío, *T. cruzi* expresa varias proteínas de superficie que le confieren

resistencia a la lisis mediada por el sistema complemento, tales como la glicoproteína de superficie de 93 kDa T-DAF (*trypomastigote decay-accelerating factor*) [81], o las proteínas CRPs [82], y las proteínas TcCRT [83] y CRIT [84] (por una revisión de estas proteínas ver [75]). Otro factor de virulencia estudiado es la proteína Tc52 la cual se secreta y es responsable de la supresión de la proliferación de las células T [85]. Esta proteína es también capaz de modular la expresión de citoquinas de macrófagos así como producción de NO y de interferir con las células dendríticas del hospedero [86-88].

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de evasión de sistema inmune mediado por vesículas presentes en la membrana plasmática de la célula hospedera. Luego de ser liberadas, estas microvesículas forman un complejo con la convertasa C3 del complemento en la superficie de *T. cruzi*, lo que lleva a la sobrevivencia del parásito. La infección *in vivo* con *T. cruzi* en ratones resulta en un aumento de los niveles de microvesículas en el plasma, y la infección con microvesículas exógenas resulta en un aumento de la parasitemia por *T. cruzi* [89].

1.3 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL PARÁSITO

Gracias al perfeccionamiento en el uso del microscopio electrónico, en los últimos años se han realizado importantes contribuciones al entendimiento de la organización estructural de *Trypanosoma cruzi* en detalle.

La mayor parte de los estudios estructurales reportados, han sido realizados con la forma epimastigota del parásito (**FIGURA 1.3.1**).

Las técnicas convencionales de congelado-fractura han permitido examinar la región interna de la membrana plasmática. El uso de esta técnica ha revelado que la membrana plasmática no es homogénea en términos de densidad y de distribución de partículas intramembranas. Se han identificado al menos tres macrodominios de la membrana [90-92]: el cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar. Cada uno de estos dominios posee microdominios específicos tales como (i) el collar flagelar, localizado en la porción basal del flagelo, (ii) la zona de anclaje del flagelo al cuerpo celular donde se ve un arreglo lineal de partículas intramembranas rodeando la región de adhesión y (iii) la región del citostoma.

La observación de finas secciones de los tripanosomátidos por microscopía electrónica de transmisión reveló la presencia de microtúbulos subpelículaes distribuidos a lo largo del cuerpo celular del parásito excepto en la región del bolsillo flagelar. Estos microtúbulos mantienen una distancia fija uno del otro (44 nm) y de la membrana plasmática (12 nm) [93].

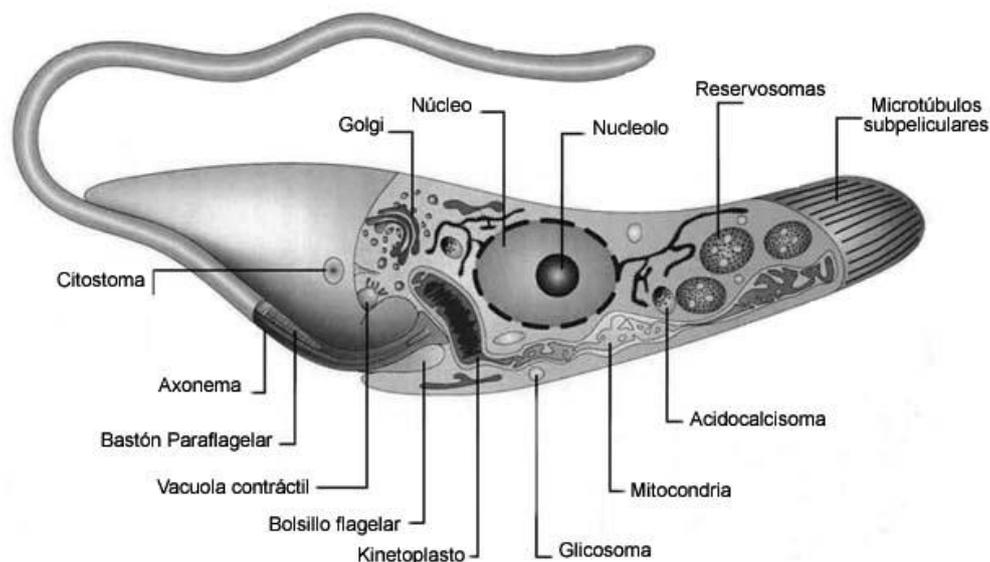


FIGURA 1.3.1 Visión esquemática de las estructuras y organelos encontrados en la forma epimastigota de *T. cruzi*. El diagrama fue realizado a partir de observaciones por microscopía de transmisión electrónica de secciones finas. Extraído y modificado de Souza y cols. [16].

En la base del **flagelo** se encuentra la estructura denominada cuerpo basal. Este único flagelo se observa aún en los amastigotas siendo en este caso muy corto. El flagelo muestra un arreglo típico de nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central [43]. Los primeros estudios de microscopía electrónica revelaron la presencia de una estructura intrigante en el flagelo de los tripanosomátidos que fue denominada **bastón paraflagelar** (PFR) debido a su localización. El PFR está compuesto por un gran número de proteínas, la mayoría de las cuales aún no han sido caracterizadas con excepción de las proteínas PFR1 y 2 de 73 y 79 kDa respectivamente [94,95]. Estas proteínas son altamente antigénicas y constituyen blancos para diseño de vacunas y desarrollo de *kits* de diagnóstico. Hay evidencia que indica que el PFR es una estructura esencial para la supervivencia del parásito [96].

El **citostoma** es una invaginación de la membrana plasmática que penetra tan profundo en la célula que se cree que puede alcanzar la región nuclear. Esta estructura está involucrada en la captación de macromoléculas del medio a través del proceso de endocitosis [97,98]. Estudios en *T. cruzi* han demostrado que este protozoario exhibe ciertas particularidades también en su ruta endocítica que los diferencian de otras células. En primer lugar, la endocitosis solo ocurre en epimastigotas (también en epimastigotas axénicas) siendo escasa o ausente en tripomastigotas sanguíneos o metacíclicos y en amastigotas. En segundo lugar, los epimastigotas tienen dos sitios para la ingestión de macromoléculas; el bolsillo flagelar y el citostoma. Tercero, el contenido en las vesículas endocíticas es almacenado en estructuras inusuales denominadas **reservosomas** localizadas en la región posterior del protozoario [43].

En la región posterior del parásito se han encontrado un grupo de estructuras irregulares redondeadas. Inicialmente, estas estructuras fueron designadas como **cuerpos multivesiculares**. Citoquímicamente se localizaron proteínas de la matriz en su interior y se vio que estas vesículas podían fusionarse con vesículas de la ruta endocítica y con vesículas del Golgi. Estas observaciones sugirieron que estas vesículas fusionadas formaban los reservosomas implicados en la concentración de proteínas ingeridas por el parásito. Los reservosomas desaparecen gradualmente durante la transformación de epimastigotas en tripomastigotas infectivos [16]. Este organelo fue aislado y caracterizado bioquímicamente [99], además, se identificaron las proteínas que lo componen [100].

La vía secretoria en *T. cruzi* está formada por el **retículo endoplásmico**, el **complejo de Golgi** y un sistema de vesículas que emergen de las cisternas del Golgi y migran a través del bolsillo flagelar donde se fusionan y descargan su contenido. La organización estructural del Golgi en tripanosomátidos es similar a la descrita en otras células y se localiza cerca del bolsillo flagelar [101].

Los **acidocalcisomas** son organelos capaces de transportar protones y calcio y han sido identificados en todos los miembros de la familia Trypanosomatidae y muchos miembros del *phylum* Apicomplexa [102]. Los acidocalcisomas están involucrados en varias funciones incluyendo: (i) almacenamiento de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro, pirofosfato inorgánico, polifosfato, (ii) homeostasis del pH y (iii) osmorregulación participando en estrecha asociación con la vacuola contráctil. La **vacuola contráctil** es una estructura formada por varios túbulos conectados a una vacuola central localizada cerca del bolsillo flagelar [103]. La función de esta estructura en el parásito no está del todo clara, pero se postula que podría tener un rol en la regulación del metabolismo de fosfatos [104].

Los **glicosomas** se ven como estructuras esféricas rodeadas por membrana con una matriz homogénea. El descubrimiento de que la ruta glicolítica tenía lugar en estos organelos fue lo que les dio el nombre [105].

En tripanosomátidos se destaca la presencia de una única gran **mitocondria** que se extiende a lo largo del cuerpo celular del parásito. En la matriz mitocondrial, se encuentra un complejo entramado de fibras de ADN que forma una estructura conocida como **kinetoplasto**. El ADN contenido en el kinetoplasto se conoce como K-ADN. El K-ADN se localiza perpendicular al eje del flagelo. En *T. cruzi*, la posición del kinetoplasto relativa al núcleo cambia durante el ciclo de vida. Sin embargo, el kinetoplasto siempre tiene una localización proximal al cuerpo basal. Además de la proximidad de estas estructuras, existe evidencia de que el kinetoplasto está físicamente ligado al cuerpo basal [106]. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de un *set* de filamentos que conectan el K-ADN con el cuerpo basal, lo cual explicaría la posición espacial y segregación del genoma mitocondrial [107]. Como consecuencia de esta conexión queda definida la región celular en la

cual se localizará el cuerpo basal y por tanto el origen del flagelo. El K-ADN representa alrededor del 30% del ADN celular total y difiere del ADN nuclear en densidad y proporción de bases. Además, a diferencia de cualquier otro ADN, el K-ADN de los tripanosomátidos está compuesto de moléculas circulares topológicamente relajadas e interconectadas formando una red. Se diferencian dos categorías de ADN circular en el kinetoplasto: los **minicírculos** y los **maxicírculos**. Existen varios miles de minicírculos, los cuales tienen un tamaño que va de 0,5 a 2,5 kb dependiendo de la especie y unas pocas decenas de maxicírculos, cuyo tamaño varía entre 20-40 kb [108]. Los minicírculos codifican para los ARNs guías, los cuales modifican los transcritos de los maxicírculos mediante inserción o delección de uridinas en un proceso conocido como *editing* de ARN. Los maxicírculos son funcional y estructuralmente análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores y codifican los ARNr y subunidades de complejos respiratorios.

El **núcleo** presenta una envoltura típica con una membrana con poros, cromatina condensada dispersa a lo largo del nucleoplasma y un **nucleolo** típico en epimastigotas (revisado en [109]). En tripomastigotas metacíclicos el núcleo aparece como un organelo elongado con alto contenido de heterocromatina y carente de nucleolo [110,111]. La falta de nucleolo en tripomastigotas metacíclicos es consistente con la disminución de actividad de la ARN Polimerasa I y con la consiguiente disminución de ARNr que resulta en el reducido contenido de ribosomas reportado para este estadio [112]. Se ha demostrado que la membrana nuclear permanece intacta durante todo el proceso de división, con la aparición de microtúbulos intranucleares, dispersión de la cromatina y la aparición de placas densas cuyo número varía según la especie de tripanosoma [113]. Diversos estudios de la arquitectura nuclear eucariota han revelado que en el núcleo, las funciones de transcripción y replicación, no se distribuyen de forma homogénea sino que existe una compartimentalización de las mismas así como una diferencia en la concentración efectiva de factores en *trans* en los diferentes puntos de acción. Este hecho ha sido demostrado también para tripanosomátidos mediante el marcado de células por incorporación de BrUTP o BrdUTP (revisado en [114]).

1.4 ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE *T. CRUZI*

En el año 2005 se publicó un borrador de las secuencias de los tres tripanosomátidos representativos: los *Trityps* (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*) [53,115,116]. Debido a la naturaleza repetitiva del ADN y el hecho de que la cepa CL Brener usada como referencia para la secuenciación fuera un híbrido, el ensamblaje a nivel cromosómico se vio retrasado hasta el 2009, momento en el que el genoma completo de *T. cruzi* de 60,3 Mb pudo ser organizado en 41 cromosomas pequeños [117]. Más recientemente se secuenció la cepa de *T. cruzi* Sylvio X10/1, un representante del grupo TcI, y se comparó

con la cepa de referencia TcVI previamente secuenciada [118] no encontrándose grandes diferencias en el contenido génico de ambos grupos.

El genoma haploide de *T. cruzi* (clon CL Brener) contiene aproximadamente 12.000 genes que codifican para proteínas, 1.994 genes para ARN y 3.590 pseudogenes [53]. Al menos el 50% del genoma consiste en secuencias repetidas tales como retrotransposones y genes para grandes familias de proteínas de superficie, como ser las proteínas tipo *trans*-sialidasas, mucinas, metaloproteasas y proteínas MASPs. Los genes que codifican para *trans*-sialidasas y MASPs representan aproximadamente el 12% del genoma diploide del parásito [119]. En general, en tripanosomátidos son comunes las familias multigénicas que codifican para antígenos de superficie, estas familias se asocian frecuentemente a protección y evasión del sistema inmune del hospedero [39].

Si bien los *Trityps* han divergido hace más de 200 millones de años, y por tanto existe considerable distancia evolutiva estimada entre estas tres especies, se identificó un repertorio conservado de 6.158 genes y se encontraron además numerosos genes específicos de cada especie [120]. Además, existe una gran conservación en el ordenamiento de los genes (sintenia) [120]. En promedio, el 70% de los genes que comprenden el genoma de cada uno de los tripanosomátidos representativos de la familia, comparten el mismo contexto genómico [114,120]. Contrariamente, la mayoría de los *clusters* de genes para ARNt no muestran sintenia [121].

En estos organismos, los genes que codifican para proteínas están ordenados en grandes *clusters* policistrónicos conteniendo decenas a centenas de genes codificantes para proteínas dispuestos en grupos direccionales con polaridad de hebra (DGCs *directional gene clusters*). Entre los *clusters* de genes policistrónicos, se encuentran genes para ARNr. La mayoría de los genes ARNt se organizan también en *clusters* de 2 a 10 genes, y generalmente, se localizan en las fronteras de los grandes DGC [116,121]. Los genes para ARNt en los genomas de *L. major* y *T. cruzi*, a diferencia de otros organismos, no parecen localizarse al azar en el genoma, sino que están confinados a un grupo de cromosomas [121]. Los genes para ARNr 5S en *T. cruzi* al igual que en *T. brucei* están organizados en arreglos en *tandem*, mientras que en *L. major* están dispersos por todo el genoma y se asocian siempre a genes para ARNt [116,122,123].

El ordenamiento de genes en policistrones con polaridad de hebra, se había observado por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major* [124]. Los DGC se encuentran separados por secuencias cortas de unas pocas kilobases llamadas regiones de cambio de hebra (*strand-switch regions* ó SSRs), donde el sentido de la transcripción converge o diverge (**FIGURA 1.4.1**). Varios autores han propuesto diferentes hipótesis sobre la probable función de estas regiones de cambio de hebra. Estudios de *run-on* nuclear en el cromosoma 1 de

Leishmania, mostraron que la transcripción se inicia en forma bidireccional entre dos DGC divergentes y prosigue en la dirección de los policistrones hasta terminar en otro SSR [124-126]. Aunque este hecho podría apoyar la existencia de un promotor para la ARN Polimerasa II delante de cada unidad de transcripción, existen evidencias de que esta región no es necesariamente imprescindible para la correcta expresión de los genes ya que la expresión de un gen reportero insertado en uno de los DGC no se afecta por la delección del SSR [127]. Además, no se encontró en estas regiones los elementos canónicos conservados de los promotores de la polimerasa II.

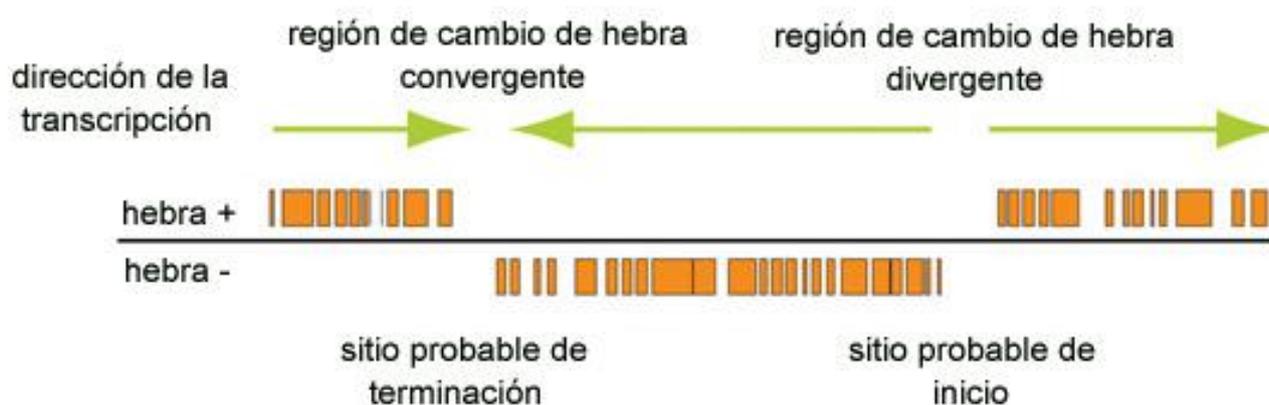


FIGURA 1.4.1. Organización de los genes en grupos con polaridad de hebra en tripanosomátidos. Con flechas verdes se muestra el sentido de la transcripción. Los sitios de cambio de hebra divergente se postula que son sitios de inicio de la transcripción y los sitios de cambio de hebra convergentes se consideran sitios de terminación de la transcripción. Estos sitios discretos de inicio y terminación de la transcripción se encuentran enriquecidos en histonas modificadas. Se muestran en naranja los diferentes genes. Extraído y modificado de Siegel y cols. [128].

1.5 ORGANIZACIÓN PROTEÓMICA DE *T. CRUZI*

Se han realizado análisis proteómicos de los cuatro estadios de *T. cruzi* a través de aproximaciones tales como fraccionamiento subcelular, extracción con detergentes, y marcado con isótopos estables. Estos análisis han mostrado un panorama general del proteoma celular [112,129-136] y del "subproteoma" de varios organelos [100,130,137,138]. En general, se ha observado que cada uno de los diferentes estadios de *T. cruzi* posee distintos grupos de proteínas que se relacionarían con la biología de cada forma del parásito. Las formas no infectivas, es decir los epimastigotas replicativos, están enriquecidos en enzimas metabólicas, mientras que los tripomastigotas infectivos no replicativos, están enriquecidos en proteínas de superficie que se asocian a la invasión de la célula hospedera. Es interesante notar que entre el 30 y 36% de las proteínas identificadas son proteínas hipotéticas. Además, estos estudios han confirmado que varias proteínas son sometidas a alguna forma de modificación *post*-traduccional (por ejemplo: modificaciones de

histonas, fosforilación, glicosilación, anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) y nitrosilación). Se ha reportado la existencia de la vía de ubiquitín-proteasoma en tripanosomátidos como mecanismo de degradación proteica [139]. Una alternativa a la degradación selectiva de proteínas es el fenómeno de *autofagia*, presente también en kinetoplástidos, donde a través del autofagosoma se engullen partes del citoplasma y/o organelos para luego ser dirigidos al lisosoma para su degradación [140].

1.6 TRANSCRIPCIÓN Y MADURACIÓN DE ARNm

La comprensión del mecanismo de transcripción en tripanosomátidos ha sido un proceso desafiante. Previo a la publicación de los proyectos genoma de los tripanosomátidos en 2005 [115,116,120], se habían logrado identificar los promotores y posibles elementos de secuencia sólo para algunos genes. Entre ellos se destacan los genes que codifican para las proteínas variables de superficie VSG [141-143] y las PARP (*procyclic acid repetitive protein*) [144] en *T. brucei*. Estos genes para VSG y PARP son los únicos que, codificando para proteínas, se transcriben a partir de la **ARN Polimerasa I** (transcripción resistente a la alfa amanitina) [144,145]. Por otro lado se describieron promotores para ARNr transcriptos por la ARN Polimerasa I en *T. cruzi* [146,147], en *Leishmania chagasi* [148] y en *T. brucei* [149,150]. También se han podido definir los promotores para los ARNt [151] y ARNnp [152] transcriptos por la **ARN Polimerasa III** en tripanosomátidos.

Se ha reportado actividad de inicio de la transcripción para la **ARN Polimerasa II** (sensible a la alfa amanitina) en regiones adyacentes a los genes HSP70 [153] y actina [154] de *T. brucei* aunque la capacidad promotora de estas regiones ha sido discutida. En efecto, varias regiones intergénicas resultan capaces de iniciar la transcripción en las dos hebras [155]. Llamativamente, si bien estas regiones intergénicas son indispensables para el correcto procesamiento del mensajero, no se ha encontrado ningún elemento promotor clásico conservado en ellas [156,157]. Por tanto, hasta la fecha, los promotores para la ARN Polimerasa II y sus factores asociados, han resultado elusivos en tripanosomátidos. El único promotor canónico reportado para la ARN Polimerasa II es el promotor a partir del cual se transcribe el ARN que dará lugar al miniexón [158-161]. Cada repetido ARN SL individual posee su propio promotor, el único promotor canónico para la ARN Polimerasa II reportado en tripanosomátidos [162]. En forma alternativa a la existencia de un promotor aún no identificado, se propone que los grandes policistrones podrían ser transcriptos a partir de sitios al azar donde la cromatina se encuentre en un estado “abierto”. En el estadio de desarrollo procíclico del parásito *T. brucei*, Kolev y cols. han determinado por mapeo transcripcional los sitios de inicio de la transcripción por la ARN Polimerasa II e identificaron un total de 191 sitios de inicio para la ARN Polimerasa II, 129 de los cuales

se localizaban en el extremo 5' de los DGC y 62 sitios se localizaban dentro de ellos. Este hecho sugeriría un patrón más complicado para el inicio de la transcripción [163].

Con el advenimiento de los genomas completos de los *Trypanosoma* [53,115,116] se logró identificar por homología de secuencia, algunas proteínas candidatas a participar en la transcripción basal de los genes [160,161,164-166] aunque en *T. cruzi* solamente se han caracterizado unos pocos **factores de transcripción** [167,168].

En *T. cruzi*, en un esfuerzo para encontrar sitios de inicio de la transcripción, se buscaron modificaciones a nivel de cromatina ligadas a genes activos (**FIGURA 1.6.1**).

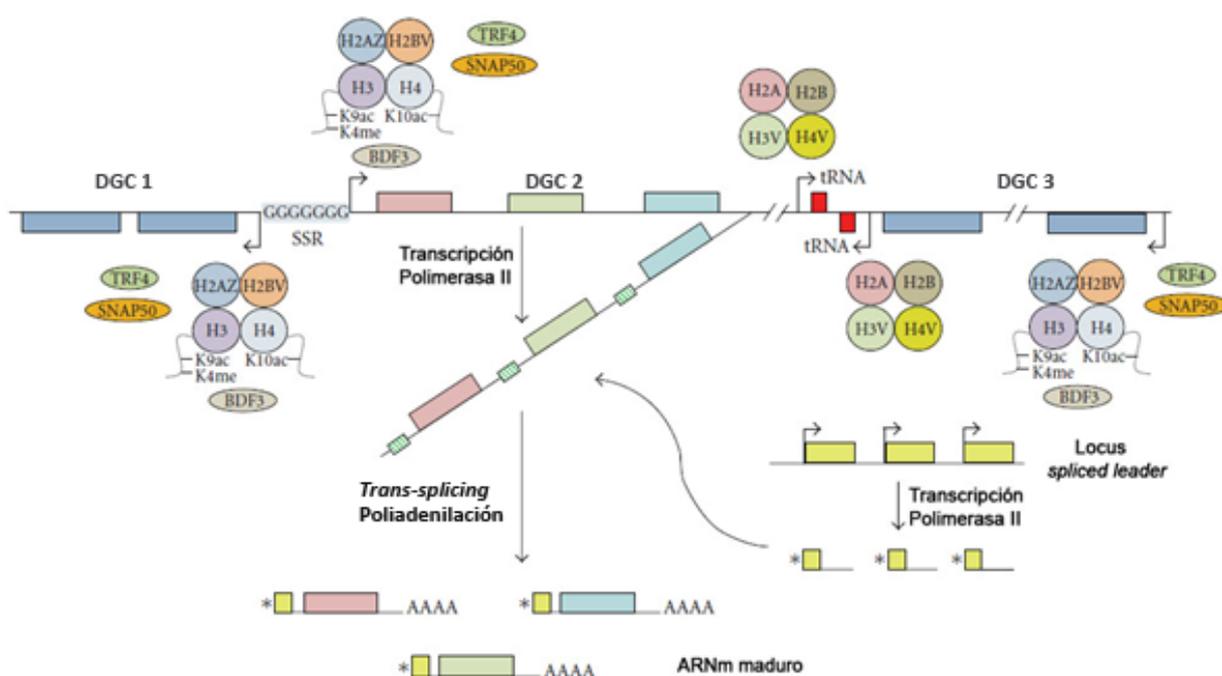


FIGURA 1.6.1 Transcripción y procesamiento de los ARNm en tripanosomátidos. En la parte superior se muestra un cromosoma hipotético con tres DGC (1-3). La dirección de transcripción por la polimerasa II se señala con flechas. El tracto de guaninas se encuentra usualmente en los sitios de cambio de hebra divergentes (SSR) tal como se indica. Los nucleosomas que se localizan cercanos a las zonas de inicio de la transcripción contienen variantes de histonas H2AZ y H2BV. En estos nucleosomas, la cola N terminal de la histona H3 se encuentra acetilada en la lisina K9 (K9ac) y trimetilada en la lisina K4 (K4me). La cola N-terminal de la histona H4 se acetila en la lisina K10 (K10ac) y en otras lisinas no mostradas en la figura. El factor con bromodominio BDF3, y los factores de transcripción TRF4 y SNAP50 se unen también a regiones del inicio de la transcripción. La transcripción de la polimerasa II de algunos de estos DGC termina cerca de los genes para ARNt (región de cambio de hebra convergente entre DGC2 y DGC3) en regiones de ADN que contienen nucleosomas con variantes de histonas H3V y H4V. La transcripción de un DGC produce un transcrito primario (solo mostrado para DGC2) que es procesado por *trans-splicing* y poliadenilación para generar los ARNm maduros. En el proceso de *trans-splicing* se agrega un ARN pequeño (ARN SL o *spliced leader* mostrado en amarillo) que contiene una estructura de caperuza 5' (asteriscos) y que se agrega a la región 5' de cada ARNm que será traducido en proteínas. En el *locus* del ARN SL (que se localiza en un

cromosoma diferente), cada gen posee una región promotora para la ARN Polimerasa II (flechas). Extraído y modificado de Martínez-Calvillo y cols. [169].

Se encontró un enriquecimiento significativo de histonas H4 acetiladas en los sitios SSR divergentes. Este resultado revela la existencia de elementos epigenéticos en *T. cruzi* con potenciales implicancias en la regulación transcripcional [170]. Por otro lado y en forma análoga, en *T. brucei* se demostró un enriquecimiento de histonas modificadas (metilación de Histona H3 y acetilación de Histona H4) en los sitios probables de inicio de la ARN Polimerasa II [171]. Se vio además que los nucleosomas conteniendo estas y otras histonas modificadas (H2AZ y H2BV) eran menos estables que los nucleosomas canónicos [128]. Por otro lado, se identificaron también variantes de histonas (H3V y H4V) en sitios probables de terminación de la ARN Polimerasa II [128]. Por tanto, la importancia de la regulación epigenética en la expresión génica de los tripanosomátidos es sustentada por varios estudios genómicos a gran escala (revisado en [169]). Además de la existencia de las modificaciones *post*-traduccionales y variantes de histonas, se ha sugerido la presencia de enzimas modificadoras de la cromatina [172,173]. La presencia de bases modificadas en sitios de inicio de la transcripción como ser la presencia de la base J cobra cada vez más relevancia en mecanismos de regulación transcripcional en *T. cruzi* [174].

En *T. brucei* mediante identificación de los sitios de unión del complejo iniciador ORC1/CDC6, se demostró que los procesos de transcripción y replicación co-localizan en las fronteras de las unidades transcripcionales [175].

Los transcriptos primarios policistrónicos son procesados en ARNm monogénicos a través de la adición de una secuencia en el extremo 5' mediante **trans-splicing** y **poliadenilación** en el extremo 3' (**FIGURA 1.6.1**)[157,169]. El mecanismo intermolecular de *trans-splicing* fue descrito por primera vez en los tripanosomátidos (revisado en [176,177]). En dicho proceso se agrega una secuencia de ARN de 39 nucleótidos (miniexón) en una posición ubicada unos nucleótidos antes del sitio de inicio de un marco abierto de lectura [178,179]. El proceso de empalme del miniexón corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, junto con la poliadenilación, convierte los ARN pre-mensajeros policistrónicos en ARNm maduros traducibles [180,181]. La secuencia del miniexón proviene del extremo 5' de un ARN nuclear pequeño (ARNnp) de 120 nt, el ARN SL, que es codificado por 200 genes repetidos en el genoma [182]. El miniexón se adiciona al pre-ARNm cuando ya posee la estructura de caperuza 5' (CAP), que por cierto es diferente al CAP de los eucariotas superiores [152]. En tripanosomátidos esta estructura, denominada CAP 4, consiste en una 7-metilguanosa y los cuatro primeros nucleótidos modificados por adición de grupos 2'O-metilo [183]. El miniexón se incorpora en un sitio aceptor constituido por un dinucleótido AG corriente arriba del codón de iniciación que es precedido por un tracto de polipirimidinas cuyos requerimientos estructurales han sido

detalladamente estudiados [184,185]. Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente y es fundamental para la traducción correcta de los mensajeros [180,186]. La adición del miniexón y la poliadenilación del gen adyacente son procesos que estarían coordinados y acoplados en la mayoría de los ARNm [180]. Sin embargo, se ha demostrado que el procesamiento de los ARNs policistrónicos acoplado a la transcripción no es la regla. En algunos casos, se postula que hay señales en las regiones intergénicas o en las regiones 3' transcriptas no traducidas (UTR) que enmascaran las señales de *trans-splicing* y poliadenilación generando ARNs intermediarios dicistrónicos que pueden ser transportados al citoplasma y procesados posteriormente por mecanismos convencionales de *trans-splicing* y poliadenilación dando lugar a ARNm monocistrónicos [187].

Los tripanosomátidos se distinguen por la **ausencia de intrones** es una característica de procariontes que se pierde en los eucariotes. Sin embargo, en el año 2000, Mair y cols. demostraron que los genes de la polimerasa (PAP) de *T. cruzi* y *T. brucei* están interrumpidos por intrones, estableciendo que el mecanismo de *cis-splicing* está también presente en estos protozoarios [188,189]. Por otro lado, un solo isotipo de los genes de ARNt, el ARNt-Tyr, también contiene un intrón en tripanosomátidos [121,190]. Finalmente, el análisis completo del genoma permitió la identificación de otros dos genes que podrían contener intrones, los mismos aparentemente codifican para proteínas hipotéticas con motivos de unión al ARN [116]. En las demás proteínas anotadas en los genomas de los *Trypanosoma* la ausencia de intrones constituye la regla.

Otra de las peculiaridades de la expresión génica de los tripanosomátidos es el hecho de que los transcriptos mitocondriales requieren una maduración que involucra la adición o la delección, más o menos frecuentemente, de residuos de ribonucleótidos (particularmente uridinas) en un proceso denominado edición o **editing** [191]. Este proceso, que se ha descrito incluso para genes nucleares particulares en humanos [192], resulta en cambios de la secuencia codificante del ARNm. En el caso de los tripanosomátidos, estos cambios son dirigidos por una clase de ARNs pequeños y no codificantes conocidos como ARN guías. Este proceso está catalizado por una maquinaria molecular única, llamada editosoma que consiste en un complejo multienzimático. Los componentes moleculares así como los mecanismos de este proceso se conocen en bastante detalle [193-196].

1.6.1 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN Y MADURACIÓN EN TRIPANOSOMÁTIDOS

La falta tanto de factores de activación de la transcripción conservados como de promotores canónicos para la ARN Polimerasa II en genes que codifican para proteínas sugiere la existencia de mecanismos de regulación diferentes al resto de los eucariotes superiores [53,120].

En el contexto de una tasa constante de transcripción de genes que codifican para proteínas, se han evidenciado algunos mecanismos para aumentar el nivel de expresión de ciertos genes en tripanosomátidos. Por un lado, una estrategia consiste en el **aumento del número de copias del gen** de interés en el genoma resultando en arreglos de repetidos en *tandem* para ciertos genes. Por otro lado, está el uso de **promotores fuertes** tales como el de la ARN Polimerasa I para transcribir genes de alta expresión (como por ejemplo los genes para proteínas de superficie PARP y VSG en *T. brucei*). Recientemente se ha asignado un rol funcional al ordenamiento de los genes de respuesta a choque térmico o *heat shock* en *T. brucei* [197]. En este trabajo se postula que la falta de control transcripcional de la expresión génica para estos genes se compensa a través de una organización genómica conservada donde los genes regulados negativamente tienden a localizarse en la región proximal al sitio de inicio de la transcripción mientras que los genes regulados positivamente se localizarían en una posición más distal.

El destino de los transcritos es también modulado en tripanosomátidos a través del uso de sitios de *trans-splicing* y poliadenilación alternativos [189]. En este contexto, estos eventos diferenciales pueden dar lugar a ARNm que codifican para proteínas con diferentes regiones N ó C-terminal e incluyendo diferentes regiones regulatorias 5' y 3' no traducidas. La existencia de transcritos dicistrónicos en el citoplasma constituiría un ejemplo adicional de regulación *post*-transcripcional en *T. cruzi* [187].

Dada la falta de promotores canónicos para la ARN Polimerasa II, así como el hecho de que genes no relacionados funcionalmente estén dispuestos en largos arreglos policistrónicos, se ha propuesto, que la regulación de la expresión génica en los tripanosomátidos se da básicamente a nivel de mecanismos *post*-transcripcionales [119,198]. A este nivel de regulación, participan numerosos factores, siendo las proteínas de unión al ARN (RBPs) actores sumamente importantes en estos procesos [199-201].

1.7 ETAPAS DE PROCESAMIENTO *POST*-TRANSCRIPCIONAL Y SU REGULACIÓN

Los eventos de regulación *post*-transcripcional de la expresión génica juegan importantes roles en diversos procesos celulares. Teniendo en cuenta el gran número de moléculas de ARNm que se producen constitutivamente en tripanosomátidos, la localización, actividad y vida media de estos ARNs deben estar estrictamente reguladas y coordinadas. En la **FIGURA 1.7.1** se muestra un esquema de las diferentes etapas de regulación de la expresión génica. Se incluyen modificaciones *post*-traduccionales que también intervienen en el control espacial y temporalmente de la disponibilidad de proteínas funcionales en la célula.

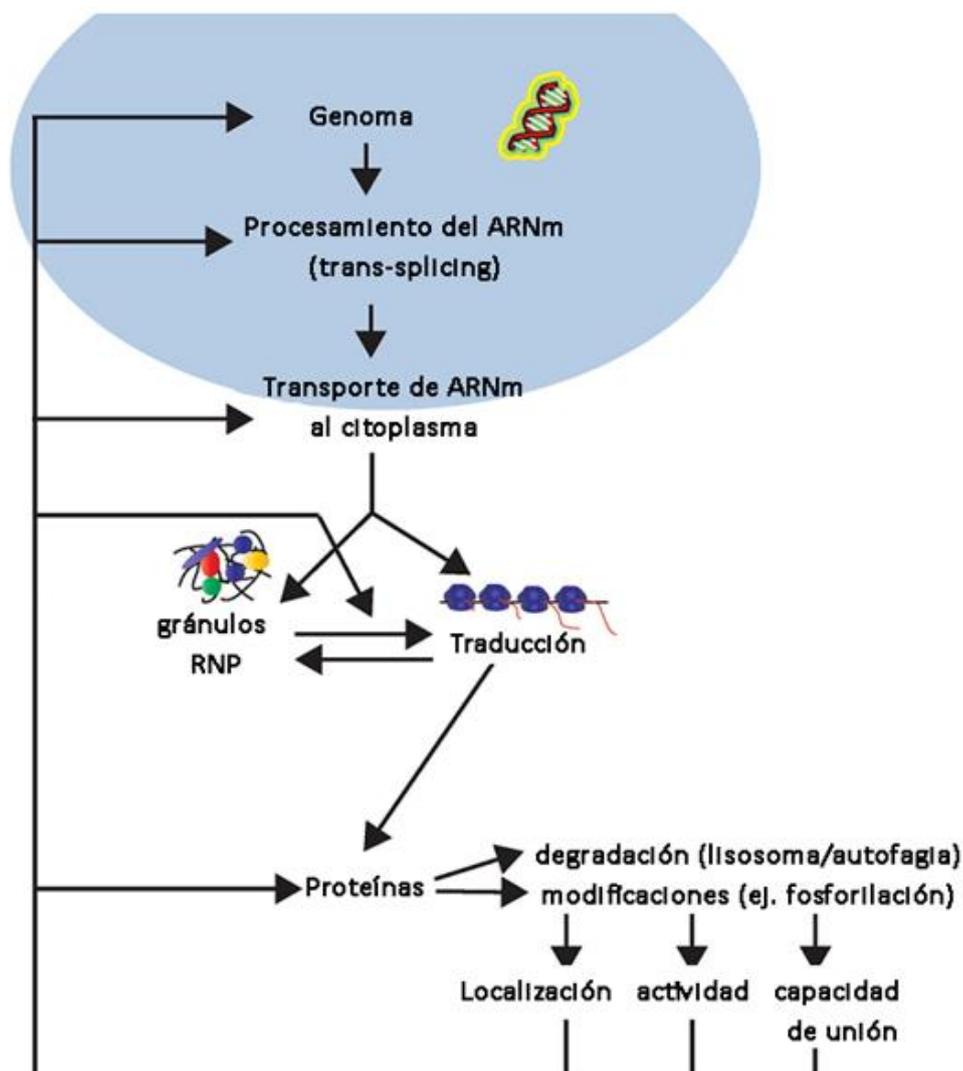


FIGURA 1.7.1 Principales puntos de regulación *post*-transcripcional en tripanosomátidos. La regulación de la expresión génica en tripanosomátidos involucra varios procesos a diferentes niveles tales como el control a nivel de estructura de la cromatina, procesamiento del ARN y transporte núcleo-citoplasma. Ya en el citoplasma, los ARNm son localizados, traducidos, almacenados y degradados. La mayoría de estos procesos involucra proteínas de unión al ARN que componen los complejos ARNm-ribonucleoproteína (mRNP). Extraído y modificado de Kramer y cols. [202].

El desarrollo de herramientas para análisis a escala genómica ha permitido el estudio global de la regulación *post*-transcripcional de la expresión génica. Interesantemente, estos estudios, han revelado distintos programas de regulación de la cantidad y funcionalidad del ARN, sugiriendo la existencia de una maquinaria de regulación *post*-transcripcional versátil y compleja. Esta red de regulación es controlada por cientos de RBPs y por pequeños ARN no codificantes (por ej. microARNs), que especifican el destino de cada ARN [199,201,203]. Las proteínas regulatorias y pequeños ARNs se unen a secuencias específicas o elementos estructurales en el ARN regulando un grupo de ARNm que codifican para proteínas funcionalmente relacionadas. A su vez, tanto las RBPs como los pequeños ARNs están sujetos a regulación *post*-

transcripcional. Por otra parte, la regulación de muchas RBPs puede estar controlada a nivel de proteína a través de un gran número de modificaciones *post*-traduccionales. Se ha reportado en varias RBPs bien estudiadas, modificaciones tales como la fosforilación [204-208], metilación [209,210] y sumoilación [211] lo cual agregaría flexibilidad a su función. Estas modificaciones *post*-traduccionales pueden modificar las propiedades de unión al ARN, la asociación de las RBPs con otras proteínas así como también su localización subcelular [212-218]. El desafío actual consiste en entablar un vínculo entre los ARN blanco y los factores que los regulan para caracterizar así, los mediadores o “nodos” de estos programas de regulación *post*-transcripcional y revelar su implicancia fisiológica.

1.7.1 TRANSPORTE NÚCLEO-CITOSOL EN LA REGULACIÓN *POST*-TRANSCRIPCIONAL

Las diferentes especies de ARN que son producidas en el núcleo deben ser eficientemente exportadas hacia el citoplasma. El transporte núcleo-citosol se lleva a cabo a través de receptores localizados en el complejo del poro nuclear. La biogénesis de los ARNm y su exportación al citosol son procesos estrechamente acoplados e interdependientes, con algunos factores en común que participan en múltiples etapas del proceso. Así mismo, existen mecanismos de degradación y vigilancia de la calidad del mensajero, análogo a los descritos en el citoplasma [202]. Los ARNs más grandes, como los ARN ribosomales y los ARNm, son ensamblados en grandes partículas ribonucleoproteicas (RNPs) y transportados al citosol mediante proteínas específicas en un proceso que se da en varias etapas y que se regula de manera espacio-temporal (revisado en [219,220]).

En *T. cruzi* no se conoce mucho acerca de la vía de exportación de ARNm desde el núcleo. Se ha estudiado la función de la proteína TcSub2, un componente del complejo multiproteico de transcripción/exportación de ARNm y se vio una asociación con la ARN Polimerasa II confirmando la asociación entre procesamiento y transporte de los ARNm también en *T. cruzi* [221].

1.7.2 RUTAS DE DEGRADACIÓN DE ARNm

El **nivel de ARNm** en estado estacionario es el resultado del control de la síntesis de ARN y de su degradación, eventos que son dinámicamente controlados y que varían durante el ciclo celular o la diferenciación celular. Dada la ausencia de control de la síntesis de ARNm en tripanosomátidos, el control de su abundancia está basado en mecanismos de modulación de la estabilización/desestabilización de los mismos (revisado en [157,222,223]).

La mayoría de los ARNm de eucariotas son degradados por exonucleasas que actúan en ambos extremos de la molécula. El decaimiento mediado por exonucleasas comienza con el acortamiento de la cola poliA por el complejo PAN2 y PAN3, por el complejo de deadenilación CCR4-NOT o por la deadenilasa PARN (poliA ribonucleasa) (revisado en [224]). La deadenilasa que participa en la degradación de un ARNm específico depende de las proteínas que interactúan con el mismo. Luego de la deadenilación, las enzimas de *decapping* DCP2 o NUDT16 remueven el cap5' [225]. Las actividades requeridas para el decaimiento del ARNm en la vía 5'-3' se concentran en cuerpos de procesamiento ribonucleoproteicos citoplasmáticos (*P bodies*) que contienen ARNm, las enzimas de remoción del cap 5' (*decapping*) tales como Dcp1 y Dcp2 y enzimas hidrolíticas 5'-3' (Xrn1) así como también proteínas que asisten el decapping tales como Dhh1, Pat1, Edc1, Edc2 y Edc3 y el complejo Lsm1-7 [226-228].

En tripanosomas, se han encontrado ortólogos de los complejos deadenilasa [229], de homólogos de las proteínas Dhh1, SCD6 y XRNA (el ortólogo de Xrn1) [230-232], y una proteína ARN helicasa marcadora de *P bodies* que es necesaria para la eficiente remoción del cap 5' de los ARNm antes de su degradación [233]. A diferencia de levaduras y metazoarios, no se han identificado en el genoma de tripanosomátidos enzimas de *decapping* (Dcp1 y Dcp2) así como tampoco las proteínas que colaboran en este proceso (Lsm1, Edc3 y Pat1), sin embargo, se ha detectado función enzimática de *decapping* en extractos proteicos de tripanosomátidos [234]. En este contexto se sugiere la existencia de una ruta específica para el inicio de la degradación 5' de los ARNm que involucraría enzimas de *decapping* no canónicas en tripanosomátidos [235]. Los intermediarios sin cap 5' son degradados ya sea por exonucleasas 5'-3' [236] o por el exosoma en dirección 3'-5' [237-239].

En eucariotas puede ocurrir clivaje endonucleolítico mediante endonucleasas secuencia específicas. Este mecanismo se ha visto involucrado en los procesos de vigilancia de la calidad del mensajero como NMD o NSD (*non sense mediated decay* o *non stop decay*) o en respuesta a microARNs o siARNs [225]. A diferencia de la mayoría de las rutas de degradación de ARNm, el NMD se restringe solo para los ARNs recién sintetizados. En este proceso, se eliminan los ARNm que poseen un codón de finalización de la traducción prematuro el cual es reconocido por un complejo proteico que incluye al factor UPF1 [240].

No está claro si el proceso NMD clásico existe en tripanosomátidos, pero sí se ha descrito el homólogo de este factor UPF1 en *T. brucei* [241]. Además, la existencia de regulación de la degradación selectiva de ciertos ARNm sugiere fuertemente la presencia de programas de decaimiento de ARN específicos también en tripanosomátidos [242].

1.7.3 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ARNm

La **localización** del ARN involucra el enriquecimiento de un *set* de ARNm en regiones subcelulares específicas. Puede darse pasivamente a través de protección local de los mismos de la degradación o alternativamente a través de su anclado en localizaciones celulares particulares. Además, la distribución asimétrica de los ARNs también puede ser el resultado de transporte activo de los ARNs a través de complejos proteicos RBP-proteínas motoras [243,244]. Los resultados del estudio a nivel global de la distribución espacial de los ARNm, sustentan la idea de que el *pool* de ARNm en el citoplasma no se encuentra desorganizado dispuesto al azar para ser eventualmente traducido. Se cree que aún en células no polarizadas, muchos de los ARNm se organizan espacialmente para ser traducidos localmente, almacenados o degradados [245]. La localización de los ARNm en los *P bodies*, parece ser una alternativa a la traducción en eucariotas [246]. En estos cuerpos de procesamiento los ARNm también podrían ser almacenados en lugar de ser siempre degradados, y ser reciclados volviendo al pool de ARNm traduccionalmente activo en las condiciones celulares apropiadas [247-249]. Por otro lado, existe evidencia de la existencia de ARNm no traducido en el citoplasma de *T. cruzi* [250,251].

1.7.4 REGULACIÓN DE LA TRADUCIBILIDAD DE LOS ARNm

La traducibilidad refiere al reclutamiento diferencial de los ARNm a los ribosomas para ser traducidos. La existencia de control traduccional de la expresión génica se basa en la regulación de la cantidad de ARNm que es convocado a la fracción polisomal, por oposición a los que son retenidos en los gránulos de estrés o los *P bodies* sufriendo represión traduccional [252] y la velocidad con que se lleva a cabo este proceso. Al igual que en las etapas *post*-transcripcionales antes mencionadas, este control está mediado por señales contenidas en el propio mensajero.

En cuanto al uso de codones, en tripanosomátidos, existe un enriquecimiento en ciertos codones “favorecidos” en genes altamente expresados. En consistencia con esta selección traduccional, los genes para ARNt correspondientes a estos codones están también más representados [253]. Esto sugiere la existencia de control a nivel de traducción como un importante mecanismo de regulación de la expresión de proteínas en tripanosomátidos.

La evaluación cuantitativa de los ARNm en diferentes ribonucleopartículas (RNP) citoplasmáticas, tales como los polirribosomas, ha proporcionado nuevas perspectivas en el estudio de la regulación *post*-transcripcional abarcando desde niveles globales de ARN hasta la dinámica de ARNm específicos. La generalización de estas aproximaciones, así como la incorporación de análisis en masa para el estudio de cantidad y localización de

huellas ribosomales permitirá revelar las señales involucradas así como comprender los alcances de esta etapa de regulación [254].

1.8 ELEMENTOS EN *CIS* Y REGULONES *POST-TRANSCRIPCIONALES*

Los diferentes mecanismos de regulación *post-transcripcional* están mediados por factores en *trans* (ya sea proteínas, ARNs o metabolitos) que reconocen elementos en *cis* conservados en el ARN. Estos elementos pueden estar localizados generalmente en las regiones no traducidas (3' UTR y 5' UTR) pero también pueden localizarse dentro de la secuencia codificante de los mensajeros [255]. Los elementos de unión a RBPs pueden ser muy variados no solo en cuanto a su secuencia primaria sino también en su estructura secundaria [256].

Los **elementos en *cis*** presentes en las regiones UTR están involucrados en prácticamente todos los mecanismos de control de la expresión [257-263]. Se han descrito muchos ejemplos de secuencias regulatorias en las regiones 3'UTR (algunos ejemplos ver [264-270]). En *T. cruzi* se ha adjudicado la expresión diferencial de varias proteínas de superficie a la modulación de la estabilidad del ARNm por unión de proteínas que reconocen secuencias conservadas en el 3'UTR. Tal es el caso del ARNm que codifica para la proteína de superficie gp82 cuyo mensajero se acumula en el estadio metacíclico y es desestabilizado en parásitos en estadio epimastigota [271], o el caso de los ARNm para las proteínas tipo mucinas (TcSMUG) más estables en epimastigotas y más inestables en tripomastigotas [272,273]. Existen otros ejemplos como el de la regulación de la expresión de la amastina que es más estable en amastigotas que en epimastigotas [274] o de la alfa tubulina cuya región 3'UTR está involucrada en la modulación de la estabilidad de estos ARNm en respuesta a ciertos estímulos que imparten cambios en la dinámica de los microtúbulos [257]. Por otro lado, se demostró que la estabilidad del ARNm que codifica para la proteína de choque térmico HSP70 aumenta en condiciones de aumento de temperatura y además de la presencia de elementos en la región 3' UTR en este caso, este fenómeno es dependiente también de elementos presentes en la región 5'UTR [275]. En todos estos casos, el uso de genes reporteros permitió demostrar la importancia de la región 3'UTR en la modulación de la estabilidad en *T. cruzi*.

Dada la transcripción constitutiva, la regulación de la expresión génica **estadio específica**, depende de la interacción de proteínas reguladoras específicas con elementos conservados presentes en las regiones UTR. Un ejemplo lo constituyen los genes *PGKB* y *PGKC* que codifican para las dos isoformas de la fosfoglicerato quinasa transcritos por la ARN Polimerasa II. Estos dos genes se encuentran adyacentes pero se expresan en diferentes estadios del parásito [276]. Este hecho se ha constatado también en la expresión de otros genes (revisado en [277]) y se ha visto, al igual que para *PGKC*, que la regulación de la expresión está ligada a

elementos presentes en las regiones 3'UTR del ARNm [278]. Se ha descrito en *T. cruzi* la presencia de un elemento rico en U de 43 nucleótidos que se localiza en las regiones 3'UTR de un gran número de ARNm. Este elemento está involucrado, junto con otras secuencias aún no identificadas, en el control de la abundancia de los ARNm que lo contienen en el estadio amastigota del parásito [279].

Entre los elementos en *cis* involucrados en la estabilidad de los ARNm, se distinguen los **elementos GRE** (*GU-rich element*) [280,281]. Por otro lado, los **elementos ARE** (*AU-rich element*) constituyen el grupo mayor y el más estudiado de los elementos reguladores en *cis* en el ARNm [282,283]. Los elementos ARE canónicos generalmente incluyen una o más copias del pentámero AUUUA el cual se encuentra rodeado de un contexto rico en U [284-286]. Estos elementos se han clasificado en tres grandes grupos basado en el número repetidos de pentámero AUUUA y en el contexto en que se encuentra este elemento [282]. En particular, se ha demostrado que secuencias ricas en AU presentes en la región 3'UTR de los ARNm son reconocidas por proteínas de unión al ARN del tipo RRM (*RNA Recognition Motif*), las cuales son capaces de modular la vida media de los ARNs promoviendo la estabilización o degradación selectiva de los ARNm en *T. cruzi* [287].

A menudo, diferentes ARNm funcionalmente relacionados contienen un mismo elemento conservado presente en la región UTR, el cual es blanco de unión de una sola RBP reguladora. Existen por tanto, grupos de mensajeros co-regulados *post*-transcripcionalmente formando lo que se describió como un **regulón *post*-transcripcional** (revisado en [201,288]). Se han descrito regulones *post*-transcripcionales en diversos organismos desde levaduras hasta células de mamíferos. Quizá el ejemplo mejor estudiado sean las RBPs de la familia *Pumilio* en levaduras donde se observó que cada proteína se une y desestabiliza un *set* diferente de ARNm que codifican para proteínas de función relacionada [289]. En tripanosomátidos también se han encontrado grupos de ARNm co-regulados por una misma proteína reguladora. Por ejemplo la proteína PUF9 regula un grupo de ARNm involucrados en el control del ciclo celular en *T. brucei* [290]. Otros ejemplos son la proteína TbDRBD3 que modula la abundancia de un grupo de ARNm que codifican para proteínas de membrana [291] y la proteína TbZFP3 que se une a un grupo de ARNm estadio específicos regulando su estabilidad [292]. Además se ha postulado la existencia de otros potenciales regulones adicionales en *T. brucei* [293-296].

1.9 PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN

El genoma de *T. cruzi* codifica para un gran número de proteínas con dominios de unión al ARN predichos que podrían interactuar con las regiones UTRs reguladoras influenciando los niveles de expresión génica.

Entre el 3 y el 11 % de los proteomas de bacteria, arqueas y eucariotas constituyen proteínas de unión al ARN putativas [297]. El gran número de RBPs en todos los organismos reflejaría un temprano origen de la regulación por ARN el cual posiblemente constituya la parte evolutiva más conservada de la fisiología celular. Las RBPs comprenden un importante grupo de proteínas implicadas en un vasto rango de procesos celulares [297]. Algunos de los motivos de unión al ARN, tales como el RRM (*RNA Recognition Motif*) se encuentran exclusivamente en eucariotas, y por tanto, deben haber sido adquiridos más tarde en la evolución [297].

Ya que las RBPs participan en funciones muy diversas, sería coherente entonces pensar que existe una gran diversidad en las estructuras de estas proteínas que serían responsables del reconocimiento de las diversas moléculas de ARN blanco. Sin embargo, la mayoría de las RBP están compuestas por unos pocos motivos de unión al ARN (ver **TABLA 1.9.1**) y la enorme diversidad de sustratos se obtiene gracias a la presencia de múltiples copias de dominios de unión al ARN que se reorganizan estructuralmente para expandir el repertorio funcional de estas proteínas [298]. Los módulos de uno o diferentes tipos se combinan para crear superficies de unión versátiles que definen la especificidad de estas proteínas. Además, se conjugan también con dominios de interacción con otras proteínas y dominios enzimáticos que definen los blancos de las enzimas y regulan su actividad catalítica (**FIGURA 1.9.1**).

Dominio	Topología	Estructuras representativas (PDB ID)
RRM	$\alpha\beta$	U1A N-terminal RRM [299] (1URN)
KH (tipo I y tipo II)	$\alpha\beta$	Nova-1 KH3 (tipo I) [300] (1EC6), NusA (tipo II) [301] (2ASB)
dsRBD	$\alpha\beta$	dsRBD3 de Staufen [302] (1EKZ)
ZFP-CCHH	$\alpha\beta$	Dedos 4–6 de TFIIIA [303] (1UN6)
ZFP-CCCH	Estructura secundaria poco regular	Dedos 1 y 2 de TIS11d [304] (1RGO)
S1	β	Ribonucleasa II [305] (2IX1), exosoma [306] (2NN6)
PAZ	$\alpha\beta$	PAZ [307] (1S13), Argonauta [308] (1U04), Dicer [309] (2FFL)
PIWI	$\alpha\beta$	PIWI [310] (1YTU), Argonauta [308] (1U04)
TRAP	β	TRAP [311] (1C9S)
Pumilio	α	Pumilio [312] (1M8Y)
SAM	α	Vts1 [313] (2ESE)

TABLA 1.9.1 Dominios de unión al ARN. Se listan los dominios más comunes de unión al ARN con la topología característica de cada una de ellas. dsRBD, dominio de unión al ARN doble hebra; KH, homología K; RRM, dominio de reconocimiento del ARN (*RNA-recognition motif*); ZFP, proteína dedo de zinc (*zinc finger*) PDB ID, identificación en el Protein Data Bank

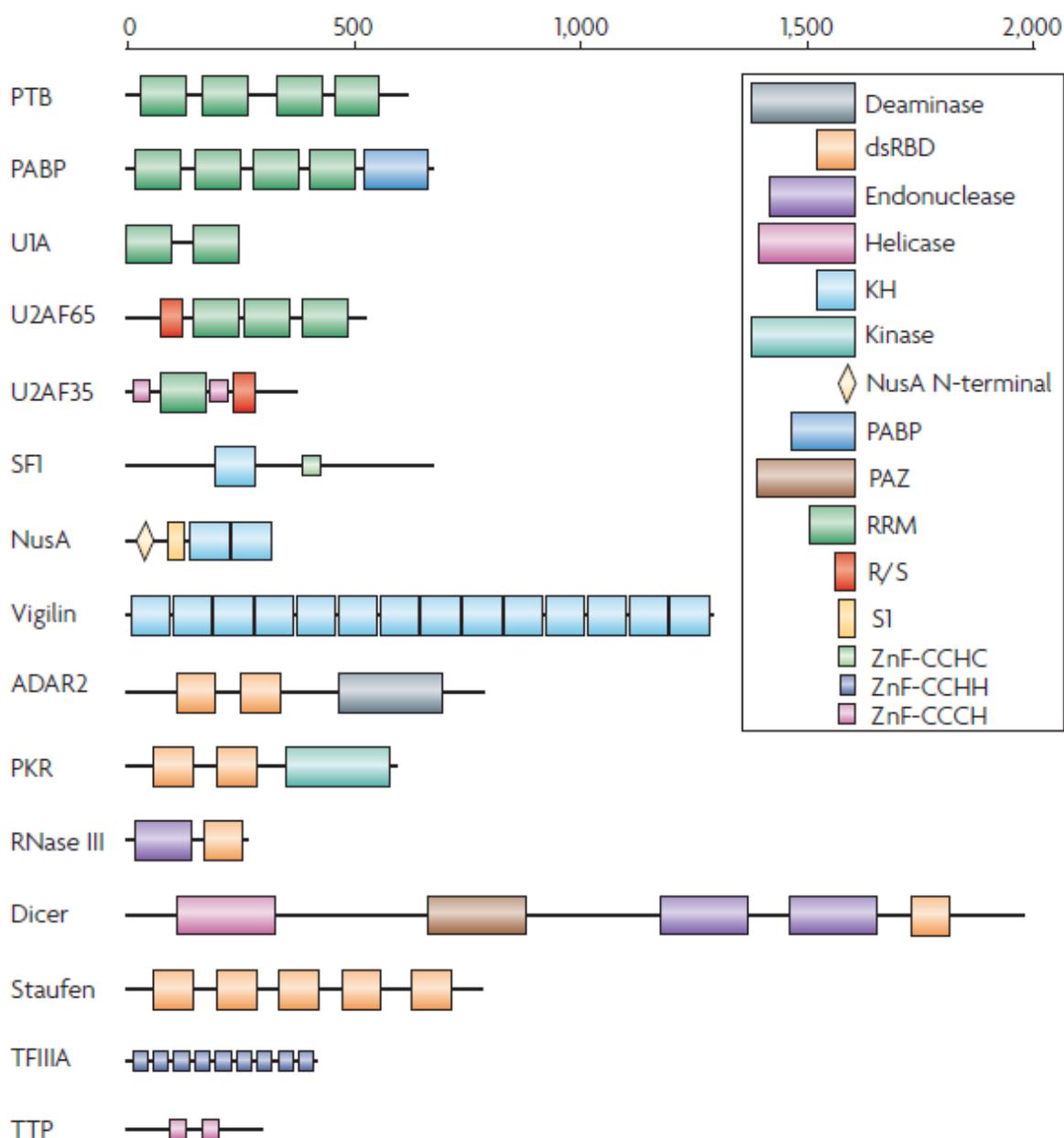


FIGURA 1.9.1 Estructura modular de las proteínas de unión al ARN. Se muestran ejemplos representativos de las RBPs más comunes. Los diferentes dominios se representan por cajas coloreadas, también se muestran dominios enzimáticos y módulos funcionales menos comunes tales como PABP (proteína de unión a PoliA); PTB (proteína de unión a tracto de polipirimidinas); R/S (dominio rico en Arginina y Serina); SF1 (factor de *splicing* 1); TTP (tristetraprolina); U2AF (factor auxiliar U2). Extraído de Lunde y cols. [314].

Las características distintivas de las RBPs como grupo, fueron analizadas por Mittal y cols. 2009, tomando como modelo *S. cerevisiae* [315]. Este grupo demostró que los ARNm que codificaban para RBPs eran significativamente menos estables (en su vida media) comparados con los ARNm que no codificaban RBPs. Sin embargo, observaron que los ARNm para RBPs son traducidos con una mayor eficiencia. Además, sus análisis revelaron que las RBPs son significativamente más estables que las demás proteínas. Estos resultados indican que el grupo de las RBPs se puede producir rápidamente y en forma abundante por

tiempos cortos. Este mecanismo evita la acumulación de ARNm en la célula, de hecho, se ha reportado que la mayoría de las RBPs de levaduras autorregulan su actividad mediante el control de la estabilidad de su propio ARNm [256].

1.10 EL DOMINIO RRM

El dominio **RRM** es por lejos el motivo más común y mejor caracterizado de los módulos de unión al ARN. El mismo se compone de 80-90 aminoácidos que forman 4 láminas β antiparalelas con dos α hélices dando el patrón topológico característico $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (**FIGURA 1.10.1**).

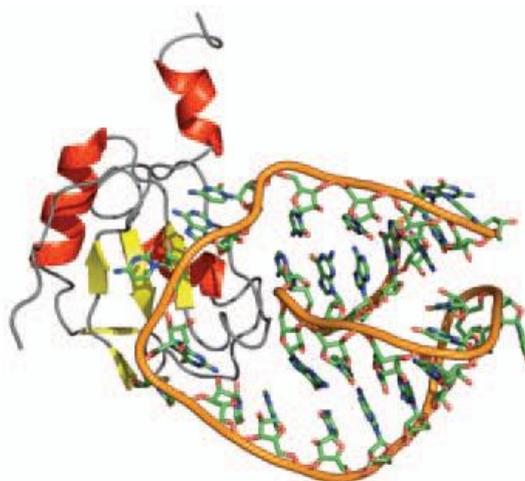


FIGURA 1.10.1 Estructura del dominio N terminal del RRM de la proteína U1A humana unida al ARN. En esta estructura, así como en muchos otros complejos RRM-ARN, las bases simple hebra en el ARN son reconocidas por aminoácidos que forman las hojas β antiparalelas. Extraído de Oubridge y cols. [299].

El RRM está compuesto por dos submotivos de 8 y 6 aminoácidos conservados, el RNP1 y RNP2 respectivamente [316-318]. En estos submotivos, se encuentran tres residuos aromáticos que son muy importantes en el reconocimiento ARN-proteína. Estos residuos aromáticos se localizan en el RNP1 (lámina β 3) y en el RNP2 (lámina β 1) (**FIGURA 1.10.2**). El submotivo RNP1 se encuentra altamente conservado y su secuencia consenso es un octámero definido como: K/R-G-F/Y-G/A-F/Y-V/I/L-X-F/Y, mientras que la secuencia aminoacídica del RNP2 se encuentra menos conservada entre diferentes proteínas homólogas siendo el consenso el hexámero: I/V/LF/Y-I/V/L-X-N-L [319]. En general, son solo 4 los aminoácidos claves que contribuyen a la unión con el ARN blanco, los cuales se posicionan en el aminoácido 1, 4 y 5 en el RNP1 y en la posición 2 en el RNP2. Estos residuos claves son aminoácidos cargados y aromáticos que exponen sus cadenas al solvente e interactúan directamente con el ARN (revisado en [319]). Los bucles que conectan las láminas β también tiene un rol importante en el reconocimiento de los ácidos nucleicos resultando en una mayor superficie de unión al ARN (revisado en [320]).

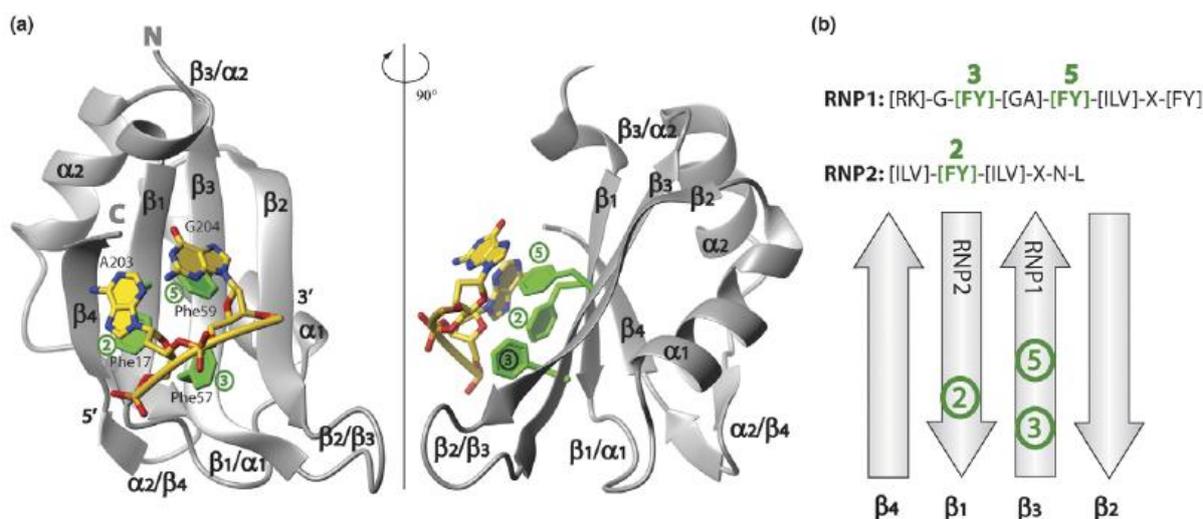


FIGURA 1.10.2 Esquema de la interacción de las láminas β del RRM con el ARN **(a)** Estructura del RRM2 de la proteína hnRNP A1 unida al ADN telomérico simple hebra. Extraído de Ding y cols. [321] **(b)** Esquema de las cuatro hojas β donde se localizan los principales residuos aromáticos en los submotivos RNP1 y RNP2 (indicados con números verdes). Se muestran las secuencias consenso de los submotivos RNP en el RRM, X significa cualquier aminoácido. Extraído de Clery y cols. [320].

Las RBPs y en particular las RBPs que contienen RRM han sido exhaustivamente estudiadas debido a la implicancia adicional del RRM en interacciones proteína-proteína (revisado en [320], así como también en el transporte de las proteínas al núcleo, de hecho, la mayoría de las RBPs entran y salen del núcleo [285,322-324]).

1.10.1 PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ARN EN *T. CRUZI*

La mayoría de las proteínas de unión al ARN identificadas en *T. cruzi* no han sido aún caracterizadas, y muchas de ellas parecen ser exclusivas de tripanosomátidos lo cual sugiere una función específica del parásito. Dentro de las pocas RBPs caracterizadas en *T. cruzi* se incluyen diversos motivos de unión al ARN (revisado en [325,326]).

Se han identificado proteínas con motivos *dedo de Zinc* tipo CCCH en tripanosomátidos [327-329]. Existe evidencia de que estas proteínas ZFP (*zinc finger protein*) tienen un rol en procesos de diferenciación y al menos una de ellas (*ZFP3*) funciona como regulador de la traducción (revisado en [325]).

Otro motivo de unión al ARN caracterizado en *T. cruzi* es el motivo *Pumilio* presente en proteínas que regulan la expresión de ARNm mediante la interacción con secuencias específicas en la región 3'UTR a la vez que reclutan proteínas que degradan el ARN o ejercen represión traduccional [330]. Se han analizado 10 proteínas con motivo *Pumilio* (proteínas Puf) en *T. cruzi* y se las ha dispuesto en diferentes grupos según la predicción de su probabilidad de unión al sitio canónico de unión a *Pumilio nanos response element* (NRE) de

32pb. En el grupo 1 (TcPuf1 y TcPuf2) se encuentran aquellas proteínas que se unen a la secuencia NRE completa. Las proteínas del grupo 2 (TcPuf3-6, TcPuf9) se unirían al menos a un motivo conservado dentro de la secuencia NRE, mientras que las proteínas del grupo 3 (TcPuf7-8, TcPuf10) son más diversas y se unen a secuencias diferentes al NRE [331]. La interacción con el NRE fue experimentalmente probada para las proteínas TcPuf1 y TcPuf6 [331,332]. Para TcPuf6 se identificaron mediante cromatografía de afinidad en *tandem* ocho ARNm blanco, los cuales aparecían disminuídos cuando TcPuf6 estaba sobreexpresada indicando una función desestabilizadora de la proteína sobre sus ARNm blanco [333].

Inicialmente, en el genoma de *T. cruzi* se identificaron 77 proteínas de unión al ARN con el motivo RRM [334], luego, con otros criterios de búsqueda, se identificaron 4 proteínas más haciendo un total de 81 proteínas con RRM en *T. cruzi* [335]. Solo unas pocas de estas proteínas tienen ortólogos en otros eucariotas que no sean los Trityps, alguna de ellas son la PABP, el factor de inicio de la traducción eIF3B y el factor de *splicing* U2AF35. De las proteínas exclusivas de kinetoplastidos, solo unas pocas han sido caracterizadas experimentalmente y todas ellas juegan un rol en la regulación de la estabilidad de los ARNm (revisado en [325]). Un ejemplo representativo de RRM en *T. cruzi* es la proteína TcUBP1. TcUBP1 está involucrada en la estabilización estadio específica de ciertos ARNm en el citoplasma [287]. La caracterización de esta proteína surge con el objetivo de identificar factores de unión a elementos ARE presentes en la región 3'UTR del ARNm de proteínas mucinas (TcSMUG) [272]. Además de unirse a *tcSMUG*, la proteína TcUBP1 interacciona con otros 39 transcritos [336], reconociendo un elemento estructural en forma de horquilla en la región 3'UTR de los mismos. TcUBP1 puede homodimerizar y puede formar un gran complejo ribonucleoproteico junto con la proteína TcUBP2 y la PABP [337]. Se postula que la proteína TcUBP1 es un factor desestabilizador ya que su sobreexpresión desestabiliza el ARNm que codifica para TcSMUG [287]. Tanto TcUBP1 como TcUBP2 se localizan principalmente en el citoplasma del parásito, pero en condiciones de estrés nutricional, estas proteínas son movilizadas a gránulos de estrés [338] participando en la protección de los transcritos asociados. En parásitos estresados con arsenito, TcUBP1 y TcUBP2 se acumulan gradualmente en el núcleo, lo que llevó a proponer que el RRM actuaría, al menos en el caso de TcUBP1, como señal de localización nuclear [324]. Otras proteínas con RRM estudiada en *T. cruzi* son la proteína TcRBP3 que interacciona con un grupo de ARNm los que mayoritariamente codifican para proteínas ribosomales [336] y la proteína TcRBP40 que une algunos ARNm que contienen en sus 3'UTR secuencias ricas en AG [335].

La existencia de niveles adicionales de control, tales como el procesamiento del ARNm, la exportación de los ARNm al citoplasma, la modulación de la vida media de los ARNm o de las proteínas y las modificaciones *post*-traduccionales, sugieren que la regulación global de la expresión génica es un proceso bastante

complejo en el que participan varios factores en *trans*. La observación de que muchas de las proteínas de unión al ARN en tripanosomátidos carecen de un ortólogo en otros eucariotas, provee una plataforma interesante para identificar nuevos procesos y un uso potencial en el diseño racional de nuevas drogas. Sin embargo, mientras que las proteínas de unión al ARN toman cada vez más y más relevancia en diferentes aspectos de la regulación *post*-transcripcional, se conoce aún muy poco sobre los elementos reconocidos y la mecánica de interacción de las RBP en *T. cruzi*.

La dependencia de un genoma entero básicamente en la regulación *post*-transcripcional, es un hecho sin precedentes [325]. La regulación de la expresión de genes individuales parece basarse en un mecanismo que combina la interacción de factores en *trans* y elementos en *cis* en cada ARNm. La mayoría de los elementos en *cis* que afectan la vida media y la traducción de los ARNm han sido localizados en las regiones 3' no traducidas (3'UTR). Por lo tanto, los esfuerzos se han dirigido principalmente a la identificación de los factores en *trans* que interaccionan con estas regiones. En ese contexto, los estudios se han centrado en el análisis de proteínas de unión al ARN, las cuales juegan un rol crucial en los mecanismos de regulación *post*-transcripcional. Como se indicó anteriormente, hasta la fecha, son muy pocos los factores en *trans* que se han identificado en *T. cruzi*, y menos aún se sabe de su función y las secuencias blanco con las que interaccionan.

La proteína TcRBP19 es una proteína de unión al ARN que comenzó a ser estudiada en el marco de mis trabajos de Licenciatura y Maestría [339,340]. Esta proteína presenta un dominio altamente conservado del tipo RRM conteniendo los elementos característicos RNP1 y RNP2 (**FIGURA 2.1.1**).

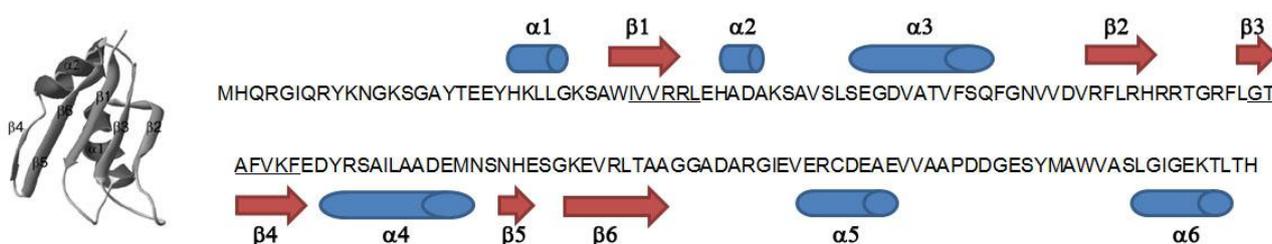


FIGURA 2.1.1 Esquema de la proteína TcRBP19. Se muestra un diagrama de un RRM típico a la izquierda, y a la derecha la estructura primaria y secundaria de la proteína TcRBP19. Se indican las hojas beta en rojo y las hélices alfa en azul. Los subdominios conservados RNP1 y RNP2 se indican subrayados en la secuencia.

Análisis bioinformáticos revelan que TcRBP19 se diferencia de las otras proteínas con RRM reportadas en *T. cruzi* [341]. De hecho, esta proteína, se posiciona como una rama independiente dentro de la familia de proteínas con RRM estudiada hasta el momento [340]. Mediante Blast se vio que TcRBP19 es una proteína exclusiva de kinetoplastidos, ya que no tiene ortólogos en otros metazoarios, un hecho que ha dificultado la inferencia de su función por homología.

Los ensayos de *Southern blot* con diferentes endonucleasas revelaron un perfil compatible con un gen de copia única (**FIGURA 2.1.2**), hecho que fue confirmado con el reporte de la secuencia del genoma de *T. cruzi* en el año 2005 [53]. Mediante electroforesis en campo pulsado se vio que el gen se localiza en un cromosoma de alto peso molecular [339,340].

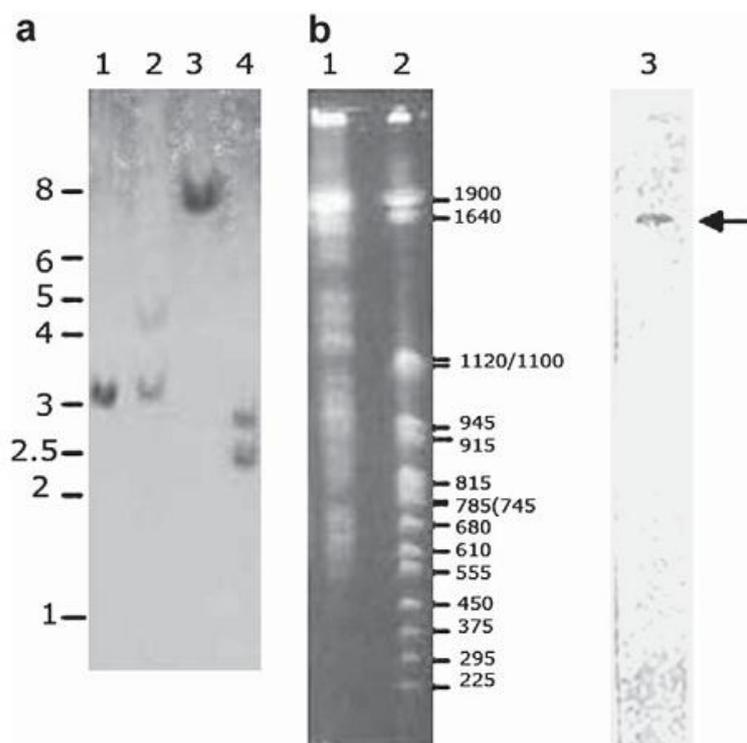


FIGURA 2.1.2 Análisis genómico de *tcrbp19*. **(A)** *Southern blot* usando 10 μ g de ADN genómico de *T. cruzi* digerido con las enzimas de restricción *BamH* I (carril 1), *EcoR* I (carril 2), *Nco* I (carril 3) y *Pst* I (carril 4). La membrana fue hibridada con una sonda marcada radiactivamente correspondiente a una región de 400 pb del gen *tcrbp19*. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular en kilobases: 1 kb ladder (Promega). **(B)** Localización cromosómica del gen *tcrbp19* por electroforesis en campo pulsado. En el carril 1 se muestra los cromosomas de *T. cruzi* separados por electroforesis en campo pulsado y teñidos con bromuro de etidio. En el carril 2 se muestra el marcador de peso molecular (*Yeast Chromosome PFG Marker*, New England Biolabs). En el carril 3 se muestra al autorradiografía del carril 1 transferido a una membrana Hybond N+ e hibridado con la misma sonda que se usó para el *Southern blot*. Con una flecha se indica la señal correspondiente al gen *tcrbp19*. Extraído de Pérez-Díaz y cols. [342].

La proteína de fusión GST-TcRBP19 recombinante fue purificada y usada para la producción de un anticuerpo policlonal en conejo. En ensayos de *Western blot* se pudo detectar TcRBP19 principalmente en el estadio amastigota en niveles sumamente bajos (**FIGURA 2.1.3**). Asimismo, generamos una cepa de *T. cruzi* que sobreexpresa la proteína TcRBP19 mediante transfección de parásitos salvajes con el plásmido *pTEX-TcRBP19* y selección con neomicina (**FIGURA 2.1.3** carril 6).

Estudios de especificidad de la unión de TcRBP19 por el ARN a través de ensayos de EMSA con los cuatro homopoliribonucleótidos revelan que esta proteína no solo se une a ARN *in vitro*, sino que también es capaz de discriminar entre diferentes ribosondas prefiriendo poliC frente a los otros homopolímeros [339,340].

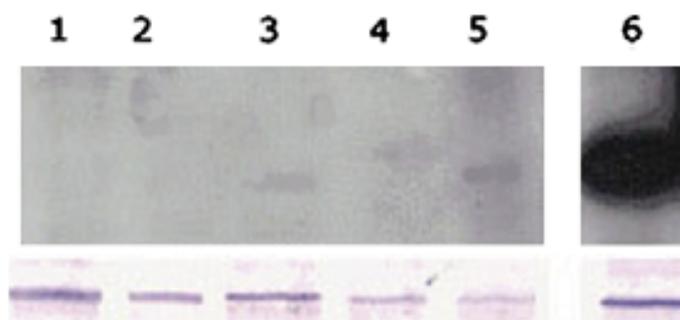


FIGURA 2.1.3 Expresión de TcRBP19 a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*. *Western blot* amplificando la señal del anticuerpo primario anti-TcRBP19 con proteína A marcada con [¹²⁵I]. Se usó un extracto proteico total de 10⁸ parásitos salvajes por carril. Carril 1: epimastigotas, carril 2: metacíclicos, carril 3: amastigotas axénicos, carril 4: tripomastigotas; carril 5: amastigotas celulares; carril 6: epimastigotas transfectadas con el vector *pTEX-TcRBP19*. En el panel inferior se muestra los mismos extractos usando anticuerpo primario anti-PEPCK usado como control interno. Extraído de Pérez-Díaz y cols. [342].

Dado que TcRBP19 presenta una baja expresión, la cual es característica de proteínas que intervienen en regulación en etapas tempranas o específicas durante el ciclo de vida y teniendo en cuenta que la regulación de la expresión génica en *T. cruzi* parece operar principalmente a nivel *post*-transcripcional, resulta particularmente interesante el estudio de la funcionalidad de esta proteína de unión a ARN para comprender los eventos de regulación génica en estos parásitos. Por otra parte, su presencia exclusiva en tripanosomátidos y su expresión preferencial en el estadio intracelular del hospedero mamífero, convierten a TcRBP19 en una probable proteína blanco para diseño racional de fármacos para combatir la enfermedad de Chagas.

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es contribuir a la comprensión de la regulación de la expresión génica de *T. cruzi* procurando comprender el modo de acción de TcRBP19, una proteína de expresión diferencial y exclusiva de tripanosomátidos que posee un motivo funcional de unión al ARN.

Para ello, nos planteamos no solo analizar la función de la proteína en el parásito, sino también acercarnos a conocer los mecanismos de regulación de su expresión, que ayudarían a entender los mecanismos responsables de la expresión diferencial de TcRBP19 lo largo del ciclo de vida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos particulares, se pretende:

- Analizar el fenotipo de parásitos que sobreexpresan TcRBP19
- Determinar la localización subcelular de TcRBP19
- Identificar y analizar los ARNs blanco a los cuales se une TcRBP19
- Identificar y analizar proteínas que interaccionan con TcRBP19.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CÉLULAS

4.1.1 BACTERIAS COMPETENTES

Escherichia coli XL1-Blue [343]. Genotipo: *supE hsdR lac⁻ F' proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*.

Escherichia coli BL21 [344] cepa deficiente en proteasas para expresión de proteína recombinante clonada en pGEX4T-1. Genotipo: *F⁻, ompT, hsdS (rB⁻, mB), gal*.

Escherichia coli One Shot TOP10 (Invitrogen). Genotipo: *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*.

4.1.2 PARÁSITOS

Trypanosoma cruzi clon Dm28c [345].

4.1.3 CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Células VERO (ATCC Catálogo Nº CCL-81™). Células de riñón de mono verde africano [346].

Células HeLa (ATCC Catálogo Nº CCL-2™). Células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix de útero [347].

4.2 VECTORES PLASMÍDICOS

4.2.1 VECTORES DE CLONADO

Para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR se usó el vector *pCR[®]2.1-TOPO[®]* (Invitrogen) y el vector *pGEM-T easy* (Promega). Estos sistemas están diseñados para clonar productos de PCR generados por la *Taq* polimerasa ya que poseen un nucleótido de timina 3' protuberante lo cual además evita la recircularización del vector. El clonado en el sistema TOPO es aún más eficiente gracias a la presencia de una topoisomerasa I covalentemente unida al vector en sitios específicos que es capaz de introducir cortes en el esqueleto fosfodiéster luego de 5'-CCCTT en una hebra y al revertir la reacción es liberada [348]. Se usó el vector *pGem-T easy* para clonar las regiones 3'UTRs de los genes de interés para transcripción *in vitro* a partir del promotor T7 localizado corriente arriba de las regiones de interés. Las ligaciones fueron realizadas según protocolos establecidos por el comerciante.

4.2.2 VECTOR DE EXPRESIÓN DE GST-TcRBP19

pGEX-4T-1-TcRBP19: se usó el vector *pGEX-4T-1* (Amersham Biosciences) con el gen de la proteína TcRBP19 clonado en fase. Esta construcción fue obtenida previamente en nuestro laboratorio para la expresión de TcRBP19 fusionada a la proteína glutatión S transferasa (GST) [339]. La expresión de la proteína recombinante está bajo el control de un promotor inducido por IPTG. El vector también contiene un gen *lacI^q* interno cuyo producto génico es una proteína represora que se une a la región operadora del promotor del gen lo cual previene la expresión del mismo hasta su inducción con IPTG, con ello se consigue controlar la sobreexpresión del péptido recombinante.

4.2.3 VECTORES DE TRANSFECCIÓN DE *T. CRUZI*

Se seleccionó el plásmido *pTEX* [349] que fue diseñado para la expresión de genes en *T. cruzi*. Dicho vector permite amplificar las construcciones de interés en sistemas bacterianos y su posterior transfección en células del parásito. El ADN transfectado, se mantiene extracromosomalmente como un repetido de círculos concatenados entre sí. En este plásmido las regiones genómicas que dirigen la expresión de los genes *gapdh* I y II (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas), son utilizadas para regular la síntesis del gen de interés y del gen de resistencia a Neomicina (neomicina fosfotransferasa) que permite la selección de los parásitos transfectantes [349]. Un aumento en la concentración de antibiótico Neomicina o su análogo G418 en el medio, conlleva a un aumento en el número de copias de plásmido con el consiguiente aumento en la expresión del gen de interés.

Para el estudio de los efectos de las regiones regulatorias, se utilizó el plásmido *pTEX-CAT* conteniendo la secuencia del gen reportero para la cloramfenicol acetil transferasa (CAT) (**FIGURA 4.2.1**) En dicho vector la expresión del reportero queda bajo el control de la región regulatoria del gen *gapdh* I.

Para la sobreexpresión de la proteína TcRBP19 en *T. cruzi*, se utilizó el plásmido *pTEX-TcRBP19* previamente construido [340,342]. Se construyó además el vector de expresión para *T. cruzi* *pTEX-TAP-tag* fusionado a la proteína TcRBP19 (*pTEX-TcRBP19-TAP-tag*), para poner a punto el sistema de purificación en *tandem* de afinidad (TAP) en *T. cruzi* [350] y purificar proteínas de unión a TcRBP19. El vector *pTEX-TAP-tag* fue cedido por el Dr. Esteban Serra (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Instituto de Biología Molecular y Celular, Dpto. Microbiología, Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Dicho vector fue construido a partir del vector de expresión *pTEX* donde introdujo un *cassette* que comprende la proteína A y un péptido de unión a calmodulina (CBP) [350] (**FIGURA 4.2.1**).

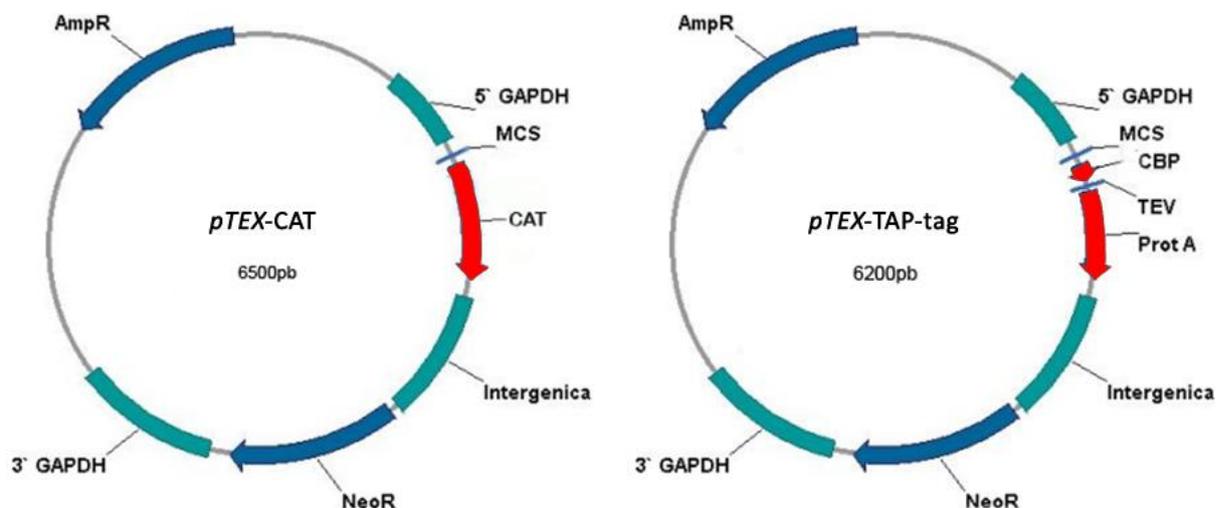


FIGURA 4.2.1: Esquema de los vectores de expresión en *T. cruzi* utilizados. (a) Plásmido *pTEX-CAT*. (b) *pTEX-TAP-tag*. Los genes de resistencia a ampicilina (AmpR) y geneticina (NeoR) se muestran en azul. CBP: Péptido de unión a la calmodulina. TEV: Sitio de corte para la proteasa TEV. Prot A: Secuencia codificante de la proteína A. NeoR: Resistencia a G418. AmpR: Resistencia a ampicilina. MCS: Sitio de clonado múltiple. 5' GAPDH, Intergénica, 3' GAPDH: Regiones UTRs e intergénicas de los genes *gapdh I* y *II* usadas para el correcto procesamiento del gen reportero.

4.3 SOLUCIONES Y TAMPONES

Solución de Denhardt's 50X: Ficoll 400 10 mg/mL, polivinilpirrolidona 10 mg/mL, seroalbúmina bovina 10 mg/mL.

Solución de prehibridación: SSC 5X, SDS 0,2 %, Solución Denhardt's 5X y 500 µg/mL ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado mecánicamente.

Solución de CaCl₂ para preparación de células competentes: CaCl₂ 60 mM; glicerol 15%; PIPES 10 mM, pH 7. Se esteriliza con filtro de 0,22 µm.

Solución Ponceau S para teñir membranas en Western blot: Ponceau S 0,5%; ácido acético 1%.

Solución de Azul de Coomassie: azul de Coomassie R 0,2%, metanol 40% y ácido acético 10%

Solución de hibridación de microarreglos: SSC 5X; Denhardt's 4,2X; ADNss 0,21 mg/mL; SDS 0,42%; Formamida 42%

Solución de extracción para obtención de ADN total de parásitos: 1 parte de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); 1 parte de fenol; 1 parte de tampón A; 1 punta de espátula de 8 hidroxiquinoleína. Se homogeneiza y se deja reposar 1 día. Se cubre la botella con papel de aluminio y se guarda a 4° C.

Tampón A para extracción de ADN de parásitos: Tris-HCl 0,2 M pH 8; EDTA 0,1 M pH 8.

Tampón TAE 10X: Tris-HCl 0,4 M pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8,0, ácido acético hasta pH 7,2.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM.

Tampón de corrida formaldehído 5X: MOPS 0,1 M, acetato de sodio 40 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Tampón de aplicación: Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 25 mM, NaN₃ 0,02%.

Tampón de carga para ADN: azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25%, glicerol 30%.

Tampón de carga para ARN: glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25%.

Tampón de carga para SDS PAGE 2X: Tris-Cl 100 mM pH 6,8, DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% y glicerol 20%.

Tampón de corrida para SDS-PAGE 5X: 15,1 g Tris base, 72 g glicina, 5g SDS.

Tampón de transferencia para Western blot: Tris base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄, pH 7,4.

Tampón PBS-T: PBS 1x, Tween 20 0,1% v/v.

Tampón SET para preparación de plásmidos: sacarosa 20%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, EDTA 6,5 mM.

Tampón de electroporación HBS: Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 7 mM, glucosa 6 mM, pH 7,4.

Tampón de lisis de parásitos: Tris-Cl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; CHAPS 1%; glicerol 10% Tritón 0,5% e inhibidores de proteasas.

Tampón de unión para EMSA y crosslinking: Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 M.

Tampón P puromicina para polisomales: KCl 500 mM, MgCl₂ 2 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NP40 1%, sacarosa 0,2 M, puromicina 2 mM.

Tampón TKM para polisomales: Tris 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, y KCl 300 mM.

PSG: 13,48 g Na₂HPO₄, 0,69 g NaH₂PO₄·H₂O, 4,25 g NaCl, 20 g glucosa para 2 L.

Tampón de acoplamiento para Affi-gel 10: Hepes 100 mM pH 7,3, CaCl₂ 10 mM.

Tampón *ipp*: Tris 50 mM pH 7,5; KCl 150 mM; EDTA 5 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 80 µg/mL; NP-40 0,2%.

Tampón de equilibración para geles 2D: urea 6 M, Tris 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%.

Tampón de lisis para TAP-tag: Tris-Cl 10 mM pH 7,8, NaCl 10 mM, NP-40 0,1% y una tableta de inhibidores de proteasas *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche).

Tampón *IPP150*: Tris-Cl 10 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, IGEPAL 0,1% y una tableta de inhibidores de proteasas *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche).

Tampón proteasa *TEV*: Tris-Cl 10 mM pH 7,8, NaCl 10 mM, IGEPAL 0,1%, una tableta de inhibidores de proteasas *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche), EDTA 0,5 mM y DTT 1 mM.

4.4 MEDIOS DE CULTIVO

Medio líquido *LB*: bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L pH 7.

Medio *LB agar*: medio *LB* líquido más bacto agar al 1,5%.

Medio *LIT*: 4 g NaCl, 0,4 g KCl, 15 g Na₂HPO₄·7H₂O, 2 g glucosa, 3 g infusión de hígado, 5 g triptosa, hemoglobina 2%, suero bovino fetal 10%, 30 mg estreptomina, 50 mg penicilina y agua hasta llegar a un litro.

TAU: NaCl 190 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; CaCl₂ 2 mM; tampón fosfato 8 mM pH 6 y bicarbonato de sodio al 0,035%.

TAU3AAG: medio *TAU* suplementado con L-glutamato 50 mM, L-aspartato 2 mM y glucosa 10 mM.

MEM TAU pH 5,8: consiste en una mezcla 1:1 de medio *TAU3AAG* y medio *MEM* (Sigma M2645) suplementado con suero fetal bovino al 5%, sacarosa 70 mM, hemoglobina 20 mg/mL, penicilina 200 U/mL, estreptomina 200 µg/mL y MES 20 mM (ácido morfolino etanosulfónico).

4.5 CULTIVO IN VITRO DE *T. CRUZI*

4.5.1 CULTIVO DE ESTADIO EPIMASTIGOTA

Los epimastigotas fueron cultivados a 28°C en medio líquido de infusión hepática y triptosa (LIT) suplementado con suero fetal bovino al 10% previamente tratado 15 min a 65°C para la inactivación del complemento. Rutinariamente los cultivos se repicaron cada 72 h a fin de mantenerlos en fase exponencial de crecimiento.

Para el cultivo de transfectantes, se seleccionaron con G418 los parásitos transfectados y se mantuvo la presión selectiva con 250 µg/mL de dicho antibiótico.

4.5.2 METACICLOGÉNESIS *IN VITRO*

La metaciclogénesis *in vitro* se llevó a cabo según Contreras *et al.* [31]. Los parásitos fueron cultivados en medio LIT a 28°C partiendo de un cultivo de 10⁶ parásitos/mL de medio. Antes de inducir la diferenciación, se realizaron tres repiques cada 72 h manteniendo el cultivo en 10⁶ parásitos/mL. En el último repique, se dejó el cultivo crecer a 28°C hasta alcanzar el final de la fase exponencial de crecimiento (densidad celular aproximada de 5x10⁷ parásitos/mL). Estos parásitos fueron centrifugados y resuspendidos en medio TAU en una concentración de 5x10⁸ células/mL. Se incubaron durante 96 h a 28°C con la botella en posición horizontal de manera que los epimastigotas se adhieran a la botella de cultivo y se diferencien. Los parásitos así estresados fueron luego incubados en botellas de 200 mL de medio TAU3AAG (concentración final 5x10⁸ células/mL), hasta que se liberan al medio la mayoría de los parásitos adheridos a la botella de cultivo (3 días). Finalmente, en el sobrenadante se obtienen los tripomastigotas ya diferenciados y adheridos a la botella se encuentran los epimastigotas no diferenciados. Para recuperar estos últimos, se sacó el sobrenadante, se agregó PBS a la botella y se agitó vigorosa y violentamente la botella para despegar los parásitos adheridos.

La metaciclogénesis *in vitro* a partir de parásitos que sobreexpresan la proteína TcRBP19 se realizó usando el protocolo descrito anteriormente. Se realizaron duplicados con dos réplicas biológicas (*pTEX-TcRBP19-A* y *pTEX-TcRBP19-B*) en dos experimentos independientes y se realizó un experimento control usando una cepa de *T. cruzi* transfectada con el plásmido *pTEX* vacío.

4.5.3 AMASTIGOGÉNESIS *IN VITRO*

La amastigogénesis primaria *in vitro* se realizó según el protocolo descrito por Contreras y col., [34] a partir de tripomastigotas metacíclicos. Para ello, primero se realizó la metaciclogénesis *in vitro* de *T. cruzi* bajo condiciones químicas definidas [31]. Se contaron 2x10⁸ parásitos tripomastigotas por botella de cultivo conteniendo 200

mL. Los tripomastigotas metacíclicos contenidos en el medio TAU3AAG fueron centrifugados 10 min a 4°C a 8000 rpm (rotor RI2A3 Himac CR 21G) y resuspendidos en medio Hanks/Hepes/CO₃ (1x/5 mM/4,17 mM) quedando a una concentración de 1x10⁸ parásitos/mL. Se agregó 1 volumen de suero de cobaya para lisar los epimastigotas presentes y se incubó 45 min a 37°C. Se centrifugó, y se lavó en medio PSG. Finalmente los tripomastigotas fueron resuspendidos en 2 mL de PSG y purificados en una columna DEAE-S2 de 10 mL estéril. La salida de metacíclicos se siguió por microscopía. Se centrifugaron los parásitos (1x10⁹) eluidos por gradiente de fuerza iónica y se resuspendieron en dos botellas de cultivo (175 cm²; Falcon Labware, Oxnar, CA) conteniendo 14 mL de medio MEM TAU pH 5,8. Los tripomastigotas metacíclicos en medio MEM TAU fueron incubados a 37°C en atmósfera con CO₂ al 5% durante tres días. De esta forma se diferencian a amastigotas *in vitro*, luego de tres días se realizó un repique y se mantuvieron los parásitos en medio MEM TAU aumentando la cantidad de suero fetal bovino a 10%.

La amastigogénesis *in vitro* a partir de parásitos que sobreexpresan la proteína TcRBP19 se realizó usando el protocolo descrito anteriormente. Se realizaron duplicados con dos réplicas biológicas (*pTEX-TcRBP19-A* y *pTEX-TcRBP19-B*) en dos experimentos independientes y se realizó un experimento control usando una cepa de *T. cruzi* transfectada con el plásmido *pTEX* vacío.

4.5.4 AMASTIGOGÉNESIS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Para la infección *in vitro* se utilizaron tanto células VERO como células HeLa. Se utilizaron tripomastigotas metacíclicos infectivos obtenidos *in vitro* tal como se describió anteriormente. Dichos parásitos fueron tratados 30 min a 37°C con igual volumen de suero de cobaya para eliminar los epimastigotas. Los parásitos fueron lavados 3 veces con *tampón NKM* (NaCl 40 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM pH 7,4) y se usaron para infectar en una relación parásito:célula de 10:1. Alternativamente, se infectaron células de mamíferos usando parásitos metacíclicos provenientes de cultivos de epimastigotas envejecidos 10 a 15 días a los cuales no se les cambiaba el medio de cultivo para generar un estrés nutricional [32].

Las monocapas infectadas fueron cultivadas en medio RPMI (SIGMA) a 37°C sin agitación en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 4 días. Luego de las 24 h de infección, se cambió el medio diariamente y las células infectadas fueron seguidas por microscopía óptica. Se realizaron cuatro réplicas técnicas en el caso de la infección con células VERO y tres réplicas técnicas en las infecciones con HeLa. En todos los casos se contaron 300 células.

Los datos obtenidos fueron evaluados a través de análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó el test Tukey's y el test χ cuadrado para determinar la significancia estadística. En todos los casos, la diferenciación fue monitoreada por conteo de células en un hematocitómetro.

4.6 MANIPULACIÓN DE BACTERIAS

4.6.1 CULTIVO DE BACTERIAS

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

4.6.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

Para la preparación de células químicamente competentes se usaron los protocolos descritos por Ausubel [351]. Brevemente, se inoculó 50 mL de medio LB con una colonia única y se incubó 12 h a 37°C. Posteriormente, se inoculó 4 mL del cultivo en 400 mL de medio LB, dejándose crecer a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,375. El cultivo fue alicuotado en 8 tubos de 50 mL y se deja enfriar en hielo durante 10 min. Luego de centrifugar (1.600g, 7 min), se resuspendieron las bacterias en 10 mL de *solución de CaCl₂* y se dejaron en hielo 30 min. Finalmente, se volvió a centrifugar y a resuspender las bacterias en 2 mL de *solución de CaCl₂* frío con 15% glicerol. Las bacterias competentes fueron alicuotadas de a 100 µL y almacenadas a -80°C hasta su uso.

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

4.7 AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.7.1 AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE PARÁSITOS

Para el aislamiento de ADN total de los parásitos cultivados se usó el *Kit* de extracción de ADN genómico *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del comerciante. Dicho *kit* está basado en un proceso de cuatro pasos [352]. El primer paso en el proceso de purificación consiste en la lisis celular. En el segundo paso, se rompen los núcleos y se incluye digestión con ARNasa. Las proteínas celulares son removidas en un paso de precipitación salina, en el cual precipitan las proteínas y queda el ADN genómico de alto peso molecular en solución. Finalmente, el ADN genómico se concentra y se desala mediante precipitación con isopropanol.

Alternativamente se usó el protocolo que se detalla a continuación. Se centrifugaron 2×10^8 parásitos a 3.000 rpm 15 min a 4°C (rotor JA 14, centrifuga Beckman) y se resuspendió el *pellet* en 4 mL de *tampón A*. Se pasó a tubo Falcon y se agregó una punta de espátula de proteinasa K (Promega) y 0,2 mL SDS 10% y se incubó 12 horas. Para la extracción de ADN, se agregaron 0,8 mL de NaCl 0,5 M y 5 mL de solución de extracción, se agitó por inversión 15 min, y se centrifugó 15 min a 3.000 rpm (rotor JA 14, centrifuga Beckman). Luego, se pasó la fase superior a un nuevo tubo con pipeta estéril y se repitió la extracción con solución de extracción. Se volvió a extraer la fase acuosa con igual volumen de cloroformo: isoamílico (24:1) y finalmente se precipitó la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol absoluto (mantenido a -20°C) y se dejó 30 min a -80°C. Finalmente, se lavó el ADN con etanol 70% a -20°C y se resuspendió en 4 mL *tampón TE*. El ARN resultante fue tratado con 40 µg de ARNasa A (USB) y posteriormente se separó la enzima del ADN con sucesivas extracciones con solución de extracción y cloroformo:isoamílico para finalmente volver a precipitar el ADN.

4.7.2 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Para la realización de minipreparaciones de plásmido se utilizó el método de lisis alcalina. Brevemente, se cultivaron células conteniendo el plásmido de interés en medio líquido LB hasta la fase estacionaria. Se transfirió cada cultivo a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó por 30 seg. El *pellet* se lavó con 1 mL de *tampón SET* y luego se resuspendió en 150 µL de dicho tampón. A continuación, se agregó 50 µg de ARNasa A y, luego de mezclar bien, se agregó 350 µL de la mezcla lítica (SDS 1%, NaOH 0,2 M). Dicha solución alcalina, se neutralizó con 250 µL de acetato de sodio 3 M pH 4,8 y se agitó por inversión. Se colocó 30 min en hielo para precipitar el SDS y el ADN cromosómico y luego, se centrifugó 20 min a 4°C. Al sobrenadante, conteniendo el ADN plasmídico, se le adicionó un volumen de isopropanol, se agitó por inversión, se dejó a TA por 15 min y se centrifugó 20 min. Se lavó el *pellet* con 200 µL de etanol 70%, se volvió a centrifugar por 5 min, se secó el *pellet* y finalmente se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas.

Para la preparación de plásmido en grandes cantidades y altamente puro para transfecciones de *T. cruzi*, se utilizó el *kit QIAGEN Plasmid Midi* según protocolo establecido por el comerciante. Este sistema utiliza columnas de intercambio aniónico diseñadas para purificar ácidos nucleicos.

4.7.3 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE PARÁSITOS

Se partió de 1×10^8 parásitos contados al microscopio en una cámara Neubauer para los experimentos con epimastigotas en fase exponencial de crecimiento y 1×10^9 parásitos para el caso de amastigotas.

Se usó el reactivo *TRIZOL* (Lifetechnologies-Invitrogen) para aislar ARN total siguiendo las instrucciones del comerciante. Este reactivo combina fenol y tiocianato de guanidina en una sola fase para facilitar la inmediata inhibición de la actividad ARNasa a la vez que provoca la lisis celular. Luego de la adición del reactivo se agrega cloroformo con lo cual se forma una mezcla de dos fases capaz de ser separada por centrifugación. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, el ADN en la interfase y las proteínas en la fase orgánica. Al tomar la fase acuosa y pasarla a otro tubo se puede precipitar el ARN con isopropanol. Finalmente se lava el ARN con etanol 70% y se solubiliza en H₂O libre de nucleasas.

Alternativamente, se usó el *kit RNeasy* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones recomendadas por el comerciante. Mediante este método, las muestras biológicas son lisadas y homogeneizadas en presencia de tampón desnaturante conteniendo tiocianato de guanidina, el cual inactiva a su vez las ARNasas para asegurar la purificación de moléculas intactas de ARN. Se agrega además etanol para generar las condiciones apropiadas de unión a columnas con membrana de sílica de RNeasy Mini spin, donde se une selectivamente el ARN total y los contaminantes son lavados a través de la membrana. Finalmente, el ARN es eluído con agua libre de ARNasas.

Para eliminar las trazas de ADN del ARN extraído el mismo fue tratado con el *kit DNasefree* (AMBION) según las recomendaciones del fabricante con una modificación en el tiempo de incubación con la ADNasa. Se usaron incubaciones de 10 min en lugar de los 30 min recomendados, debido a la degradación del ARN constatada. Para verificar la eficiencia del tratamiento, las muestras de ARN tratado con ADNasa y sin tratar fueron analizadas por qPCR (*ver 4.11*). Se consideró un tratamiento aceptable, cuando la diferencia en el número de ciclos al umbral de amplificación (Cts) entre ambas muestras era mayor o igual a 5.

4.7.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para ver el estado físico y concentración del ADN y ARN, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 0,8-2% en TAE 1X y se midió su densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes (ACTGene ASP-3700).

4.8 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.8.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Mediante esta técnica, los ácidos nucleicos de diferente tamaño pueden ser separados y posteriormente ser transferidos a filtros o bien purificados a partir del gel. Se utilizaron geles con un porcentaje de agarosa entre 0,7 y 1,5 según los tamaños de los fragmentos a ser separados. Los geles fueron preparados en *tampón TAE 1X* y la separación se realizó con voltajes entre 20 y 100 V de 1 a 5 horas. Las muestras fueron cargadas con *tampón de*

carga para ADN de concentración final 1x. Para el análisis de muestras de ARN se usó *tampón de carga para ARN*, y el gel de agarosa al 1% se preparó en tampón MOPS 1X y formaldehído 2,2 M para obtener condiciones desnaturalizantes. En estos casos la electroforesis se realizó en *tampón de corrida MOPS 1X*.

Los ácidos nucleicos fueron visualizados mediante tinción con 0,5 µg/mL de BrEt bajo luz ultravioleta.

4.8.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Rutinariamente, se prepararon geles de acrilamida 12%, a partir de acrilamida-bis acrilamida (37,5:1), usando persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) como agentes polimerizantes. Se utilizó *tampón TBE 1x* como tampón de corrida.

La visualización se realizó por el método de tinción con nitrato de plata. En esta tinción primeramente se lava el gel en solución fijadora (10% etanol absoluto, 0,5% ácido acético) durante 30 seg en un microondas. Luego el gel se coloca en solución de Nitrato de Plata 2 g/L y se vuelve a colocar 30 seg en microondas. El revelado se realiza en solución 30 g/L NaOH y 0,5% formaldehído, durante 15 min.

4.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20-50 µL conteniendo 1 U de *DreamTaq* (Fermentas), una mezcla de 0,1- 0,5 µM de los cebadores, 1X tampón de reacción conteniendo MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM de una mezcla de nucleótidos (dNTPs) y 50-100 ng del ADN molde a amplificar. Las condiciones de PCR y el número de ciclos de amplificación se ajustaron para cada caso. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1-2% en *tampón TAE 1X*.

4.10 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Para la obtención de la primera hebra de ADNc, 1-2 µg del ARN extraído fue desnaturalizado por calor a 70°C en presencia de dNTPs (1 mM) y 500 ng del cebador oligo(dT)₂₀ o 250 ng de hexámeros al azar. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µL usando el *kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) conteniendo MgCl₂, tampón RT, RNase OUT, y 200 U de SuperScript III RT. La reacción se incubó 50 min a 50°C y se detuvo calentando 5 min a 85°C. Finalmente se agregó ARNasa H para remover el ARN del híbrido ADNc:ARN. El ADNc resultante fue diluído 1/5 y usado para las reacciones de amplificación.

Alternativamente se usó el *kit RETROscript* (AMBION) también en un volumen final de 20 µL conteniendo tampón RT con MgCl₂, inhibidor de ARNasa y 100 U de MMLV-RT. La reacción se incubó 50 min a 50°C y se detuvo

calentando 10 min a 92°C. Para la obtención de la segunda hebra se diluyó el ADNc obtenido en una dilución 1/5 con H₂O libre de ARNasas. Se ensayaron diferentes condiciones de PCR usando como cebadores al oligo-dT y cebadores específicos complementarios a la secuencia de interés.

4.11 PCR CUANTITATIVO (PCR EN TIEMPO REAL)

Para la cuantificación mediante PCR (qPCR), se utilizó la mezcla comercial *2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (QIAGEN). Esta contiene la sonda fluorescente *SYBR Green*, la enzima *Hot Start Taq* ADN polimerasa, dNTPs y un tampón adecuado. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen total de 10 o 20 µL conteniendo los cebadores en una concentración de 0,9 µM. Se realizaron triplicados técnicos de cada reacción. Para la amplificación, se incubó inicialmente durante 15 min a 95°C para activar la polimerasa. Luego, se realizaron ciclos de amplificación de 15 seg a 95°C (desnaturalización del molde) y 60 seg a 60°C (hibridación de los cebadores y polimerización de los nucleótidos), repitiéndose 40 veces este ciclo.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron diseñados usando el programa *OligoPerfect™ Designer* (Invitrogen) disponible en (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) y se sintetizaron en IDT, Operón o Macrogen. Las secuencias de los mismos se detallan en la **TABLA 4.11.1**:

- Como control interno para la normalización de los resultados se usaron los cebadores *lpgapdh1* y *lpgapdh2* dirigidos a amplificar el gen que codifica para la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*gapdh I*).
- Para la amplificación del gen reportero *cat* (cuya amplificación permite además calcular el número de copias de plásmido *pTEX-CAT* por parásito comparando con el gen control *gapdh*) se utilizó el par cebador *lpcat1* y *lpcat2*.
- *5'UTRfw* y *5'UTRrev* para el análisis de ARNm que codifican para la proteína TcRBP19 endógena. Estos oligonucleótidos cebadores fueron diseñados para hibridar en la región 5'UTR del gen *tcrbp19* de manera de poder diferenciar el ARNm *tcrbp19* endógeno del que proviene del plásmido *pTEX-TcRBP19* en el transfectante.
- Para el análisis de estabilidad de ARNm por qPCR y para confirmar los resultados del GST-*pull down* con ARN total de amastigotas se diseñaron los cebadores:
 - *Tc19fw* y *Tc19rev* que hibridan en la región codificante del gen *tcrbp19*.
 - *ARP2/3-11Fw* y *ARP2/3-11rev* que hibridan con la región codificante del gen Tc00.1047053508737.194 que codifica para una subunidad del complejo Arp2/3.
 - *GCN5-12Fw* y *GCN5-12rev* que hibridan con la región codificante del gen Tc00.1047053509453.30.

- *ZincFinger-6Fw* y *ZincFinger-6rev* que hibridan con la región codificante del gen Tc00.1047053506469.139 que codifica para un homólogo de la proteína Dph3 en levadura y a la que llamamos TcDph3.
- *1-84Fw* y *1-84rev* que hibridan con la región codificante del gen Tc00.1047053504035.84, que codifica para la subunidad SDH11 del complejo mitocondrial II [353].

Oligonucleótido	Secuencia
<i>lpgapdh1</i>	5' -cgacaacgagtggggatact-3'
<i>lpgapdh2</i>	5' -ctacaaccttgccgaacgat-3'
<i>lpcat1</i>	5' -gcgtgttacggtgaaaacct-3'
<i>lpcat2</i>	5' -ggattggctgagacgaaaa-3'
<i>5'UTRfw</i>	5' -ggtgacggttggtgcttctggc-3'
<i>5'UTRrev</i>	5' -gcacccgatttgccggttcttg-3'
<i>Tc19fw</i>	5' -aggcattcagcgttacaagaac-3'
<i>Tc19rev</i>	5' -cgatttgccaagaagtttgtg-3'
<i>ARP2/3-11Fw</i>	5' -ccgcctatattgccttactacg-3'
<i>ARP2/3-11rev</i>	5' -gctccacggtacatgaaggat-3'
<i>GCN5-12Fw</i>	5' -ccaccgttggtgtctccatc-3'
<i>GCN5-12rev</i>	5' -gatcaaaccttccagcactga-3'
<i>ZincFinger-6Fw</i>	5' -tttcactacgaggaggtgcag-3'
<i>ZincFinger-6rev</i>	5' -ccgaaagctcgaatagatcg-3'
<i>1-84Fw</i>	5' -gcaggttcgccactttacttc-3'
<i>1-84rev</i>	5' -cggtaaaataccgtgcattcc-3'

TABLA 4.11.1. Oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificación por qPCR.

Todos los productos de amplificación tienen entre 90 y 100 pb. Es importante que los productos tengan tamaños similares para poder comparar los resultados, ya que tamaños diferentes de productos tienen intensidades de fluorescencia diferentes. Se analizó además la eficiencia de los oligonucleótidos cebadores usados para constatar que los pares comparados tuvieran la misma eficiencia de reacción. La eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar de número de ciclos en el umbral de amplificación (*Cycle threshold*) Ct vs. Log[ADN] con ADN genómico de *T. cruzi* usando un rango de concentraciones entre 0 y 80 ng de ADN (0, 5, 10, 20, 40 y 80 ng) y las mismas condiciones de qPCR previamente especificadas. Para el cálculo de la eficiencia (Ef) se utilizó la siguiente ecuación $Ef = 10^{(-1/pend)}$ donde *pend* es la pendiente del gráfico referido.

En los casos de cuantificación de ARN (qRT-PCR), se incluyó en cada corrida un control sin ADNc molde (*NTC*) para chequear la pureza de los componentes del PCR y un control usando ARN no sometido a retrotranscripción para chequear contaminación del ADNc con ADN genómico. Con respecto a la preparación de ARN y síntesis de ADNc, todas las muestras comparadas fueron tratadas usando protocolos idénticos y en paralelo, para minimizar la variación. En todos los casos se incluyó un tratamiento con ADNasa del ARN usando el *kit DNasefree* (AMBION) y se chequeó la integridad y concentración del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa y medidas espectrofotométricas a 260 nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes (ACTGene ASP-3700). Se realizaron curvas de disociación de las muestras entre 65 y 95°C para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Las amplificaciones fueron analizadas por primera vez en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para descartar la presencia de más de un amplicón.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador RotorGene 6000 (Corbett). Los datos fueron obtenidos y procesados primeramente con el programa asociado (RotorGene 6000 *software*) seleccionando un umbral para la determinación del Ct entre 0,05 y 0,5 (dependiendo del par de cebadores utilizados) y una línea de base entre el ciclo 6 y 10. Los datos fueron exportados a programa *Excel* (Microsoft) para ser graficados y analizados estadísticamente.

4.12 SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de ácidos nucleicos se realizó mediante secuenciación automática contratando el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo ó alternativamente el servicio de secuenciación de Macrogen en Seúl, Corea.

4.13 PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS

4.13.1 OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA GST-TcRBP19 RECOMBINANTE

La obtención de la proteína recombinante de fusión GST-TcRBP19 se realizó a partir del vector *pGex4T-1-TcRBP19* previamente construido [340]. Brevemente, se creció un cultivo de bacterias *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido *pGex4T-1-TcRBP19* en 500 mL de LB ampicilina (100 µg/mL) a 37°C con agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,7. Se indujo la expresión de la proteína con IPTG 0,5 mM y se incubó 3 h a 28°C. El cultivo fue centrifugado a 7.000g 10 min a 4°C para sedimentar las células, resuspendido en 25 mL de PBS frío suplementado con inhibidores de proteasas (100 µL AEBSF 100 mM, 3 µL DTT 2 M, 100 µL pepstatina 1mg/mL, 50 µL leupeptina 4 mg/mL) y sonicado en hielo (7 pulsos de 15 seg cada uno a máxima potencia en un sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Parmer Instrument Co). Luego de sonicado el cultivo, fue

suplementado con 20% tritón X-100 y agitado durante 30 min en hielo para ayudar a la solubilización de la proteína. El lisado fue posteriormente centrifugado 20 min a 15.000g a 4°C y el sobrenadante fue filtrado en un filtro de 0,45 µm. La proteína de fusión con GST se purificó por cromatografía de afinidad usando glutatión inmovilizado en una matriz de Sefarosa (GE Healthcare). Se lavó con PBS la proteína de fusión unida al ligando. Finalmente, se eluyó la proteína por competencia con glutatión 10 mM en tampón Tris-HCl 50 mM, usando condiciones no desnaturizantes que preservan la integridad de la proteína.

4.13.2 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE PARÁSITOS

La preparación de proteínas solubles se realizó a partir de epimastigotas de *T. cruzi* en fase exponencial. Los parásitos se centrifugaron 15 min a 1.500g y se lavaron 3 veces con PBS frío. Se resuspendieron en *tampón de lisis de parásitos* a una concentración de 5×10^8 parásitos/mL y se dejó agitando 30 min en hielo. Finalmente se centrifugó el lisado 1 h a 4°C a 20.000g y se almacenó el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles a -80°C.

Para la obtención de proteínas totales, se centrifugaron los parásitos a 1.500g durante 15 min y se lavaron con PBS. Luego se resuspendieron en PBS e igual volumen de *tampón de carga para SDS PAGE 2x* hasta una concentración final de 1×10^6 parásitos/µL.

4.13.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó usando el *kit Protein Assay* (BIO-RAD). El mismo se basa en el método de Bradford [354] e implica la adición de un colorante ácido a la solución proteica y subsecuente medida espectrofotométrica a 595 nm. La comparación con una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (SIGMA) permitió obtener una medida de la concentración proteica en la muestra problema.

4.13.4 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES: SDS PAGE

La separación de proteínas de acuerdo a su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) según el método de Laemmli [355]. En todos los casos, la composición del gel concentrador fue de Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 5%/bisacrilamida 0,1%, APS 0,04% y TEMED 0,1%. La composición del gel separador fue de Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,04%, TEMED 0,05% y los porcentajes de acrilamida fueron escogidos según el peso molecular de las proteínas a separar entre 10% y 15%.

Las muestras de proteínas se prepararon con un volumen de *tampón de carga para SDS PAGE 2x* y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min inmediatamente antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó en *tampón de corrida para SDS-PAGE 1x*. Se utilizó una cuba Mini-V 8.10 Vertical Gel Electrophoresis System (Gibco BRL), realizándose la electroforesis a un voltaje entre 80 y 100 V.

Tinción con Azul de Coomassie. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en 15% etanol y 10% ácido acético y teñidos con una solución de Azul de Coomassie durante al menos 40 min. Posteriormente los geles se destiñeron en una solución de ácido acético 10%.

Tinción con Azul de Coomassie Coloidal para espectrometría de Masas MALDI-TOF. Los geles fueron fijados en solución 30% etanol con 2% ácido fosfórico durante toda la noche. Se hicieron 3 lavados de 30 min cada uno con agua ultrapura. Se agregó luego la solución de tinción conteniendo 18% metanol, 17% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2% ácido fosfórico; y se dejó agitando una h a TA. Se agregó al gel en la solución de tinción 0,5 g/L de Coomassie Blue G-250 en polvo. Se agitó suavemente por 1-2 días y se lavó el gel con agua ultrapura.

Tinción con Nitrato de Plata para espectrometría de Masas MALDI-TOF. Para esta técnica se tuvo la precaución de trabajar en condiciones de evitar la contaminación con proteínas en el procedimiento. Para esto se trabajó con guantes de látex libres de polvo, material exhaustivamente lavado y separado para este uso, así como soluciones nuevas y filtradas de uso exclusivo para esta metodología. Luego de la corrida electroforética se fijó el gel durante 20 min en metanol 50%, ácido acético 10% por dos veces consecutivas. Se dejó el gel 10 min en etanol 20% y luego 10 min en agua. Luego, se sometió a reducción con tiosulfato de sodio (0,2 g/L) durante un min y se paró la reacción realizando dos lavados sucesivos con agua durante 20 seg. Se incubó posteriormente, durante 30 min en nitrato de plata (2,0 g/L) y se lavó 20 seg con agua. A continuación, se sumergió el gel en solución de revelado conteniendo carbonato de sodio (30 g/L), formaldehído (1,4 mL de solución 37%/L) y tiosulfato de sodio (10 mg/L) durante 30 seg, se descartó la solución y se dejó en el remanente de solución de revelado hasta obtener la intensidad de banda deseada. Finalmente, se detuvo la reacción sumergiendo el gel en ácido acético 1% durante, al menos 20 min. Los geles se guardaron en una solución de etanol 10% y glicerol 4%.

4.14 ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Se separaron las proteínas en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL™* (GE Healthcare) en una cuba Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD) con *tampón de transferencia para Western blot* según protocolos establecidos [351]. Se dejó transferir durante 1 h a 100 mA. Se desarmó la transferencia y se bloqueó la membrana con 5% de leche descremada en PBS-T durante una h con agitación. Se lavó la membrana con PBS-T en exceso y se incubó una h con el anticuerpo primario.

En el caso de TcRBP19 se usó un anticuerpo policlonal hecho en conejo, diluído 1/250 en PBS-T. Se usaron además como control otros anticuerpos primarios anti-TcPuf6 [332] y anti-S7 [356]. Se realizaron 4 lavados de 15 min con PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo unido inespecíficamente. El anticuerpo unido fue detectado usando otro anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa (*AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L)*, Jackson ImmunoResearch) diluído 1/7500. Se realizaron 4 lavados de 15 min con PBS-T. El desarrollo de color se llevó a cabo usando 5 mg de DAB (SIGMA) diluído en 10 mL Tris 0,05 M pH 7,6 y 10 μ L H₂O₂ 30%. La reacción fue detenida con agua.

Como alternativa al método de revelado colorimétrico, se usó el método de revelado quimioluminiscente para aumentar la sensibilidad del método usando el sistema *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare).

4.15 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y ANÁLISIS DE POLISOMAS

La preparación de las fracciones enriquecidas en polisomas fue realizada según el protocolo previamente reportado por Holetz y cols. [230]. Los polisomas de dos o más ribosomas “cargados” en un solo ARNm se generan por reclutamiento secuencial de ribosomas individuales. Estos grandes complejos ribonucleoproteicos (RNP) pueden ser estabilizados con la droga cicloheximida y separados de las subunidades ribosómicas y de los monosomas mediante centrifugación diferencial de extractos celulares en gradientes de sacarosa.

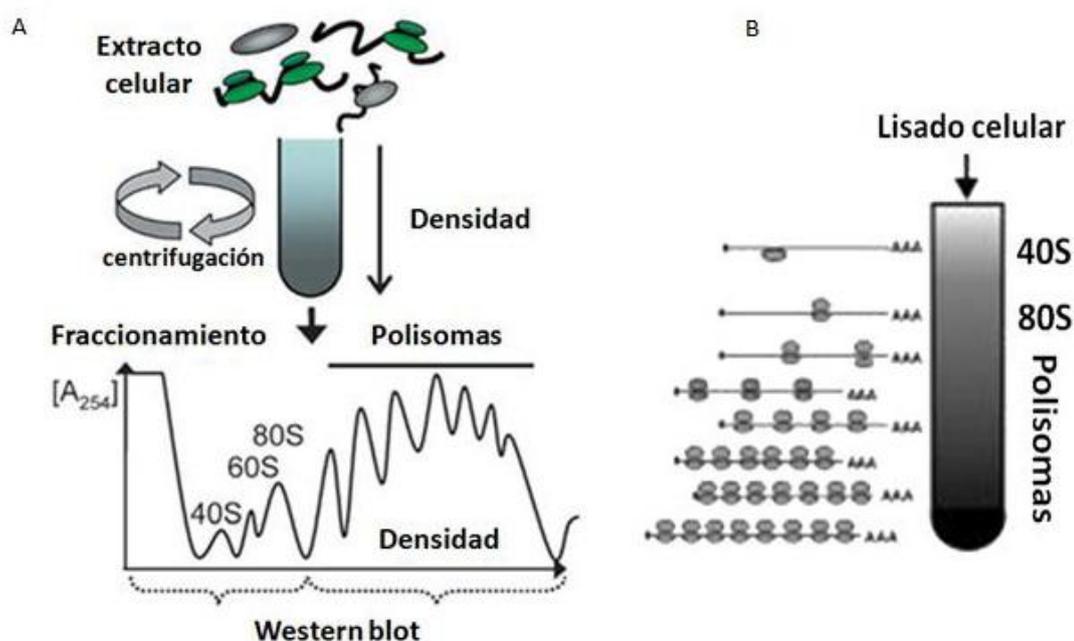


FIGURA 4.15.1 Diseño experimental del fraccionamiento polisomal. Los extractos fueron tratados con cicloheximida para atrapar los ARNm en los ribosomas previo a la centrifugación en gradiente de sacarosa. Luego

de la centrifugación en el gradiente, se tomaron diferentes fracciones conteniendo las subunidades ribosomales individuales, el ribosoma completo, dos ribosomas, tres y así sucesivamente. A medida que se fueron colectando las fracciones, se midió la Absorbancia a 254 nm para construir el perfil mostrado en **(A)**. Se muestra en **(B)** un esquema de la composición creciente de ribosomas en las fracciones a medida que aumenta la densidad en la misma. Tomado y modificado de Halbeisen y cols. [245].

Se incubaron 2×10^9 parásitos con cicloheximida en una concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células fueron mantenidas en hielo 5 min y luego lavadas con *tampón TKM* frío suplementado con cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, heparina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E-64 10 μM e inhibidores de proteasas libres de EDTA (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free Tablets*, ROCHE). La suspensión fue transferida a un tubo conteniendo 100 μL de *tampón* de lisis conteniendo *tampón TKM* suplementado con NP-40 10% (v/v) y sacarosa 2 M y se homogeneizó pipeteando constantemente. La lisis fue monitoreada por microscopía de contraste de fases. Se centrifugó el lisado a 18.000g a 4°C durante 5 min. Esta fracción enriquecida en polisomas fue cargada en un gradiente lineal de sacarosa 15-55% preparado en *tampón TKM* suplementado con inhibidores de proteasas y ARNasas (cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 1 mM, E-64 10 μM y heparina 1 mg/mL). Se centrifugó el gradiente durante 2 h a 4°C a 192.000g (rotor Beckman SW41). Se tomaron alícuotas de las diferentes fracciones (15-20 μL). Como control, una alícuota de la fracción enriquecida en polisomas se trató con EDTA 100 mM durante 15 min en hielo para desensamblar los ribosomas por quelado de Ca^{2+} . Por otro lado, y también como control para desensamblar los ribosomas, se preincubaron los parásitos con 2 mM puomicina durante 1 h a 28°C. Las células fueron lisadas en *tampón P* y centrifugadas a 16.000g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante fue cargado en el gradiente de densidad de sacarosa (15-55%) preparado en *tampón P* con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, E-64 10 μM y heparina 1 mg/mL) y centrifugado a 4°C durante 2 h a 192.000g (rotor Beckman SW41). Los perfiles polisomales y las fracciones fueron obtenidas usando un sistema de colección ISCO Foxy Jr. (velocidad de 1 mL/min, 30 seg/fracción y una velocidad de gráfico de 60 cm/hora). Finalmente se analizaron las fracciones obtenidas (20 μL) mediante ensayos de Western blot con un anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 [340]. Como control positivo en los Western blot de las fracciones polisomales se usó un anticuerpo anti-proteína ribosomal S7 [356] y como control negativo se usó un anticuerpo anti-Puf6 [333].

4.16 MARCADO RADIATIVO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Marcado radiactivo de oligonucleótidos sintéticos para EMSA. Se realizó el marcado de extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido quinasa (Fermentas) y ATP marcado isotópicamente con ^{32}P en la posición γ . Se marcó 100 ng de sonda por reacción usando 10 μCi [^{32}P] γ -dATP (Amersham Biosciences) durante 30 min a 37°C de acuerdo a métodos estándares [351]. Los productos marcados fueron luego purificados por gel filtración en columnas *MicroSpinTM G-25* (Amersham Biosciences).

Marcado radiactivo de ARN para EMSA. Las marcaciones de las 3'UTR de los genes de interés fueron realizadas por transcripción *in vitro* usando el kit *T7-MEGAscriptTM* (AMBION) según las recomendaciones del comerciante. Como molde para la transcripción se usó aproximadamente 1 µg del plásmido *pGem-T easy* (Promega) conteniendo las regiones 3'UTR clonadas corriente abajo al promotor T7. Dicho vector fue linealizado con 2 U de enzima *Spe I* (Fermentas) durante toda la noche a 37°C en el tampón provisto por el comerciante (**FIGURA 4.16.1**). El plásmido lineal resultante fue purificado a partir de electroforesis en gel de agarosa. Para la reacción de transcripción se usó 1 µg del plásmido linealizado conteniendo la región 3'UTR de los genes de interés (ver 4.20.1) bajo control del promotor T7. Se incubó con el tampón de reacción provisto por el comerciante, enzima T7 RNA polimerasa, los 4 ribonucleótidos (ATP, CTP, GTP, y UTP) y 10 µCi [³²P]α-UTP (Pekin Elmer) en 20 µL de reacción. Las reacciones de transcripción *in vitro* se incubaron durante 6 h a 37°C. Finalmente, se trató el producto de transcripción con 1 U de ADNasa I libre de ARNasas (Fermentas) por 10 min a 37°C y se purificó la sonda usando columnas *MicroSpinTM G-50* y *G-25* (GE Healthcare). Finalmente se verificó la integridad del ARN mediante geles de agarosa al 2%.

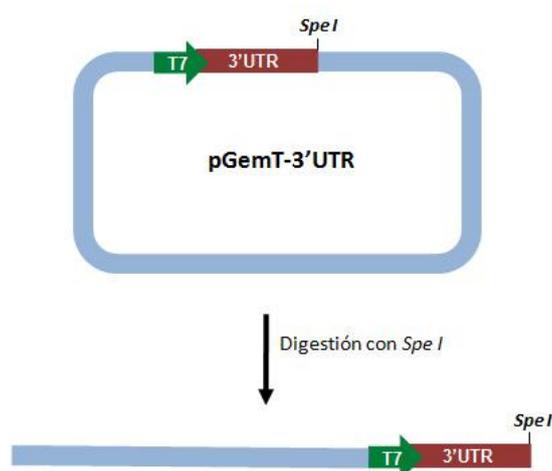


FIGURA 4.16.1. Linealización del plásmido *pGem-T easy* conteniendo las regiones 3'UTR de interés. Se incubó 1 µg de plásmido circular con 2 U de enzima *Spe I* para linealizar el plásmido conteniendo el promotor T7 corriente arriba de la región de interés a ser transcripta.

En todos los casos, la eficiencia de incorporación se determinó por medida de la emisión de 1 µL de reacción de marcado purificada y sin purificar en un vial de un contador de centelleo (Beckman LS600IC, Beckman Instruments). Para medir la radiación tipo β emitida por el ³²P Se empleó el Método Cerenkov (configurado como: *Isotype: 3H, Scintillator: Liquid, Time: 1 min, Data calculation: CPM*), determinándose así la actividad específica de la sonda expresada como cpm/ng de ADN. Las eficiencias de incorporación de nucleótido marcado variaron entre ≈17% en la reacción de transcripción *in vitro* y entre 29-60% en el caso del marcado de oligonucleótidos sintéticos en el extremo 5' con la polinucleótido quinasa.

4.17 CLONADO DE REGIONES 3'UTR DE GENES SELECCIONADOS EN EL GST-PULL DOWN DE ARN

Se realizó RT-PCR con oligonucleótidos cebadores específicos (**TABLA 4.18.1**) para amplificar las regiones 3'UTR de tres genes seleccionados a partir del GST-pull down con ARN total de amastigotas. Para ello se obtuvo el ADNc a partir de 500 ng de ARN retenido en la columna en el GST-pull down usando el kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) y 50 picomoles de oligo(dT)₂₀. El ADNc resultante fue diluido 1/5 y usado para las reacciones de amplificación.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>SDH11fw</i>	5' - GGATTGACTGCGGGATTTTC -3'
<i>ARP2/3fw</i>	5' - CACGAGGAAGTAGAAACAATGC -3'
<i>TcRBP19fw (LP1)</i>	5' - TGAGGACTATCGCAGCGCCATAC -3'

TABLA 4.18.1 Oligonucleótidos diseñados para amplificar las regiones 3'UTR de 3 genes seleccionados en el GST-pull down con ARN total de amastigotas. Usando estos oligonucleótidos y el oligo(dT)₂₀ se logra la amplificación de la región 3'UTR de los ARNm que codifican para Tc00.1047053504035.84, Tc00.1047053508737.194 y TcRBP19.

La amplificación por PCR de las UTRs se realizó utilizando 2 µL de la dilución del ADNc, dNTPs 0,1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, tampón de PCR 10X 2 µL (Invitrogen) y Oligo(dT)₂₀ como cebador reverso y uno de los oligos de la **TABLA 4.18.1** ambos en una concentración de 1 µM. El producto de amplificación fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% y los fragmentos del tamaño esperado fueron recortados del gel y purificados con columnas *QIAquick® Spin* (QIAGEN).

Las diferentes 3'UTRs amplificadas y purificadas fueron clonadas en el vector *pGem-T Easy* (Promega). La reacción de ligación fue llevada a cabo en un volumen de 10 µL conteniendo 5 µL de *2X Rapid Ligation Buffer*, 3 U de ADN ligasa de T4, 50 ng de vector *pGem-T Easy*, y el producto de PCR en una relación molar inserto:vector 3:1. Con estas construcciones se transformaron bacterias *E. coli* y se aisló el plásmido recombinante. Dicho plásmido fue secuenciado y usado como molde para las reacciones de transcripción *in vitro* para obtener ARN de interés para ensayos de EMSA.

4.18 CLONADO DE LA REGIÓN 5'UTR DEL ARNm *TCRBP19*

La región 5'UTR del ARNm que codifica para la proteína TcRBP19 fue identificada por RT-PCR utilizando oligonucleótidos cebadores específicos (**TABLA 4.19.1**) a partir de ADNc obtenido a partir de ARN total de amastigotas tal como se describió previamente.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>Miniexón</i>	5' - cgctattattgatacagtttctg -3'
<i>TcRBP19rev</i>	5' - cgatttgccaagaagtttgtg -3'

TABLA 4.19.1 Oligonucleótidos diseñados para amplificar la región 5'UTR del ARNm que codifica para la proteína TcRBP19.

4.19 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE TRANSFECCIÓN DE *T. CRUZI*

4.19.1 CLONADO DE LA REGIÓN 3'UTR DE *tcrbp19* CORRIENTE ABAJO DEL GEN REPORTERO *cat*

Para el estudio del efecto de las regiones 3'UTR de *tcrbp19* en la expresión génica, se construyó el vector *pTEX-CAT-3'UTR19* a partir del vector de expresión *pTEX* [349] conteniendo el gen para la enzima cloramfenicol acetil transferasa como gen reportero (*pTEX-CAT*). Para realizar la inserción de la región 3'UTR del gen *tcrbp19* corriente abajo del gen reportero *cat*, se diseñaron oligonucleótidos cebadores adecuados para amplificar dos largos diferentes de la 3'UTR del gen *tcrbp19* conteniendo sitios de restricción *Hind* III y *Xho* I (**TABLA 4.20.1.1**). Estos sitios, presentes también en el vector *pTEX-CAT*, permiten el clonado direccional de la región 3'UTR del gen *tcrbp19* corriente abajo del gen reportero.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>tc19-1REV_Xho</i>	5' -c ctcgag ctgcccgcacccaacatttcaccg-3'
<i>tc19-2REV_Xho</i>	5' -c ctcgag cactgtccttctcattccgtc-3'
<i>tc19-1FW_Hind</i>	5' -c aaagctt aaaggaaatgcggtgcctgc-3'
<i>tc19-2FW_Hind</i>	5' -c aaagctt aaatgaaatgcggtgcctgc-3'

TABLA 4.20.1.1 Oligonucleótidos diseñados para amplificar y clonar las regiones 3'UTR de *tcrbp19* en el vector *pTEX-CAT*. En celeste se resaltan los sitios de corte para las enzimas *Xho* I y *Hind* III.

El producto amplificado usando los cebadores indicados en la **TABLA 4.20.1.1**, fue clonado en el vector *pCR⁴-TOPO[®]* (Invitrogen). Dicho vector fue digerido con las enzimas *Hind* III y *Xho* I (Fermentas) y el fragmento obtenido fue ligado en el vector *pTEX-CAT* previamente linealizado con las enzimas *Hind* III y *Xho* I (Fermentas) utilizando una ADN ligasa de T4 (Fermentas) según las instrucciones del comerciante.

La mezcla de ligación se usó para transformar células químicamente competentes de *E. coli*. Luego se extrajo ADN plasmídico de varios clones y se estudió la presencia y orientación de las dos UTRs clonadas por digestión y PCR respectivamente. Los plásmidos positivos por estas metodologías fueron secuenciados.

4.19.2 CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN TcRBP19-TAP-TAG

El vector *pTEX-TcRBP19-TAP-tag* fue generado a partir del vector *pTEX-TAP-tag* cedido por el Dr. Esteban Serra (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Instituto de Biología Molecular y Celular, Dpto. Microbiología, Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Este vector permite la expresión de proteínas fusionadas a un *tandem* de dominios proteicos (proteína A y la proteína de unión a calmodulina CBP) que permiten su purificación junto a compañeros moleculares de acción. Para la construcción de dicho vector se diseñaron oligonucleótidos cebadores para amplificar la región codificante del gen *tcrbp19* conteniendo sitios de corte para su clonado en fase y corriente arriba del *casette* TAP-tag. Se amplificó el gen *tcrbp19* a partir de ADN genómico de *T. cruzi* usando los oligonucleótidos cebadores *Tc19BE_Fw* y *Tc19Hind_Rev* (TABLA 4.20.2.1). Se cortó con las enzimas de restricción *BamH* I y *Hind* III el vector *pTEX-TAP-tag* y el producto de PCR obtenido, lo que permitió el clonado direccional y en fase del gen *tcrbp19* en el vector, y se ligó con la enzima ADN ligasa de T4 (Fermentas) siguiendo las instrucciones del comerciante. Se transformaron bacterias *E. coli* XL1 Blue y se aisló el plásmido resultante. Dicho plásmido fue secuenciado y utilizado para transfectar epimastigotas de *T. cruzi*.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>Tc19BE_Fw</i>	5' -T ggatcc CCGGAATTCATGCATCAGCGAGGCATTCAGCG-3'
<i>Tc19Hind_Rev</i>	5' - aagctt GTGTGTCAATGTCTTTTC-3'

TABLA 4.20.2.1 Oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar y clonar la región codificante del gen *tcrbp19* en el vector *pTex-TAP-tag*. Se muestran en minúscula los sitios de corte de las enzimas *BamH* I y *Hind* III agregados en los cebadores.

4.20 CONDICIONES DE ELECTROPORACIÓN Y SELECCIÓN DE TRANSFECTANTES

Los plásmidos se purificaron a partir de cultivos bacterianos de 100 mL utilizando el *kit QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN) y se resuspendió el ADN plasmídico en el *tampón de electroporación HBS*. Por otro lado, epimastigotas en fase exponencial fueron lavados con PBS, centrifugados y resuspendidos en *tampón HBS* a una concentración final de 10^8 parásitos/mL.

Se mezclaron 400 μ L de parásitos (4×10^7) con 50 μ L de ADN plasmídico de concentración 2 μ g/ μ L y se dejó 10 min en hielo. Se dieron dos pulsos de 500 μ F a 450 V (electroporador Gene Pulser II BIO-RAD) y se volvió a poner en hielo 10 min más. Finalmente se pasó a 10 mL de medio LIT a 28°C. Se realizó un control negativo en el que se electroporaron parásitos sin agregar ADN plasmídico.

Luego de 48 h de la transfección, se comenzó con el proceso de selección de transfectantes. Se agregó 250 μ g/mL de G-418 al medio de cultivo y 48 h después se diluyó a la mitad con medio de cultivo y se aumentó la cantidad

de antibiótico G-418 a 500 µg/mL. Se incubó a 28°C. Después de 72 h se diluyó el cultivo al tercio manteniendo la cantidad de antibiótico en 500 µg/mL. El proceso de selección de la cepa se llevó a cabo mediante sucesivos repiques de cultivo cada 72 h manteniendo la presión del antibiótico a 250 µg/mL. La evolución de los cultivos se controló por microscopía óptica.

4.21 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO *CAT*

La expresión del gen reportero en los diferentes transfectantes fue analizada tanto a nivel de ARNm como de proteína.

4.21.1 CUANTIFICACIÓN DEL ARNm *cat*

Los niveles de ARNm *cat* fueron analizados en los diferentes transfectantes mediante qRT-PCR a partir de ARN total de epimastigotas y de amastigotas usando los oligonucleótidos cebadores *lpcat1* y *lpcat2* (TABLA 4.11.1). La cantidad de ARNm se calculó relativa al ARNm endógeno *gapdh* usando el método Delta Delta CT ($\Delta\Delta CT$) [357].

Para comparar entre diferentes poblaciones de transfectantes se normalizó la cantidad de ARNm *cat* con el número de copias de plásmido *pTEX-CAT*.

4.22 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE ARNm *tcrbp19* EN PARÁSITOS TRANSFECTANTES

Se comparó la expresión del ARNm *tcrbp19* en parásitos salvajes (Dm28c) y/o parásitos control (sobrexpresando el vector *pTEX* vacío) *versus* parásitos que sobre-expresan la proteína TcRBP19 (*pTEX-TcRBP19*). Se utilizaron 2×10^7 en cada caso. Para bloquear la transcripción en los parásitos, se agregó Actinomomicina D (SIGMA) en una concentración 10 µg/mL. Se extrajeron alícuotas a diferentes tiempos (0, 30, 60 y 120 min en un experimento y 0, 5, 10, 20, 30 y 60 min en otro experimento) y se extrajo el ARN usando el *kit RNeasy* (QIAGEN) o el reactivo TRIZOL (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del comerciante. Se dosificó el ARN y analizó la cantidad de ARNm *tcrbp19* mediante qRT-PCR.

Para la cuantificación por qRT-PCR, los ARNs fueron retrotranscritos usando el *kit Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) usando 500 ng del cebador oligo(dT)₂₀. Los ADNc resultantes fueron diluidos 1/10. Además de oligonucleótidos cebadores específicos para *tcrbp19* (TABLA 4.11.1) y su 3'UTR (ver 4.16), se usaron cebadores para cuantificar otros ARNm blancos de la proteína TcRBP19 como ser el ARNm del gen: Tc00.1047053508737.194, Tc00.1047053509453.30, Tc00.1047053506469.139 y Tc00.1047053504035.84)

(TABLA 4.11.1). La cuantificación de los ARNm de interés se realizó normalizando contra el transcrito *gapdh*. La cantidad de ARNm relativa a *gapdh* fue cuantificada utilizando el método del Delta Delta CT ($\Delta\Delta CT$) [357].

4.23 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

4.23.1 PURIFICACIÓN DEL ANTISUERO ANTI-TcRBP19

Para la purificación del anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 previamente realizado en conejo [340,342] se utilizaron columnas *DEAE Affi-Gel Blue* gel (BIO-RAD). *DEAE Affi-Gel Blue* gel es una matriz de cromatografía de afinidad e intercambio iónico preparada mediante el acoplado de grupos dietilaminoetil y *Cibacron® blue F3GA* a un gel de agarosa *Bio-Gel® A-5*, lo cual hace posible obtener IgG altamente purificadas a partir de suero, mediante optimización de la fuerza iónica y el pH del *Tampón de aplicación*. El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera, se dializó el suero contra tampón de aplicación, luego se lavó la matriz (10 mL de gel) con 5 volúmenes de ácido acético 0,1 M pH 3, NaCl 1,4 M y 40% isopropanol y con 10 volúmenes de tampón de aplicación. Se procedió entonces al armado de la columna y se lavó con 3 volúmenes de tampón de aplicación, se aplicó la muestra (3 mL de suero), se lavó con 3 volúmenes de tampón de aplicación y se colectaron 5 fracciones de 5 mL cada una.

Luego de este procedimiento, se purificó la IgG anti-TcRBP19 específicamente, usando el soporte de afinidad *Affi-Gel® 10* (BIO-RAD), que es capaz de acoplar con alta eficiencia ligandos que posean grupos aminos. Se acopló 1 mg de proteína GST-TcRBP19 a 200 μ L de *Affi-Gel® 10* (BIO-RAD) activado, siguiendo las instrucciones del comerciante. Se bloquearon los sitios libres con 100 μ L de glicinetiléster 1 M durante 1 h a 4°C. Se lavó el gel con tampón Hepes 0,1 M y $CaCl_2$ 10 mM y se incubó con 5 mL de suero purificado por *DEAE Affi-Gel Blue*. Finalmente se lavó el gel con PBS y se eluyó el anticuerpo anti-TcRBP19 con glicina 0,2 M pH 2,5, neutralizándose inmediatamente con Tris pH 11 hasta llegar a un pH final de 7.

Para una purificación más exhaustiva, se procedió a purificar el anticuerpo por afinidad usando la proteína TcRBP19, a la cual se le había removido la etiqueta GST mediante digestión con trombina, unida a una membrana de nitrocelulosa. Para ello, la proteína recombinante sin etiqueta fue sometida a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15%, se transfirió a una membrana de *nylon Hybond ECL* (GE Healthcare) y se recortó el fragmento de membrana conteniendo la proteína que se visualizó por tinción con Ponceau S. Se bloqueó 30 min con leche descremada 5% BSA en PBS-Tween 0,1%. Se lavó con PBS-Tween 0,1% y se incubó con el suero anti-TcRBP19 durante toda la noche a 4°C. Luego de lavada la fracción no unida a la proteína, se eluyó el anticuerpo unido incubando 5 min con glicina pH 2,7 con agitación fuerte. La solución fue neutralizada agregando un décimo

de volumen de Tris 2 M pH 8 para prevenir la desnaturalización del anticuerpo. Finalmente el anticuerpo purificado fue dializado en PBS 1X durante toda la noche a 4°C.

Alternativamente, el suero policlonal purificado fue depletado de anticuerpos que reconozcan epítopes de la proteína GST y de proteínas presentes en el extracto total de *E. coli*. Para ello se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% donde se cargó en un carril, 1 µg de proteína recombinante GST y en otro carril, un extracto total de *E. coli* (aproximadamente 15 µg). Se transfirieron estas proteínas a una membrana de *nylon Hybond ECL* y se incubaron en presencia del anticuerpo purificado durante toda la noche con agitación. Luego, se almacenó el sobrenadante, que contiene el anticuerpo anti-TcRBP19 depletado de anticuerpos que reconocen proteínas de *E. coli* así como epítopes GST.

4.23.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para los ensayos de localización celular, los parásitos (epimastigotas, metacíclicos y amastigotas) transfectantes que sobreexpresan TcRBP19 se lavaron con PBS a 4°C, se resuspendieron a una concentración final de 2×10^6 parásitos/mL en paraformaldehído al 4%. Se depositaron 20 µL de la suspensión de parásitos en portaobjetos cubiertos de poli-lisina, dejándose secar completamente a temperatura ambiente. En el caso de amastigotas celulares, las monocapas de células VERO o HeLa infectadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% a las 72 h *post*-infección en la misma cámara donde fueron crecidas (Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Thermo Scientific) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para su fijación, los portaobjetos con los parásitos fueron permeabilizados incubando 5 min con etanol absoluto a -20°C y luego 8 min con acetona a -20°C. Se bloqueó con PBS/BSA al 1% durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las láminas con el anticuerpo primario anti-TcRBP19 purificado y diluido 1/50 en PBS/BSA 0.1% durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS/BSA 0.1% y se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo Alexa fluor 488 (Molecular Probes) diluido 1/1000 en PBS/BSA 0.1% durante 1 h en cámara húmeda.

El ADN total de los parásitos fue revelado mediante incubación de los mismos durante 20 min con Ioduro de Propidio 1 µg/mL ó con DAPI 10 µg/mL y posterior lavado en PBS. Finalmente los portaobjetos fueron montados con 1 parte de Tris-Cl pH 8,8 y 8 partes de glicerol. Las imágenes fueron resueltas usando un microscopio Confocal FV300 Olympus usando un lente 100X (aceite, N.A. 1.35) con excitación laser Argon (488nm) y HeNe (546nm).

4.24 TÉCNICAS DE ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

4.24.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON GST-TcRBP19 UNIDA A AFFI GEL-10™

Con el objetivo de identificar proteínas de *T. cruzi* que interaccionen con TcRBP19 se acopló la proteína recombinante de fusión con GST a un soporte de *Affi Gel-10* (BIO-RAD). Todo el procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 4°C. Se usó 100 µL de resina y se realizaron 3 lavados con *tampón de acoplamiento* frío. Se acopló 1 mg de proteína recombinante, previamente dializada contra *tampón de acoplamiento* y se dejó 4 h a 4°C con movimiento suave.

Se bloqueó con 50 µL de etiléster de glicina y se dejó 1 h incubando con agitación. Finalmente se lavó con exceso de *tampón de acoplamiento* frío. Se empaquetó una columna con la resina y se lavó con *tampón de lisis de parásitos*.

Se pasó extracto total correspondiente a 2×10^9 parásitos. Se lavó con 10 volúmenes de *tampón de lisis* y se realizaron 3 eluciones sucesivas con *tampón de lisis* y NaCl. Primero, se eluyó la fracción E1 con *tampón de lisis* más NaCl 500 mM. Luego la fracción E2 con *tampón de lisis* más NaCl 1000 mM y finalmente la fracción E3 se obtuvo con *tampón de lisis* más NaCl 2000 mM.

4.24.2 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

La inmunocaptura se realizó acoplando el anticuerpo purificado anti-TcRBP19 a una columna *Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow* (Amersham-Bioscience). Todo el procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 4°C. La resina se preparó lavando con *tampón ipp* y se colocó 200 µL en una columna de 0,5 cm de diámetro (*Econo-Columns*, BIO-RAD). Luego de empaquetada, se conectó a una bomba (Pharmacia LKB.Pump-P1) a presión constante correspondiente a un flujo de alrededor de 0,05 mL/min. Se agregó 200 µL de antisuero anti-TcRBP19 (2 mg/mL), ó antisuero anti-Tc38 como control, y se incubó 1 hora. Luego se lavó con 10 volúmenes de *tampón ipp* y se adicionó 1 volumen de extracto de proteínas totales de epimastigotas de *T. cruzi* (3 mg) sobrexpresando TcRBP19 y se incubó durante toda la noche. Se lavó la columna con 2 volúmenes de *tampón ipp*. Finalmente se eluyó en *tampón ipp* conteniendo concentraciones crecientes de KCl: 300 mM, 500 mM y 1 M.

Este ensayo de inmunocaptura también se realizó en *batch*. En este caso las incubaciones y lavados se realizaron con movimiento suave para evitar que decante la resina y se utilizaron centrifugaciones breves (2 min) a velocidades bajas (500g).

En ambos casos los extractos proteicos de *T. cruzi* fueron previamente sometidos a un “pre-aclarado” para disminuir las interacciones inespecíficas entre las proteínas del parásito y las IgGs de conejo o la misma proteína A. Para esto se incubaron durante 15 min 50 μ L de IgGs de conejo no inmunizado con TcRBP19, con 50 μ L de Proteína A Sefarosa. Esta mezcla se adicionó a los extractos de *T. cruzi* y se incubó durante 30 min con movimiento suave. Por último se centrifugó y se utilizó el sobrenadante para someter a la cromatografía de afinidad con la proteína A-Sefarosa unida al anticuerpo anti-TcRBP19.

En forma alternativa se realizó inmunoprecipitación usando el kit *Dynabeads® Protein A for Immunoprecipitation* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del comerciante. Se acopló en este caso 100 μ L de antisuero anti-TcRBP19 (2 mg/mL), o antisuero preinmune como control, a 50 μ L de *Dynabeads*. Se incubó luego el extracto total de 1×10^9 parásitos sobreexpresando TcRBP19 y de 1×10^9 parásitos control transfectados con el vector *pTEX* vacío, con el complejo *Dynabeads*-anticuerpo durante toda la noche a 4°C. Luego de sucesivos lavados, se eluyeron los complejos formados con glicina 50 mM pH 2,8. Las proteínas fueron luego precipitadas con TCA y resuspendidas en urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% sometidas a geles 2D en el Servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo (UByPA del IPMont). Para ello se suplementaron 127 μ L de cada muestra con *tampón IPG 3-10* 0,5% (GE Healthcare) conteniendo DTT 17 mM, azul de bromofenol 0,002% y se cargaron en *IPG Strips 3-10* de 7 cm por rehidratación pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente usando las siguientes condiciones de isoelectroenfoque: constante a 300 V durante 30 min; en gradiente a 1000 V durante 30 min; en gradiente a 5000 V durante 80 min; constante a 5000 V hasta 1000 V/h alcanzando los siguientes parámetros: 3702 V, 50 μ A, 2 h 45 min, 5475 V.h. A continuación se equilibraron las *IPG strips* en *Tampón de equilibración* adicionado con DTT 10 mg/mL durante 15 min a temperatura ambiente con agitación y luego en *Tampón de equilibración* suplementado con iodoacetamida 25 mg/mL, durante 15 min más, a temperatura ambiente con agitación. Para la segunda dimensión, se realizó un gel SDS-PAGE al 12,5 % y se corrió en las siguientes condiciones: 10 mA/gel durante 30 min y luego 20 mA/gel, hasta que el frente de corrida alcanza el borde del gel. Los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal tal como se describe en 4.13.4.

Los *spots* diferenciales presentes en el experimento con extracto total de parásitos sobreexpresando TcRBP19 y no presentes en parásitos control *pTEX* o en el experimento con preinmune fueron recortadas y sometidas a espectrometría de masas MALDI-TOF en el servicio UByPA del IPMont. Para la identificación de bandas diferenciales se utilizó el *software Melanie versión 6.02.0* (GE Healthcare).

4.24.3 GST-PULL DOWN DE PROTEÍNAS

Se preparó la proteína recombinante GST-TcRBP19 a partir de cultivos de *E. coli* y se acopló a una columna de glutatión Sefarosa tal como se comentó anteriormente (ver 4.13.1). Se realizó el mismo procedimiento como control preparando proteína GST a partir de cultivos de *E. coli* y se acopló, de igual forma que GST-TcRBP19, en una columna de glutatión Sefarosa. Se incubó en cada caso, la proteína recombinante (en columna o alternativamente en *batch*) con el extracto de proteínas solubles correspondientes a 1×10^9 parásitos epimastigotas dejándose durante toda la noche con agitación suave a 4°C. Se realizaron luego 3 lavados con 10 volúmenes de PBS-Tritón 0,1%. Finalmente las proteínas capturadas fueron eluidas mediante incubación a 95°C y resuspensión en *Tampón de carga para SDS PAGE 2X*. Las proteínas fueron luego precipitadas con TCA (ver 4.25.5) y analizadas mediante espectrometría de masas para su identificación (FIGURA 4.25.3.1).

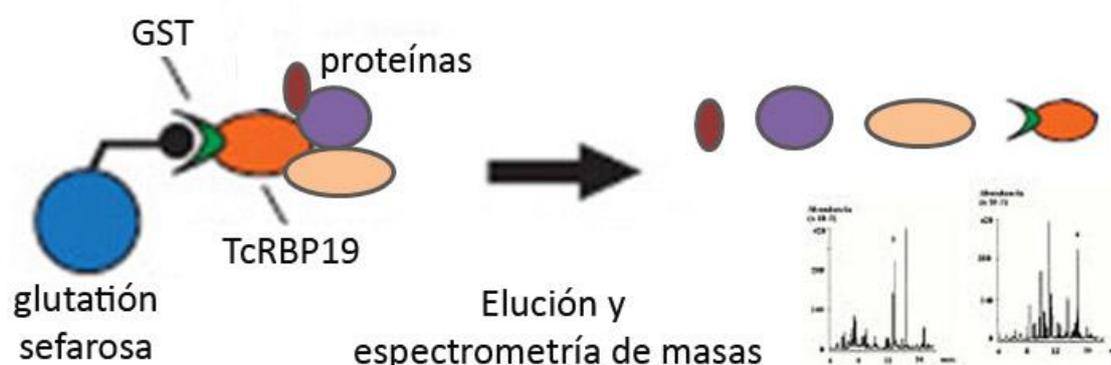


FIGURA 4.25.3.1 Diseño experimental de los ensayos de GST-pull down para captura de proteínas que interaccionan con la proteína GST-TcRBP19.

4.24.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A TcRBP19 EN TANDEM DE AFINIDAD

Para la purificación de proteínas asociadas a TcRBP19 fusionada al tag Proteína A-CBP se partió de parásitos transfectados con el vector *pTEX-TcRBP19-TAP-tag* (ver 4.20.2) y con el vector *pTEX-TAP-tag* como control. Se centrifugaron 5×10^9 parásitos transfectados durante 10 min a 1.000g y se resuspendió en 10 mL de *tampón de lisis para TAP-tag*. Se rompieron los parásitos pasando la suspensión 15 veces por jeringa 21G y se centrifugó a 10.000g durante 15 min y luego a 20.000g durante 30 min más, todo a 4°C. Se agregó, al extracto proteico resultante, NaCl en concentración final 150 mM.

En paralelo se lavó la resina de IgG Sefarosa (GE Healthcare Lifesciences) con *tampón IPP150* y se incubó con el extracto total de parásitos durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Se lavó la resina 3 veces con 10 mL de *tampón IPP150* y se incubó con 1 mL de *tampón proteasa TEV* conteniendo 100 U de proteasa TEV (Invitrogen)

dejándose a 16°C durante 2 h con agitación suave. Las proteínas de interacción con TcRBP19 fueron eluidas por gravedad luego del corte con la proteasa TEV.

Para la segunda cromatografía de afinidad, el complejo formado por la proteína TcRBP19 fusionada al CBP junto con las proteínas interactuantes eluidas de la primera columna de afinidad fueron incubados en presencia de una resina de calmodulín Sefarosa (GE Healthcare Lifesciences) previamente equilibrada con *tampón IPP150*. La incubación se llevó a cabo por 4 h a 4°C y, luego de 3 lavados con *tampón IPP150*, las proteínas retenidas fueron eluidas en presencia de EGTA 10 mM.

Finalmente, el complejo proteico resultante fue precipitado con TCA (ver 4.25.5) y las proteínas interactuantes fueron analizadas mediante espectrometría de masas para su identificación (**FIGURA 4.25.4.1**).

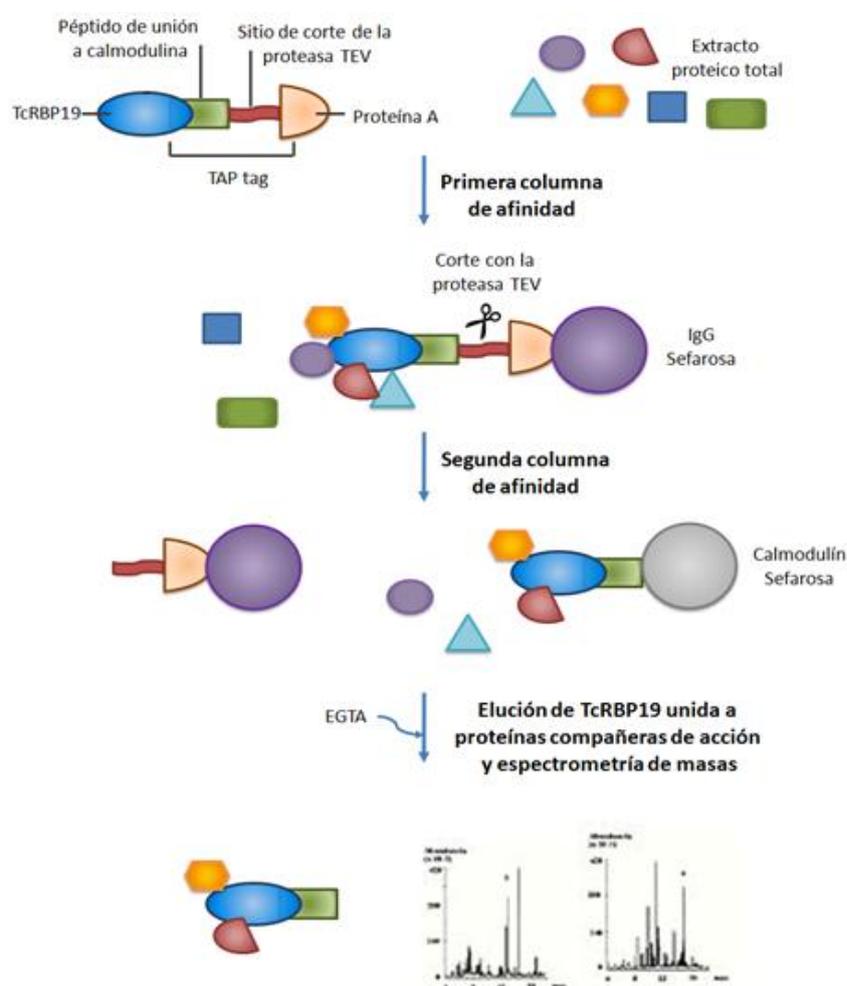


FIGURA 4.25.4.1 Diseño experimental de las cromatografías de afinidad en tandem: TAP-tag. La proteína TcRBP19 fusionada al tag proteína A-CBP es retenida en una columna de IgG Sefarosa junto con las proteínas interactuantes. Mediante corte con la proteasa TEV, dicho complejo es liberado. Una segunda columna de afinidad de calmodulín Sefarosa permite aislar el complejo formado por TcRBP19, fusionada ahora al CBP, junto con las proteínas interactuantes. Finalmente, mediante competencia con EGTA, y el consiguiente desplazamiento

del complejo antemencionado, se eluyen las proteínas de interacción con TcRBP19 las cuales son separadas en un gel SDS-PAGE e identificadas por espectrometría de masas.

4.24.5 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA Y ACETONA

Se precipitaron las proteínas de las diferentes fracciones con TCA y acetona. Se agregó a cada muestra 1 volumen de TCA 20% en acetona (w/v) y se dejó toda la noche a 4°C. Se centrifugó 15 min a 4°C a 15.000g y se resuspendió el precipitado en 100 µL de acetona fría dejándose 10 min a -70°C (o alternativamente toda la noche a -20°C). Se centrifugó 15 min a 4°C a 15.000g y se secó el *pellet* invirtiendo el tubo cuidadosamente sobre papel secante para eliminar los restos de acetona. Finalmente se resuspendieron las proteínas precipitadas en *tampón de carga SDS PAGE 2X*.

4.25 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las fracciones precipitadas con TCA fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y teñidos con Nitrato de Plata o Coomassie para masas. Luego de la tinción las bandas fueron identificadas mediante tratamiento en gel con tripsina durante toda la noche a 37°C.

Los péptidos se extrajeron de los geles con acetonitrilo al 60% en TFA 0,2% y se concentraron mediante secado al vacío. Las muestras fueron desaladas usando micro-columnas de fase reversa C18 (OMIX Pippete tips, Varian). La elución de péptidos desde las micro-columnas fue realizada directamente en la placa del espectrómetro de masas con 3 µL de solución de matriz (ácido α -cyano-4-hydroxycinnamic en 60% de solución acuosa de acetonitrilo conteniendo TFA al 0,2%). Los espectros de masas de las mezclas de digestión fueron adquiridos en un 4800 MALDI-TOF/TOF Instrument (Applied Biosystems) en modo reflector, y calibrados externamente usando una mezcla de péptidos estándares (Applied Biosystems). Se realizaron análisis de MS/MS de algunos péptidos seleccionados. El procedimiento de recorte de las bandas hasta su identificación fue realizado por personal del servicio UByPA del IPMont.

La búsqueda en las bases de datos MS/MS fue realizada contra las bases del NCBIInr usando el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: se permitió la pérdida de un sitio de corte de la tripsina, se usaron como modificaciones variables la oxidación de las Metioninas y la carbamidometilación de las Cisteínas. Se usó en las búsquedas una tolerancia de masas monoisotópicas de $\pm 0,05$ Da y en la fragmentación una tolerancia de $\pm 0,8$ Da para un instrumento MALDI-TOF-TOF.

4.26 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE INTERACCIÓN ARN-PROTEÍNA

4.26.1 INMUNOPRECIPITACIÓN DE ARN

Para los ensayos de inmunoprecipitación de ARN se prepararon extractos proteicos solubles a partir de 1×10^8 parásitos sobrepresando TcRBP19 usando un *tampón de lisis de parásitos* suplementado con 1.000 U de *RNase OUT* (Invitrogen). Luego de centrifugar los extractos, los mismos fueron sometidos a *crosslinking UV* durante 30 min a 254 nm a 3 cm de la fuente de luz. La irradiación de los complejos ácidos nucleicos-proteínas con luz UV, favorecen la formación de enlaces covalentes entre los ácidos nucleicos y las proteínas que estén en contacto. Luego del *crosslinking*, se incubaron los complejos ribonucleoproteicos con 20 μ L de anticuerpo anti-TcRBP19 durante toda la noche. Se realizó un control en idénticas condiciones pero agregando *tampón de lisis de parásitos* sin anticuerpo. Se adicionaron 150 μ L de proteína A Sefarosa (Amersham) equilibrada en *tampón de unión para EMSA* y se dejó incubando con agitación en hielo durante 2 horas. Se lavaron 3 veces los complejos ribonucleoproteína-Anticuerpo-Proteína A con 200 μ L de *tampón de unión para EMSA*. Finalmente la solución con los complejos se llevó a ebullición y se trató con ADNasa I usando el *kit DNA free* (AMBION) según las condiciones recomendadas por el comerciante.

A continuación, se procedió a realizar la primera hebra del ADNc en el tubo de la inmunoprecipitación y en el control sin anticuerpo. La reacción de RT-PCR se realizó usando 100 pmoles de cebador Oligo(dT)₍₁₈₎ para la primera hebra de ADNc y para el PCR se usó cebador Oligo(dT) y un oligo específico *TcRBP19fw (LP1)* (TABLA 4.18.1).

4.26.2 GST-PULL DOWN DE ARN

Se utilizaron cromatografías de afinidad en columnas de glutatión Sefarosa para purificar los ARNs que interaccionan con TcRBP19 a partir de ARN total preparado a partir de epimastigotas (1×10^8) y de amastigotas (1×10^9) en fase exponencial de crecimiento.

Preparación de la columna glutatión Sefarosa-GST-TcRBP19: Se equilibraron 200 μ L de resina *Glutathion Sepharose 4B* (GE Healthcare) con PBS 1X y se incubó con la fracción soluble bacteriana obtenida conteniendo proteína recombinante GST-TcRBP19 o solo GST como control negativo, durante toda la noche a 4°C con agitación. Se realizaron cuatro lavados con 10 mL de PBS, cada uno, y se bloqueó con leche descremada 5% en PBS durante 30 min a 4°C. Se lavó dos veces con 10 mL de PBS 1X, y dos veces más con 1 mL de PBS 1X. Finalmente se lavó dos veces con 1 mL de *tampón de unión* suplementado con 200 U/mL de inhibidor de ARNasa (*RNase OUT*, Invitrogen).

GST-pull down: Se incubó la resina glutatión Sefarosa-GST-TcRBP19 equilibrada con *tampón de unión* con 50-90 μg de ARN total durante 1,5 h a 4°C. Se centrifugó 2 min a 500g y se guardó el ARN no capturado en el sobrenadante. Se lavó tres veces con *tampón de unión* y se purificó el ARN retenido en la columna usando el *kit* de extracción de ARN *RNeasy* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los ARNs capturados y los no capturados fueron amplificados por separado usando *Message AmpTM II aRNA kit* (AMBION), siguiendo el protocolo recomendado por el comerciante. Luego de la amplificación se midió la DO a 260 nm para estimar la concentración de ARN y las dos poblaciones de cARNs resultantes fueron marcadas por retrotranscripción diferencialmente mediante incorporación de dCTP marcado con Cy3 y Cy5 para hibridar competitivamente un microarreglo de ADN de *T. cruzi* (ver 4.28.1). Se realizaron controles en idénticas condiciones con la proteína GST acoplada a la columna para descartar interacciones inespecíficas en el análisis.

Estos ensayos fueron realizados por duplicado en el caso del experimento con epimastigotas y en triplicado para el caso del ensayo con ARN de amastigotas. La amplificación de los ARNs y la hibridación en el microarreglo de ADN también se realizó 2 y 3 veces en idénticas condiciones para epimastigotas y amastigotas respectivamente. Para cada hibridación se realizó su correspondiente ensayo alternando el fluoróforo usado para el marcado de cada especie de ARN (ver 4.28.2).

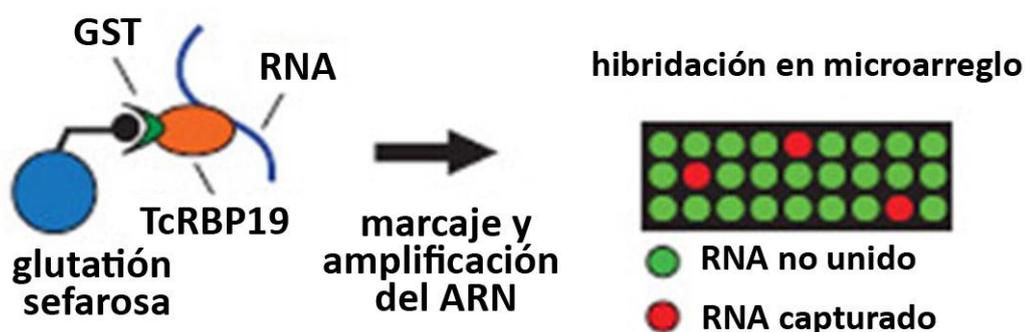


FIGURA 4.27.2.1 Diseño experimental del ensayo de GST-pull down para captura de ARN blancos de la proteína GST-TcRBP19.

4.27 MICROARREGLOS DE ADN

4.27.1 PREPARACIÓN DE ARN PARA HIBRIDACIÓN EN MICROARREGLOS DE ADN.

El ARN total (ensayo de GST-pull down) y polisomal (ensayo de análisis del transcriptoma del transfectante) fue extraído a partir de 1×10^8 parásitos en fase exponencial para el caso de epimastigotas y 1×10^9 parásitos en el caso de amastigotas. Para las extracciones se usó el *RNeasy mini kit* (QIAGEN). El ARN purificado fue dosificado por medidas espectrofotométricas a 260 nm.

Este ARN fue tratado con ADNasa I y amplificado mediante el uso del *kit AminoAllyl MessageAMP™ aRNA* (AMBION). El ARN amplificado (cARN) fue copiado a ADNc por transcripción reversa utilizando el *kit ImProm-II™ Reverse Transcriptase* (Promega) utilizando hexámeros al azar en presencia de los fluoróforos Cy3-dCTP y Cy5-dCTP (GE Healthcare). Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se partió de 2 µg de cARN a los cuales se agregó 2 µL de hexámeros al azar (1.000 pmol/µL) y se incubó a 70°C por 10 min. A continuación se procedió a realizar la transcripción reversa agregando: tampón ImProm 1X (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,5 mM, *RNase OUT* 2 U, Enzima RT Improm II 2 µL, Invitrogen). Se incubó a 42°C por 2 horas. Se agregaron luego 15 µL de NaOH 0,1 N, se incubó a 70°C 10 min y se agregaron 15 µL HCl 0,1 N. Finalmente se purificó la primera hebra sintetizada usando columnas *Microcon YM 30* (Millipore) y se procedió a realizar la síntesis de la segunda hebra marcada de ADNc usando el *kit BioPrime DNA Labelling System* (Invitrogen). Se agregó la solución de *random primers* 1X (0,06 mM dCTP y 0,12 mM demás dNTPs), 0,8 U de enzima *Klenow* y 2 nmol de Cy3-dCTP y Cy5-dCTP en oscuridad. Se incubó la reacción a 37°C por 2 horas. Los ADNc correspondientes a los transfectantes que sobreexpresan TcRBP19 y los ADNc del control se marcaron con Cy3-dCTP y Cy5-dCTP respectivamente y viceversa, proceso conocido como *dye swap*. El *dye swap* es de gran utilidad para eliminar sesgos, ya que la mayor parte de experimentos muestran diferencias en las intensidades de marcado para cada uno de estos fluoróforos. Las reacciones se incubaron por 2 h a 37°C y luego se purificaron por *Microcon YM30* (Millipore).

4.27.2 HIBRIDACIÓN EN MICROARREGLOS DE ADN

Para la hibridación se agregó al material marcado (20 µL) 100 µL de solución de hibridación de microarreglos y se incubó a 94°C por 5 min. Se realizaron en todos los casos hibridaciones competitivas: i) en los ensayos de análisis del transcriptoma del transfectante, se hibridó el ARN polisomal correspondiente a los transfectantes que sobreexpresaban TcRBP19 marcado con un fluoróforo junto con el ARN polisomal correspondiente a parásitos transfectados con el vector vacío (*pTEX*) marcado con otro fluoróforo diferente (**FIGURA 4.28.2.1**); ii) en los ensayos de *GST-pull down* de ARN, se hibridó el ARN total retenido en la columna glutatión Sefarosa unida a GST-TcRBP19 marcado con un fluoróforo, *versus* el ARN total eluído, no retenido por GST-TcRBP19 marcado con otro fluoróforo (**FIGURA 4.28.2.2**). Las hibridaciones competitivas fueron realizadas sobre láminas acondicionadas en una estación de hibridación automática *GeneTac* (Genomic Solutions) a 42°C por 16 horas. Luego de la hibridación, se lavó con solución SSC 0,5X y SDS 0,01% y después con solución de SSC 0,06X. Se retiraron las láminas de la estación de hibridación y se secaron centrifugando a 20°C a 1.000g por 5 min. Finalmente se leyó el patrón de fluorescencia de las láminas en un escaner *Affymetrix 428™ Array Scanner*. La intensidad de hibridación en cada *spot* en la lámina fue percibida a través de la fluorescencia que Cy3 y Cy5 emiten después de su excitación con la longitud de onda adecuada: Cy3 (verde) = 532 nm y Cy5 (rojo) = 635 nm. Las imágenes fueron analizadas con el *software Spot*. Se usó el *Limma package* para la corrección del ruido de fondo mediante

el método *normexp*, para normalizar las diferencias *intra-slides* se usó el método *printtiploess* mientras que para la normalización *inter-slides* se usó el método *quantile*. El análisis de las imágenes fue realizado por C. Probst del Instituto Carlos Chagas, Curitiba, Brasil.

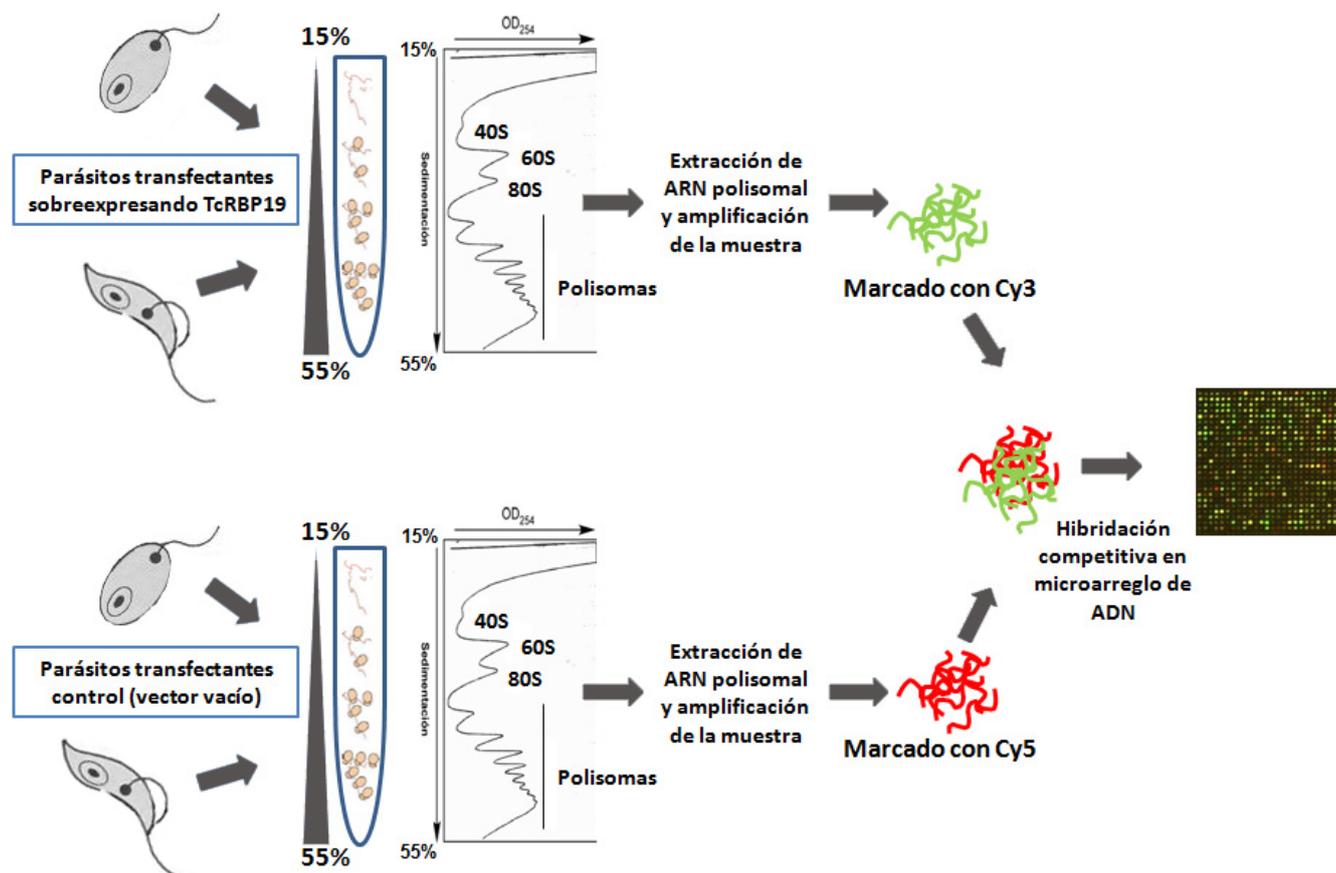


FIGURA 4.28.2.1 Estrategia de análisis del efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 en el estado estacionario de los RNAm. El ensayo fue realizado tanto en epimastigotas como en amastigotas transfectantes sobreexpresando la proteína de interés. Los extractos celulares de parásitos sobreexpresando TcRBP19 (amastigotas y epimastigotas) y de parásitos control (transfectados con el vector *pTEX* vacío) se fraccionaron en un gradiente de densidad de sacarosa y se monitoreó la absorbancia a 254 nm. Se aisló el RNA asociado a polisomas. Este RNA fue amplificado y marcado diferencialmente con los fluoróforos Cy3 para el caso de los RNAs de parásitos que sobreexpresaban TcRBP19 y con Cy5 para el caso de los RNAs de los transfectantes control (y viceversa). Estos RNAs polisomales marcados fueron mezclados para hibridar competitivamente un microarreglo de ADN en *T. cruzi* con el objetivo de identificar aquellos genes cuya abundancia fuese alterada como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19.

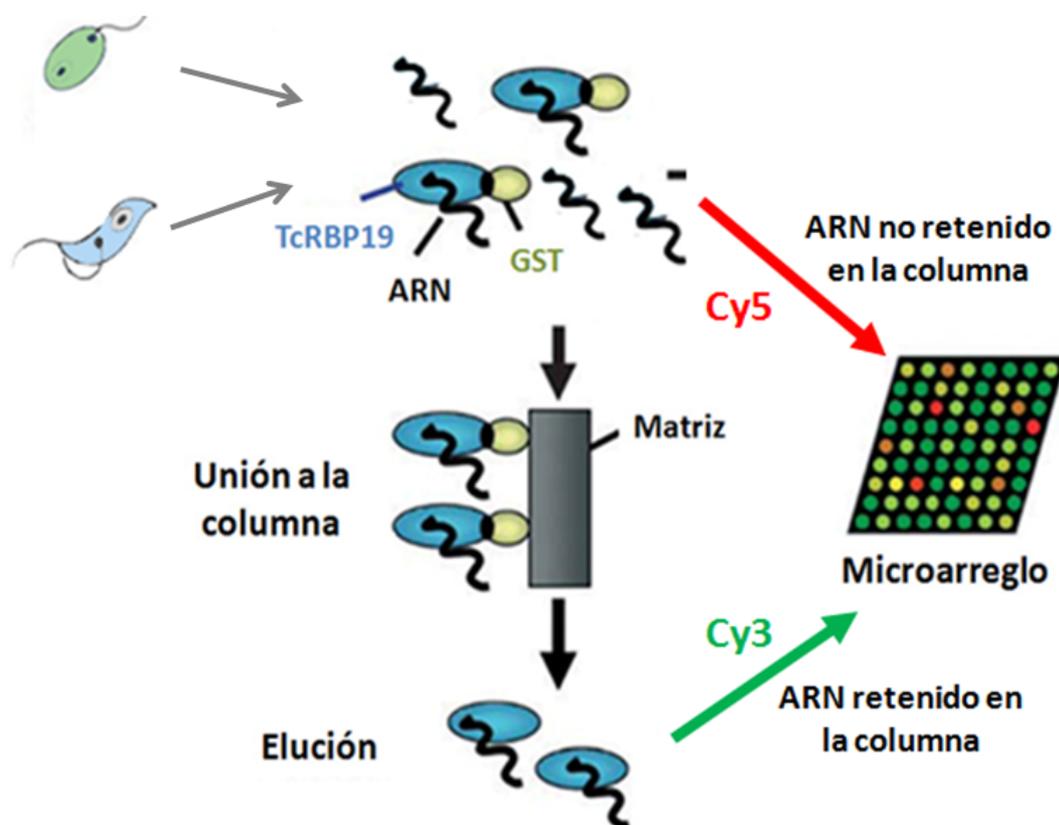


FIGURA 4.28.2.2 Identificación de los ARNs asociados a TcRBP19. En esta aproximación ribonómica, las proteínas de unión al ARN son incubadas con ARN total, ya sea de epimastigotas o amastigotas salvajes, y los complejos ribonucleoproteicos son purificados por afinidad. Los ARNs asociados y no asociados a las proteínas de unión al ARN son aislados y retrotranscritos en presencia de nucleótidos fluorescentes para ser luego hibridados competitivamente en un microarreglo de ADN. La relación de los fluoróforos Cy3/Cy5 para cada locus refleja su enriquecimiento por interacción con la proteína de interés. Tomado y modificado de Halbeisen y cols. [245].

Las láminas para microarreglos fueron proporcionados por el personal del Instituto Carlos Chagas. A lo largo de este trabajo se usaron láminas de versiones diferentes conteniendo entre 6000 y 6200 sondas obtenidas por PCR. Por otra parte se usaron microarreglos de oligonucleótidos de 70mer conteniendo regiones codificantes identificadas en el genoma (versión 3), las cuales fueron agrupadas con el programa BLASTClust usando parámetros de 40% de cobertura y 75% de identidad. Para el diseño de las sondas, se usó el *software ArrayOligoSelector* (v. 3.8.1) tomando como parámetro un contenido de G+C de 50%. Se obtuvieron 10.359 sondas para la región codificante de *T. cruzi*, 393 sondas correspondientes a genes de un grupo externo (*Cryptosporidium hominis*) y 64 spots conteniendo solo solución de *Spotting* (SSC 3x), sumando un total de 10.816 sondas. Estas sondas fueron depositadas en láminas cubiertas de poli-L-lisina y sometidas a *crosslinking* con luz UV 600 mJ.

Tanto los ARNs aumentados y disminuídos en el ensayo del análisis del transcriptoma del transfectante, como los ARN unidos a TcRBP19 en los ensayos de GST-*pull down* fueron identificados usando el algoritmo de análisis de

significancia de microarreglos (SAM) [358]. Como criterio para distinguir entre ARNs blanco se usó un FDR (*false discovery rate*) de 1%. Los análisis del escaneado de los microarreglo fueron realizados por Probst del Instituto Carlos Chagas.

4.28 ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE ARN (REMSA)

Se analizaron interacciones de TcRBP19 recombinante y nativa con ribosondas sintéticas y con ARN producto de transcripción *in vitro* (ver 4. 16).

Para el caso de las ribosondas sintéticas ricas en U (TABLA 4.29.1) el análisis de electroforesis en gel de retardo de las interacciones ARN-proteína fue realizado según métodos estándar [359]. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 20 μ L con *tampón de unión para EMSA*. Como competidor inespecífico se utilizó espermidina 100 mM. En cada reacción se utilizó 0,4 ng de oligorribonucleótido marcado (10-20.000 cpm) y 1 μ g de la proteína recombinante GST-TcRBP19. Los competidores específicos (sonda fría sin marcar) fueron adicionados en un exceso molar de 10 y 100 veces a temperatura ambiente durante 10 min, antes de la adición de sonda marcada. Las reacciones fueron incubadas 20 min a temperatura ambiente y cargadas en geles nativos al 6% acrilamida:bisacrilamida (30:0,36) en TBE 1X con 10% glicerol . Los geles fueron pre-corridos durante 30 min a 200 V a 4°C y luego con las muestras durante 3-4 h a 250 V y 4°C. Luego fueron secados y se analizaron por exposición a filmes de rayos X usando pantallas amplificadoras a -80°C o mediante la utilización de *Phosphorimager* (Fujifilm BAS-1800 II).

Sonda	Secuencia
ARE	5' - AUUUUUUUUUUUUUUUUA -3'
CU	5' - CUUUCUUUCUUUCUUUC -3'
GU	5' - GUUUGUUUGUUUGUUUG -3'
U-26mer	5' - UAAUAAAAAAAAUCGUUAUAAAAAAAAUG -3'
NRE	5' - AUUAAUUUGUUGUCGAAAAUUGUACAUAGCC -3'

TABLA 4.29.1 Ribonucleótidos sintéticos ricos en U usados como sonda en ensayos de REMSA.

Los ensayos de REMSA con sondas obtenidas a partir de la transcripción *in vitro* se realizaron en base al trabajo de Thomson y cols. [360]. Las reacciones se realizaron en un volumen de 20 μ L usando *tampón de unión* para EMSA. Como competidor inespecífico se utilizó espermidina 100 mM. Se utilizaron 40.000 cpm de los ARNs marcados y 1 μ g de la proteína recombinante. Las reacciones fueron incubadas 30 min a temperatura ambiente. Luego se incubaron 10 min con 0,5 U de ARNasa T1 (AMBION) y por último con 10 μ g de heparina por 10 min

más. Los complejos fueron cargados en minigeles de 1,5 mm al 6% acrilamida:bisacrilamida (36:1) conteniendo 10% glicerol en TBE 1X. Los geles fueron pre-corrídos durante 30 min a 200 V a 4°C y luego con las muestras durante 20 min a 200 V y 4°C. Fueron secados y fijados en 10% de isopropanol y 7% de ácido acético [360]. Se analizaron por exposición a filmes de rayos X usando pantallas amplificadoras a -80°C o mediante la utilización de Phosphorimager (Fujifilm BAS-1800 II).

Para los ensayos de super-retardo las reacciones se prepararon según lo descrito para los ensayos de REMSA y pero las mismas fueron incubadas con anticuerpo (anti-TcRBP19) durante 10 min después de la formación del complejo.

4.29 ANÁLISIS COMPUTACIONAL

Para la búsqueda y comparación de secuencias se utilizaron las bases de datos *GeneDB* [361], *Genbank* [362], *EMBL Nucleotide Sequence Database* [363], *TIGR* (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>), *TcruziDB* [364] y *TriTrypDB* [365]. Se estudiaron homologías con otros genes mediante el algoritmo *BLAST* [366]. Se realizó *BlastN* y *BlastP* para encontrar genes y proteínas homólogas en otros organismos. Los alineamientos de secuencias se hicieron usando el *software T-Coffee* [367].

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos cebadores, análisis de restricción, predicciones de fases abiertas de lectura, búsqueda de patrones, construcción de mapas de vectores, etc. se utilizó el *software Genamics Expression* (Copyright (C) 2000-Version 1.100, Genamics Software, Inc), el *Vector NTI®* (Invitrogen) y el programa *OligoPerfect™ Designer* (Invitrogen) disponible en <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>.

Para analizar la estructura secundaria de las regiones 3'UTR en el ARN se usó el *software Mfold* [368] y el *RNAfold WebServer* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) [369,370]. Las estructuras formadas por oligonucleótidos cebadores fueron analizadas con la aplicación *DNA folding form* en el servidor *The Mfold Web server* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) [368].

Para buscar elementos repetidos conservados en las secuencias de interés se utilizó el servicio *online MEME The Suite* (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) [371].

Para determinar la ontología de los genes de interés se realizaron análisis de *Blast2GO online* [372].

Para el análisis de resultados de microarreglos de ADN y generación de mapas de calor o *heat map* se usó el programa *MeV (Multi experiment Viewer)* versión 4.8 [373].

Las proteínas fueron identificadas en las bases de datos del *NCBI* usando el programa *MASCOT* (<http://www.matrixscience.com>) con los parámetros que se indican en cada caso [374]. Los *spot* obtenidos en los geles 2D fueron analizados con el *software Melanie versión 6.02.0* (GE Healthcare).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TcRBP19 es una proteína que se expresa en muy bajos niveles mayoritariamente en el estadio amastigota del parásito y presenta especificidad por sustrato [339,340,342]. No se conoce la función en *T. cruzi* ni tampoco la correspondiente a los productos de los genes ortólogos existentes únicamente en otras especies de tripanosomátidos. Resulta interesante su caracterización a nivel funcional ya que esta proteína podría estar involucrada en algún aspecto aún no caracterizado de la dinámica del ARN que sea específico de tripanosomátidos.

5.1 ANÁLISIS DE APROXIMACIONES DE GENÉTICA REVERSA PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE TcRBP19

Para dilucidar la función de un gen existen básicamente dos abordajes fundamentales de la genética reversa: la abolición de su expresión o el aumento significativo de la misma. En ambos casos se analiza luego el fenotipo resultante, para poder inferir la función de dicho gen.

El bloqueo de un gen, se puede lograr por una delección del mismo ó interfiriendo con su expresión. En *T. cruzi* los ejemplos de delecciones son escasos, de hecho, solamente 10 genes han sido caracterizados experimentalmente por *knock out* en este organismo [86,375-384]. En todos estos casos, los genes fueron removidos a través de recombinación homóloga usando un *cassette* de ADN que codifica para un marcador de selección de resistencia a drogas flanqueado por la región codificante o las regiones UTRs del gen de interés. Este proceso requiere de muchas etapas de digestiones y clonados lo que lo hacen un método que consume mucho tiempo [385]. Debido a lo trabajoso de la metodología, en 2009 el grupo de Xu y cols. diseñaron un sistema más eficiente, más rápido y sencillo para generar mutantes *knock out* en *T. cruzi* basado en la tecnología *Gateway* (Invitrogen) [386]. De todas maneras y debido probablemente a la alta plasticidad del genoma de estos parásitos, los genes caracterizados por *knock out* continúan siendo escasos. Otra opción para bloquear un gen es interferir específicamente con su expresión. Ya desde su primer reporte en 1998, el mecanismo de interferencia por ARN o RNAi prometió ser una herramienta versátil y muy valiosa para analizar la función de un gen en un gran número de organismos [387]. Este mecanismo se basa en la degradación específica de transcritos celulares disparada por ARNs homólogos doble cadena (ARNds). En esta ruta, los ARNds largos, derivados ya sea de transcritos endógenos, transgénicos o virales, son procesados en pequeños ARNs de 20-26 nts llamados siRNAs, por una enzima del tipo ARNasa III llamada Dicer. Esta enzima es una proteína con múltiples dominios (helicasa, PAZ, ARNasa III y dominios de unión al ARNds) [388,389]. Los siRNAs son reconocidos por un complejo multiproteico (RISC, *RNAi-induced silencing complex*) [390] que se encarga de desaparecer los siRNAs y activarlos para el reconocimiento y degradación de los ARNm blanco. A nivel genético, hay dos proteínas en el complejo RISC que constituyen una marca universal del mecanismo RNAi y de los fenómenos relacionados, estas dos proteínas son Dicer y las proteínas de la familia AGO

Por otro lado, los niveles de expresión del homólogo de TcRBP19 en extractos proteicos de procíclicos de *T. brucei* (cedidos por el Dr. Comini, IPMont) no fueron detectables por *Western blot* usando un anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 (FIGURA 5.1.2).

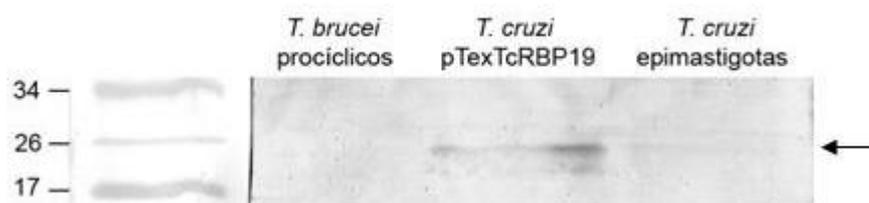


FIGURA 5.1.2 Expresión de TbRBP19 en el estadio procíclico de *T. brucei*. Análisis por *Western blot* de las proteínas totales correspondientes 5×10^6 procíclicos de *T. brucei* en estadio procíclico, 1×10^7 epimastigotas de *T. cruzi* sobrexpresando TcRBP19 como control positivo y 2×10^7 epimastigotas salvajes de *T. cruzi*. Se indica con una flecha, la banda reconocida por el anticuerpo anti-TcRBP19.

La ausencia de señal en este ensayo puede explicarse o bien porque el anticuerpo generado para TcRBP19 no reconozca la proteína homóloga en *T. brucei*, o porque ésta se exprese a muy bajos niveles en procíclicos de *T. brucei*. Al no disponer de las formas sanguíneas del parásito, no se pudo estudiar el nivel de expresión de la proteína en este estadio. Por otro lado, se ha encontrado que el nivel del transcripto correspondiente sufre poco cambio a lo largo del ciclo de vida de *T. brucei* [294].

Finalmente, el grupo de Wurst y cols. en un análisis de RNAi en 37 de las 72 proteínas con RRM reportadas en *T. brucei* en parásitos en el estadio procíclico, constataron que la interferencia del homólogo de TcRBP19 no mostraba alteraciones en el crecimiento de estos parásitos [406,407] <http://tritrypdb.org/tritrypdb/showComment.do?projectId=TriTrypDB&stableId=Tb927.7.1180&commentTargetId=gene#25680>.

Como aproximación alternativa para evaluar la función de esta proteína, se analizó el efecto de su sobrexpresión en parásitos transfectantes. Previamente, en el marco de mi trabajo de Maestría, se logró la expresión ectópica de la proteína TcRBP19 en epimastigotas mediante transfección de epimastigotas salvajes con el vector *pTEX-TcRBP19*. Desde el punto de vista fenotípico, no se constató ningún cambio morfológico evidente ni variaciones en las curvas de crecimiento comparando con parásitos control sin transfectar y parásitos transfectados con el vector vacío [340].

*En suma, dadas las dificultades para apagar la expresión de genes en *T. cruzi* y la falta de adecuación de *T. brucei* como modelo alternativo para este caso concreto, nos planteamos el estudio en profundidad de los efectos de la sobrexpresión de TcRBP19 en la regulación de la expresión génica.*

5.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE TcRBP19 EN EL CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

Los transfectantes que sobrepresan TcRBP19, fueron generados a partir de transfecciones con el vector de expresión para *T. cruzi* *pTEX* [349] conteniendo la ORF el gen *tcrbp19* [340]. En este vector *pTEX*-TcRBP19 se utilizan las regiones genómicas que dirigen la expresión de los genes *gapdh* I y II (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para regular la síntesis ectópica de TcRBP19 y de la neomicina fosfotransferasa (que confiere resistencia a neomicina) respectivamente. La ausencia de un promotor fuerte hace que la sobrepresión del gen de interés sea moderada. Por otra parte, al tratarse de un vector episomal, el número de copias del vector por parásito se ve modulado por la presión selectiva ejercida por la concentración de neomicina en el medio de cultivo [349]. Para asegurarnos que los fenómenos observados no sean el resultado de una respuesta artefactual del parásito debido a la sobrepresión de altos niveles de una proteína, se mantuvo siempre la presión selectiva en niveles moderados (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De todos modos, se chequeó la expresión del ARNm *tcrbp19* en transfectantes mediante PCR en tiempo real. Se cuantificó la cantidad de transcripto *tcrbp19* relativa al gen constitutivo *gapdh* usando los cebadores *Tc19fw* y *Tc19rev* y el par *lpgapdh1* y *lpgapdh2* respectivamente (FIGURA 5.2.1). Se detectó un aumento de transcripto *tcrbp19* de ≈ 100 veces en los epimastigotas y un aumento de ≈ 475 veces en amastigotas comparado con la población control transfectada con el vector *pTEX* vacío.

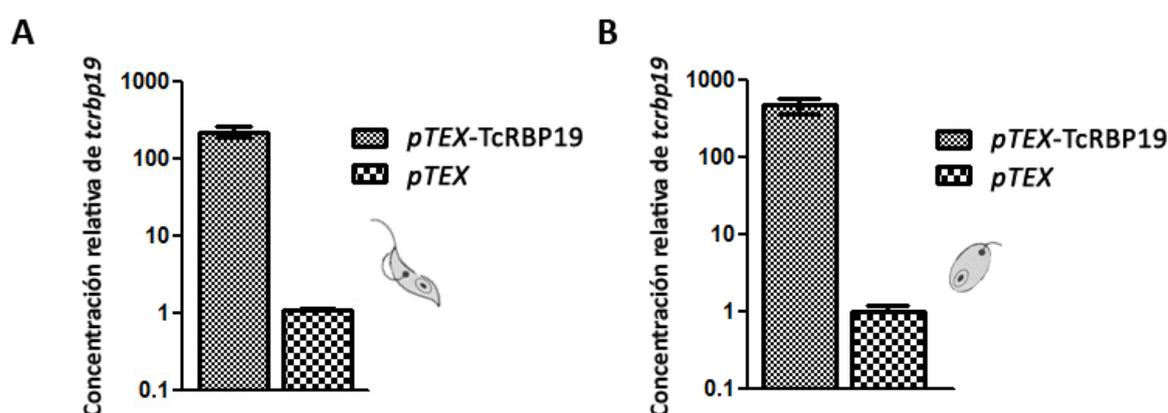


FIGURA 5.2.1 Cuantificación de transcriptos del gen *tcrbp19* relativa al gen *gapdh* en parásitos transfectantes *pTEX*-TcRBP19 y parásitos control *pTEX*. Se muestra el resultado de la cuantificación de *tcrbp19* relativa al ARNm *gapdh* normalizando con parásitos control *pTEX* en epimastigotas (A) y en amastigotas (B). La cuantificación relativa se realizó usando el método de Livak [357]. Se muestra el resultado de tres experimentos con su desviación estándar.

A su vez, se realizó un ensayo de *Western blot* usando un anticuerpo específico anti-TcRBP19 previamente generado en conejo [342]. Se estimó además, que la población de epimastigotas transfectantes sobrepresaba TcRBP19 en un nivel aproximado de 1 ng de TcRBP19 por μg de proteína total (FIGURA 5.1.4).

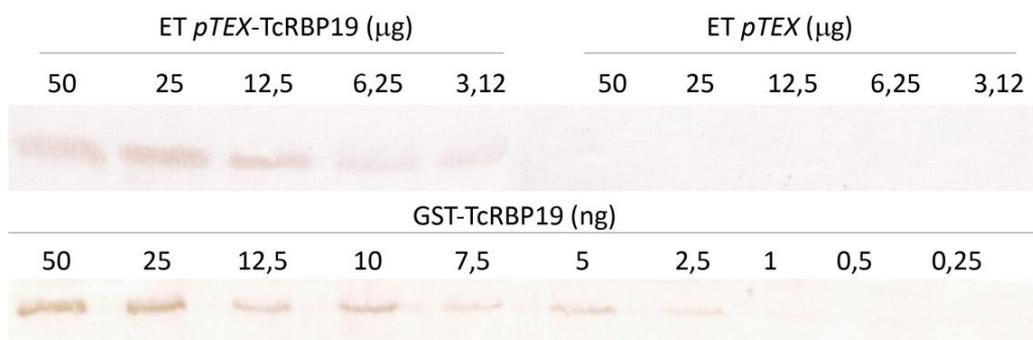


FIGURA 5.2.2 Análisis estimativo de la cantidad de TcRBP19. En el panel superior se muestra un *Western blot* con anticuerpo anti-TcRBP19 usando las cantidades indicadas (μg) de extractos proteicos totales (ET) de parásitos sobrexpresando TcRBP19 (*pTEX*-TcRBP19) y parásitos control transfectados con el vector *pTEX* vacío (*pTEX*). En el panel inferior se muestran un *Western blot* de referencia usando el mismo anticuerpo anti-TcRBP19 con concentraciones decrecientes (ng) de la proteína recombinante GST-TcRBP19.

Para analizar el efecto de la sobrexpresión de TcRBP19 en el ciclo de vida del parásito, en primer lugar, se realizó el análisis del **proceso de metaciclo génesis** *in vitro* en condiciones de estrés nutricional a partir de epimastigotas transfectantes que sobrexpresan TcRBP19 en forma comparativa con respecto a los transfectantes control (transfectados con el vector vacío). El estudio se realizó utilizando dos réplicas biológicas de los transfectantes que sobrexpresan TcRBP19 (*pTEX*-TcRBP19-A y *pTEX*-TcRBP19-B).

Los epimastigotas que sobrexpresan TcRBP19 presentan una disminución en su capacidad de desarrollar tripomastigotas metacíclicos (**TABLA 5.2.1**).

	% metacíclicos/total*
<i>pTEX</i>	40.0
<i>pTEX</i> -TcRBP19-A	26.0
<i>pTEX</i> -TcRBP19-B	28.8

TABLA 5.2.1 Metaciclo génesis de parásitos sobrexpresando TcRBP19. Se muestra el porcentaje de parásitos metacíclicos obtenidos para los parásitos transfectados con el vector *pTEX* vacío como control y comparado con el porcentaje de metacíclicos obtenidos a partir de dos poblaciones independientes de transfectantes que sobrexpresan la proteína TcRBP19 (*pTEX*-TcRBP19-A y *pTEX*-TcRBP19-B). *test estadístico χ cuadrado, $P < 0.01$.

Para el estudio del efecto de la sobrexpresión de TcRBP19 en amastigotas se infectaron células VERO con tripomastigotas metacíclicos obtenidos *in vitro*. Se evaluó el **número de parásitos intracelulares por célula** infectada. Los resultados obtenidos revelan que no hay diferencias significativas (test χ cuadrado) entre los parásitos control y los que sobrexpresan TcRBP19 (**TABLA 5.2.2**).

	48 hs	72 hs	96 hs
<i>pTEX</i>	1.32	6.70	18.52
<i>pTEX-TcRBP19-A</i>	1.27	4.46	16.35
<i>pTEX-TcRBP19-B</i>	1.14	4.35	17.80

TABLA 5.2.2 Proceso de amastigogénesis de parásitos sobrexpresando TcRBP19. El proceso fue evaluado como el número de amastigotas por célula infectada. Se contaron los amastigotas obtenidos a partir de los transfectantes sobrexpresando TcRBP19 y se compararon con el control *pTEX* a los diferentes tiempos indicados. Test estadístico χ cuadrado, diferencia no significativa ($P > 0,05$).

Finalmente, se realizó un análisis de la **infección** de parásitos que sobrexpresan TcRBP19 y se comparó con la capacidad de infección de parásitos control (parásitos transfectados con el vector *pTEX* vacío). Este análisis se llevó a cabo mediante infección de dos líneas celulares en cultivo: células VERO y células HeLa, con tripomastigotas metacíclicos provenientes de la diferenciación *in vitro* de los epimastigotas transfectantes. La infección fue seguida por microscopía óptica, observando el número de células infectadas en diferentes tiempos. En todos los tiempos analizados, tanto el porcentaje de células VERO (**FIGURA 5.2.3** y **5.2.4**) como de células HeLa (**FIGURA 5.2.4**) infectadas fue significativamente menor en aquellos parásitos que sobrexpresaban la proteína TcRBP19. Se deduce entonces que, aunque la capacidad de replicación de los parásitos en el entorno intracelular no se ve alterada por la sobrexpresión de TcRBP19, en términos globales, la amastigogénesis se ve afectada debido a la disminución de la capacidad infectiva de estos parásitos.

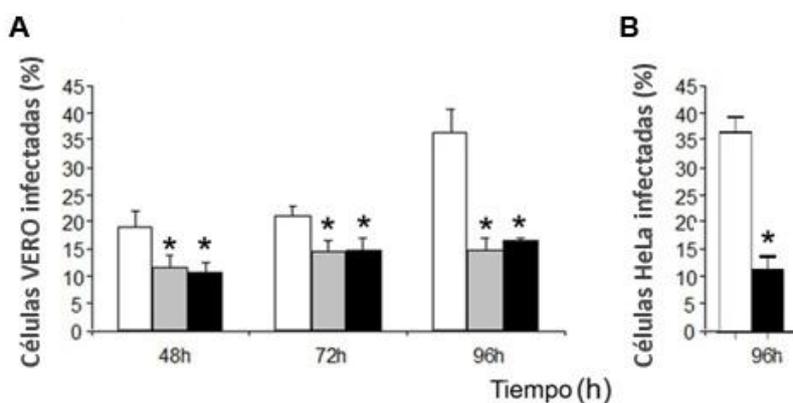


FIGURA 5.2.3 Infección de células en cultivo con parásitos transfectantes. **(A)** Porcentaje de células VERO infectadas con parásitos sobrexpresando TcRBP19. Los transfectantes *pTEX-TcRBP19-A* y *B* se representan en gris y negro respectivamente y el control *pTEX*, en blanco. ($*P < 0.05$). **(B)** Porcentaje de células HeLa infectadas con parásitos sobrexpresando TcRBP19. Los transfectantes sobrexpresando TcRBP19 (*pTEX-TcRBP19-A*) se representan en negro respectivamente y el control *pTEX*, en blanco. ($*P < 0.05$).

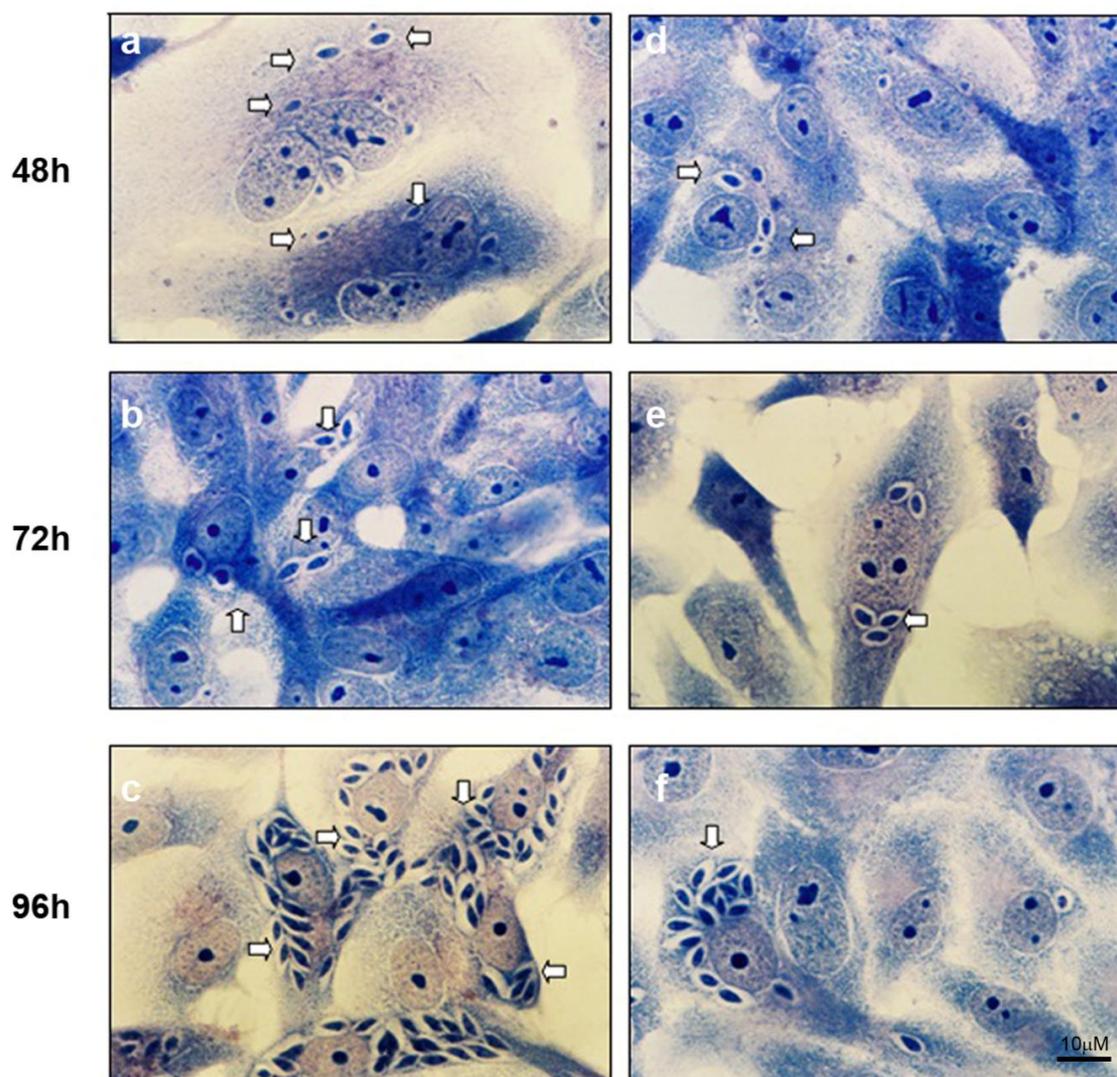


FIGURA 5.2.4 Imágenes representativas de células VERO infectadas en cultivo. Infección con parásitos transfectantes *pTEX* (a-c) y *pTEX-TcRBP19-A* (d-f) a los diferentes tiempos de incubación indicados. Los cultivos fueron seguidos por microscopía óptica. Las flechas indican las formas intracelulares de los transfectantes.

Dado que las células de mamífero utilizadas son sensibles al antibiótico neomicina, no fue posible mantener la presión selectiva en los transfectantes amastigotas. Como control de la sobreexpresión se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para chequear la sobreexpresión de la proteína TcRBP19 a lo largo de los diferentes estadios del ciclo de vida (FIGURA 5.2.5).

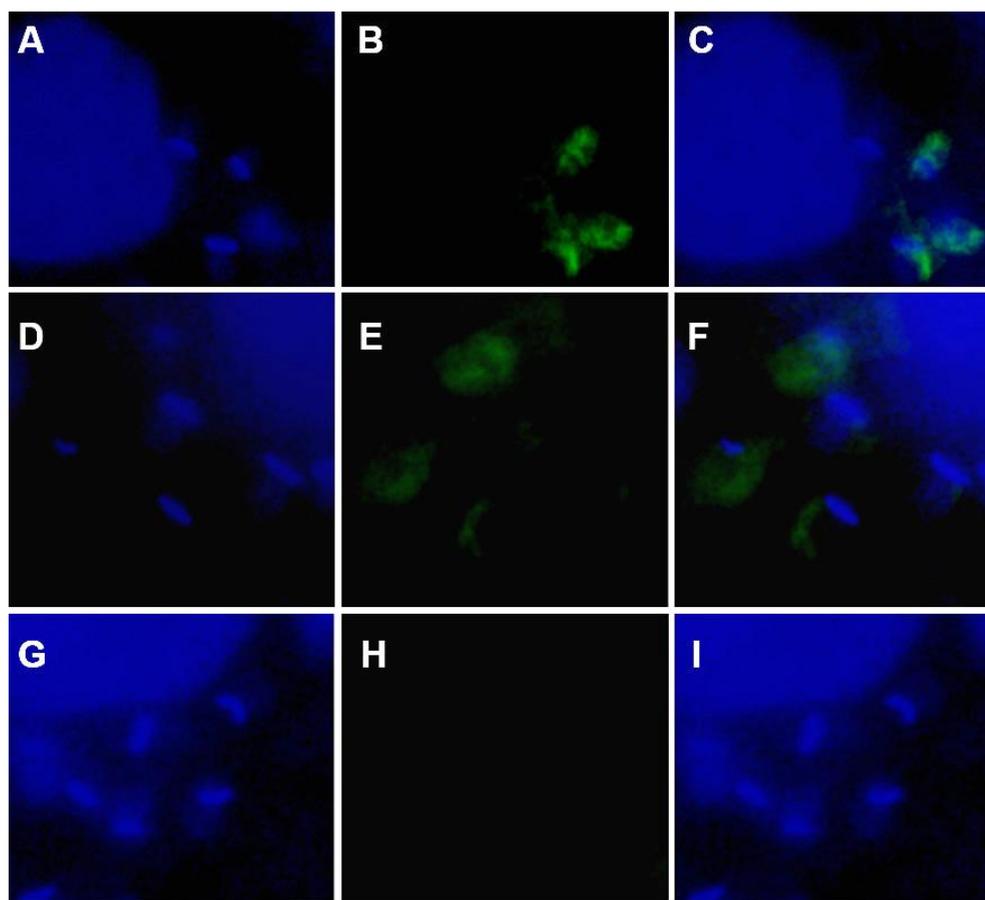


FIGURA 5.2.5 Expresión de TcRBP19 en amastigotas. Ensayo de inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-TcRBP19 y un anticuerpo secundario Alexafluor 488. **(A-F)** Amastigotas intracelulares que sobrepresan TcRBP19. Se muestra el ADN nuclear y mitocondrial teñido con DAPI **(A y D)**, la señal Alexa 488 **(B y E)** y superposición de ambas imágenes **(C y F)** para dos infecciones independientes con tripomastigotas metacíclicos obtenidos a partir de epimastigotas sobrepresando TcRBP19 provenientes de dos transfecciones independientes: *pTEX-TcRBP19-A* y *pTEX-TcRBP19-B*. **(G-I)** Amastigotas intracelulares transfectados con el vector *pTEX* vacío usado como control. Se muestra la tinción con DAPI **(G)**, la señal Alexa 488 **(H)** y la superposición de las dos imágenes **(I)** para la infección de células HeLa con tripomastigotas metacíclicos obtenidos a partir de epimastigotas transfectados con el vector *pTEX* vacío.

En trabajos en paralelo, se ha evaluado la capacidad de infección de parásitos sobrepresando otra proteína de unión al ARN pero con motivo Pumilio, TcPUF6 [333]. En este caso, no se observaron alteraciones en el proceso de metacicloogénesis y/o amastigogénesis, lo que refuerza el hecho que la disminución de la eficiencia del proceso de metacicloogénesis, así como la disminución en el número de células infectadas son una consecuencia del efecto de la expresión ectópica de la proteína TcRBP19 en particular y no de cualquier proteína de unión al ARN.

Es interesante notar que como habíamos señalado en el capítulo anterior, la proteína ortóloga de *T. brucei* no presenta cambios significativos de expresión (a nivel de ARNm) durante el ciclo de vida. La diferencia en el perfil de expresión entre estas dos proteínas ortólogas, podría ser entendida en función de los resultados aquí

presentados, ya que el ciclo de vida de *T. brucei* no involucra estadios intracelulares. Para comprender mejor el rol de esta proteína y su conservación, resultaría de interés estudiar su perfil de expresión y efecto de la sobreexpresión también en *Leishmania*, un tripanosomátido con estadio intracelular.

El efecto de la expresión forzada de TcRBP19 a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi* se resume en la **FIGURA 5.2.6**. La reducida cantidad de tripomastigotas metacíclicos como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19, podría deberse a una falla en la respuesta a los mecanismos de estrés nutricional o de diferenciación desencadenados causada por la expresión ectópica de TcRBP19. En este contexto, la modificación de los niveles de esta proteína de unión al ARN podría interferir en el funcionamiento de redes génicas regulatorias que participen en la progresión del ciclo celular. Por otro lado, la disminución en el número de células de mamífero infectadas debido a la expresión forzada de TcRBP19, constituye otra evidencia del rol regulatorio de esta proteína.

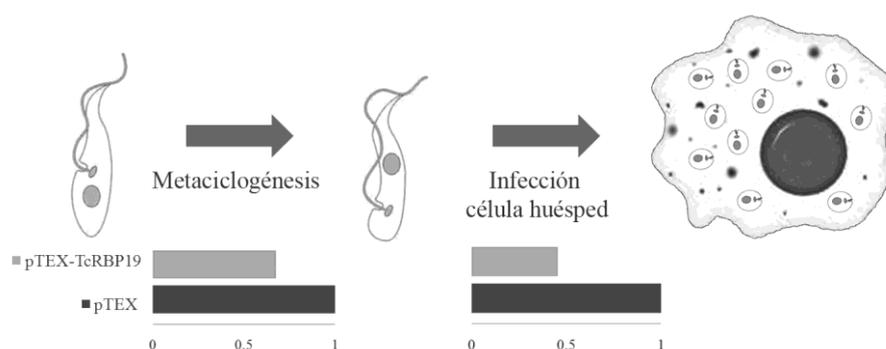


FIGURA 5.2.6 Representación gráfica del efecto de la sobreexpresión a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*.

En conclusión, la expresión forzada de TcRBP19 afecta la diferenciación de epimastigotas en formas metacíclicas exitosamente infectivas. Los resultados sugieren que el parásito *T. cruzi* requiere un nivel controlado de expresión de TcRBP19 para lograr una eficiente metaciclogénesis así como una infección productiva.

5.3 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TcRBP19

TcRBP19 es una proteína que se expresa en muy bajos niveles en el estadio intracelular del parásito. Mediante técnicas de *Western blot* convencionales usando un anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 previamente generado, no se pudo detectar la presencia de la proteína en parásitos salvajes, en ninguno de los estadios. Solo fue posible detectar la expresión de TcRBP19 en ensayos de *Western blot* amplificando la señal del anticuerpo mediante el uso de proteína A [¹²⁵I]. Esto indica que TcRBP19 es una proteína de muy baja expresión [340].

Dado que la detección de TcRBP19 usando técnicas convencionales solo ha sido posible en parásitos transfectantes sobrepresando la proteína, para el análisis de la localización celular de TcRBP19 se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en epimastigotas y en amastigotas axénicos transfectantes sobrepresando dicha proteína. El uso de microscopía confocal permitió revelar una localización difusa con un patrón punteado mayoritariamente citoplasmático tanto en epimastigotas como en amastigotas (**FIGURA 5.3.1** y **FIGURA 5.3.2**).

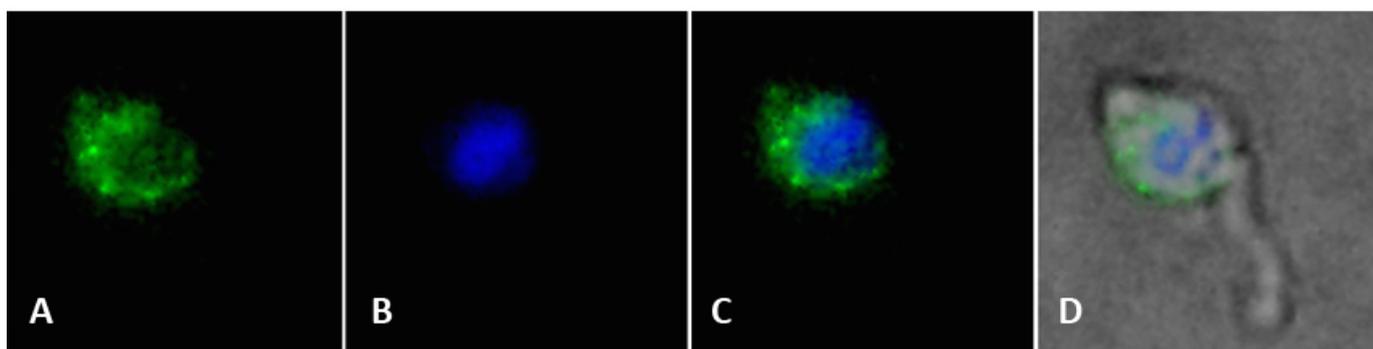


FIGURA 5.3.1 Localización subcelular de TcRBP19 en epimastigotas transfectantes. TcRBP19 muestra un patrón de localización difuso básicamente en el citoplasma. (A) Sección confocal de un epimastigota representativo mostrando que TcRBP19 (verde) se localiza en el citoplasma. (B) ADN nuclear y kinetoplasto teñido con DAPI (azul). (C) Superposición de las imágenes A y B. (D) Imagen del contraste de fases de las imágenes anteriores superpuestas. Las imágenes fueron obtenidas con un Microscopio confocal espectral Leica modelo TCS SP5 II equipado con laser UV (405 nm), laser argón multilínea (458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm) y láser HeNe (543 nm, 633 nm) con sistema de barrido dual (escáner convencional de alta resolución/velocidad variable y resonante de alta velocidad de barrido).

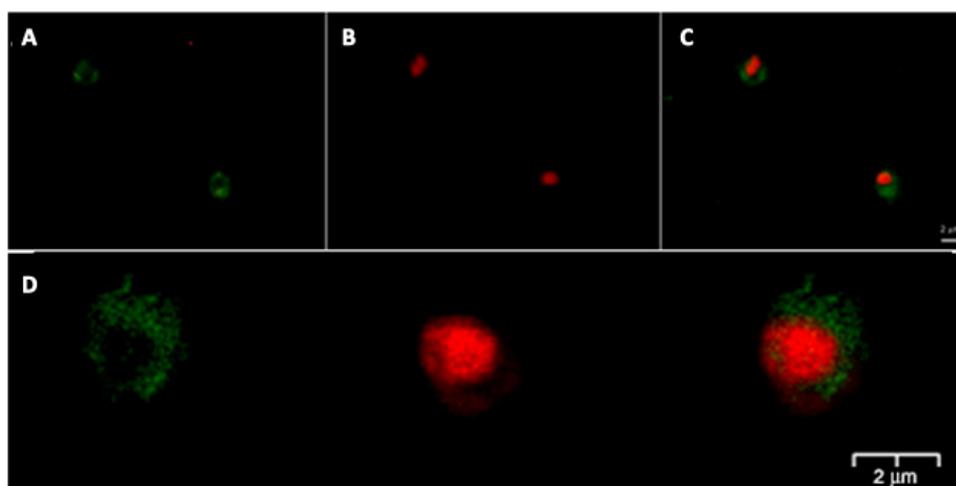


FIGURA 5.3.2 Localización subcelular de TcRBP19. TcRBP19 muestra un patrón de localización difuso básicamente en el citoplasma. (A) Sección confocal mostrando que TcRBP19 (verde) se localiza en el citoplasma de amastigotas sobrexpresando TcRBP19. (B) ADN nuclear y kinetoplastido teñido con Ioduro de propidio (rojo). (C) Superposición de las imágenes A y B. (D) Ampliación del campo mostrando en detalle un solo amastigota. Las imágenes fueron obtenidas con un Microscopio Confocal FV300 Olympus usando un lente 100x (aceite, N.A. 1.35) con excitación laser Argon (488nm) y HeNe (546nm).

Por otro lado, y tal como se comentó en la sección anterior, en amastigotas celulares obtenidos mediante infección de células Hela en cultivo con parásitos transfectantes sobrexpresando TcRBP19, también se observa una localización citoplasmática de la proteína (FIGURA 5.2.5 paneles A-F).

5.3.1 ASOCIACIÓN POLISOMAL DE TcRBP19 EN EPIMASTIGOTAS TRANSFECTANTES

Dada la localización citoplasmática de TcRBP19, consideramos que esta proteína podría estar involucrada en la expresión de algunos transcritos a través de la modulación de sus vidas medias o sus tasas de traducción (ya sea modificando la disponibilidad o la eficiencia traduccional). Para abordar estas hipótesis, nos planteamos, en primer término, el análisis de la asociación de TcRBP19 con polisomas.

Para ello se realizó el proceso de amastigogénesis *in vitro* [34] usando parásitos *T. cruzi* salvajes. Los amastigotas obtenidos fueron tratados con cicloheximida para capturar los polisomas unidos a los ARNm y la fracción enriquecida en polisomas se cargó en un gradiente de sacarosa (ver 4.15 y FIGURA 4.15.1). Las diferentes fracciones obtenidas fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y luego de la incubación con anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 se reveló usando un método quimioluminiscente, que es más sensible que el colorimétrico clásico. Se escogió el kit *ECLTM Western Blotting Analysis System* recomendado por su sensibilidad en la detección aún de proteínas de baja abundancia.

Lamentablemente, este sistema no fue lo suficientemente sensible como para detectar la baja concentración de la proteína TcRBP19 en ninguna de las fracciones polisomales obtenidas a partir de amastigotas.

Debido a las dificultades para obtener suficientes amastigotas transfectantes en nuestro laboratorio, se decidió realizar este análisis en epimastigotas transfectantes sobreexpresando TcRBP19. Para ello, se crecieron hasta fase exponencial epimastigotas sobreexpresando TcRBP19 y se trataron con cicloheximida para atrapar los polisomas unidos a los ARNm. Luego, la fracción enriquecida en polisomas fue obtenida mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas por *Western blot* observándose que TcRBP19 cosedimenta con los ribosomas y los polisomas apareciendo aún en las fracciones más densas (**FIGURA 5.3.1.1A**). El perfil de fraccionamiento obtenido es típico de una proteína asociada a polisomas. En efecto, se observó un perfil similar para la proteína ribosomal S7 usada como control positivo [356]. Como control negativo se usó un anticuerpo anti-Puf6, una proteína citoplasmática pero no se une a ribosomas [333].

Para confirmar que la presencia de TcRBP19 en las fracciones más pesadas se debe a su asociación a los polisomas y no es el resultado de su asociación a complejos proteicos pesados, se realizó un control utilizando EDTA para disociar los polisomas (**FIGURA 5.3.1.1B**). Sin embargo, algunos autores, consideran insuficiente este control con EDTA, dado que la formación de algunos complejos proteicos pesados pueden desensamblarse también en ausencia de calcio promovida por la presencia de EDTA. Por este motivo, se realizó además un control con puromicina. El tratamiento con puromicina causa una liberación de los ARNm de los polisomas con el consiguiente desensamblaje de los mismos [230] (**FIGURA 5.3.1.1C**). Se trató entonces, por un lado la fracción enriquecida en polisomas antes de la centrifugación con EDTA, y por otro lado, se realizó el tratamiento con puromicina. En ambas condiciones, se puede observar el perfil de disociación de los polisomas, y se ve un cambio en la distribución de TcRBP19 que se re-localiza en las subunidades ribosomales más livianas. Este patrón se reproduce para la proteína S7, tal como se esperaba. Si bien la sobreexpresión de una proteína podría promover perfiles alterados en su expresión, localizándose a lo largo de todo el fraccionamiento, si la distribución de TcRBP19 observada fuera simplemente debida a su sobreexpresión, no se debería ver afectada por la presencia de EDTA ó puromicina. Estos resultados indican que en epimastigotas que sobreexpresan TcRBP19, esta proteína se asocia con los complejos polisomales sugiriendo un posible rol de la proteína en eventos de regulación de la traducción.

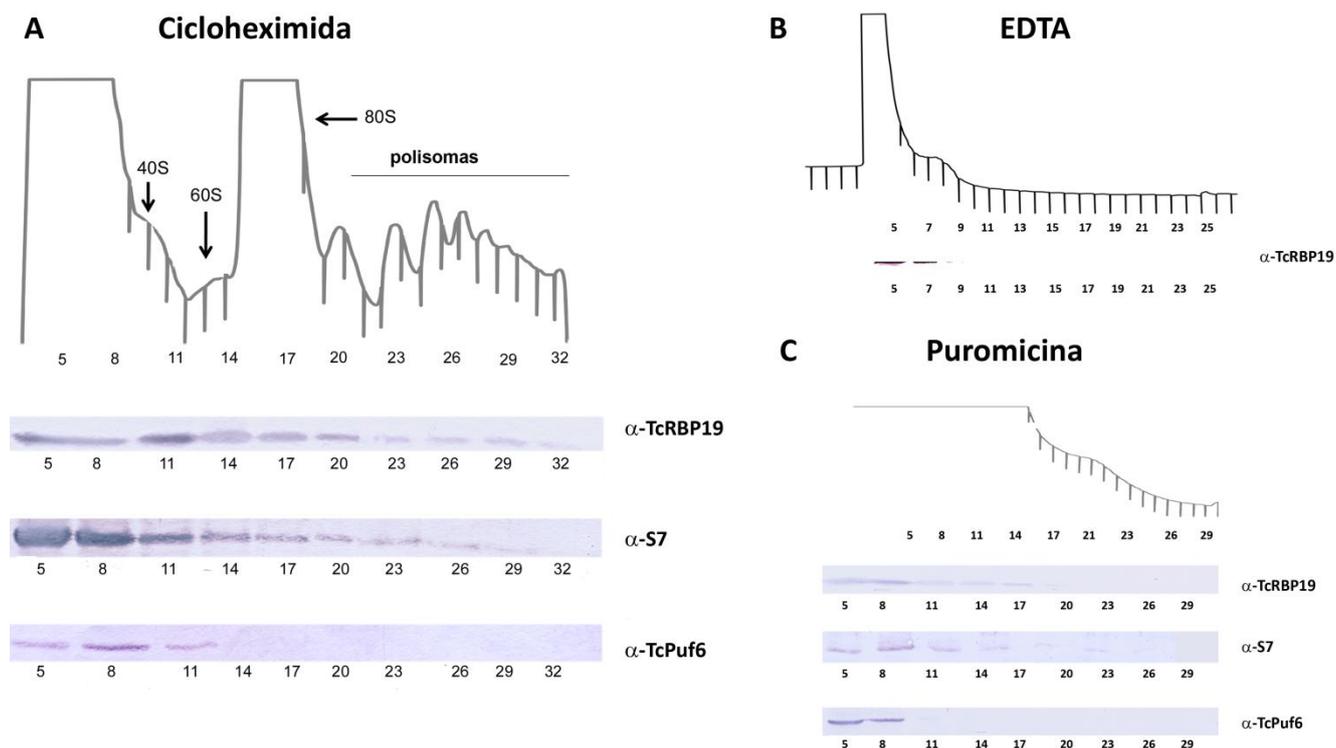


FIGURA 5.3.1.1 Perfil polisomal en epimastigotas transfectantes que sobreexpresan TcRBP19. Se muestra la asociación de TcRBP19 a polisomas en epimastigotas transfectantes **(A)** Perfil polisomal (Absorbancia a 254 nm) obtenido en el gradiente de sacarosa en presencia de cicloheximida. Se señalan con flechas la fracción correspondiente a la subunidad ribosomal menor (40S), a la subunidad mayor (60S) y al ribosoma (80S), a continuación se señalan las fracciones polisomales. Con números se indican las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa colectadas. Debajo de los perfiles polisomales, se muestran los *Western blots* de las fracciones con anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 (α -TcRBP19), anti-proteína ribosomal S7 (α -S7) como control positivo y anti-proteína Puf6 (α -Puf 6) como control negativo. **(B)** Perfil polisomal del control con EDTA. Debajo, se muestra un *Western blot* con anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 (α -TcRBP19) de las fracciones colectadas a partir del gradiente de sacarosa del control con EDTA. **(C)** Perfil polisomal del control con puromicina. En este caso se trataron los polisomas con puromicina antes de realizar el gradiente de sacarosa. Como resultado, se observan los polisomas desensamblados. Debajo se muestran los *Western blots* con un anticuerpo policlonal anti-TcRBP19 (α -TcRBP19), anti-proteína ribosomal S7 (α -S7) como control positivo y anti-proteína Puf6 (α -Puf 6) como control negativo.

La localización citoplasmática sugiere que TcRBP19 podría estar regulando la expresión de los transcritos blanco ya sea modulando su vida media o bien sus disponibilidades y eficiencias de traducción. El hecho de que TcRBP19 co-sedimente además con los polisomas en gradientes de sacarosa es un indicio de que esta proteína podría estar involucrada en mecanismos de regulación de la traducción. Como hipótesis del mecanismo de acción de la proteína TcRBP19 se podría plantear la interacción específica con ARNm particulares modulando la localización polisomal, la eficiencia de traducción, ó ambos procesos.

5.4 EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE TcRBP19 EN EL TRANSCRIPTOMA DE *T. CRUZI*

Dado que TcRBP19 cosedimenta con los polisomas, nos propusimos estudiar globalmente la modificación de los ARNs traduccionalmente activos, como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19. Aunque existan mecanismos de regulación traduccional y *post*-traduccional, el análisis de los ARNm asociados a polisomas es una primera aproximación que brinda un panorama de una de las etapas de regulación *post*-transcripcional.

El desarrollo de la tecnología de los microarreglos de ADN ha permitido analizar la expresión de cada gen anotado a nivel de transcripción. De hecho, esta técnica junto con la tecnología de secuenciación masiva, ha sido la aproximación a gran escala de elección para caracterizar eficientemente el transcriptoma de varios organismos modelo, incluyendo *T. cruzi* [408]. En general, se considera que en una célula eucariota, existe una correlación muy pobre entre los niveles de ARNm y proteína, dado que no todo ARNm es necesariamente traducido en el estadio/condición de interés. Este hecho pone de manifiesto la existencia de mecanismos activos de regulación *post*-transcripcional y traduccional [409,410].

Los primeros análisis del transcriptoma de *T. brucei*, han revelado que solo una pequeña proporción de los ARNm (2-5%) son modulados a lo largo del ciclo de vida, y observaciones similares se han hecho para el transcriptoma de *Leishmania* (revisado en [223]). Sin embargo, estudios posteriores, usando parámetros menos exigentes, sugieren que la expresión de los ARN codificantes es modulada en un porcentaje sustancialmente mayor, que puede alcanzar hasta el 25% a lo largo del ciclo de vida de *T. brucei* [294]. Para el caso de *T. cruzi*, los análisis del transcriptoma revelan que aproximadamente el 50% de los genes son regulados durante el ciclo de vida del parásito [408]. Tratándose de organismos que carecen de regulación a nivel de inicio de la transcripción, se podría considerar que el estudio de los perfiles de ARNm total no sería muy informativo. Sin embargo, se ha reportado la existencia de un comportamiento especular entre el transcriptoma y la expresión proteica para varios grupos funcionales de genes [408].

Para analizar los cambios en el transcriptoma causados por la sobreexpresión de TcRBP19 se usó la tecnología de microarreglos de ADN. Se compararon los perfiles de ARNm polisomal en estado estacionario de parásitos que sobreexpresan TcRBP19 con los perfiles de ARNm polisomal de parásitos control transfectados con el vector vacío (*pTEX*). En una primera aproximación, este ensayo se realizó en epimastigotas y luego en amastigotas sobreexpresando TcRBP19. Se aislaron polisomas por ultracentrifugación en colchón de sacarosa y se purificó el ARN asociado. Los ARNs obtenidos a partir del transfectante y del control fueron amplificados y marcados diferencialmente con los fluoróforos Cy5-dCTP o Cy3-dCTP y se procedió a la hibridación competitiva en láminas de microarreglos de *T. cruzi*. Finalmente se leyó el patrón de fluorescencia de las láminas y se analizaron los resultados bioinformáticamente (ver 4.28.2 y **FIGURA 4.28.2.1**).

5.4.1 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE EPIMASTIGOTAS QUE SOBREPRESAN TcRBP19

Dado el rol potencial de TcRBP19 en la regulación de la expresión génica, se procedió al estudio de las diferencias en la naturaleza y contenido de los ARNs asociados a polisomas en epimastigotas transfectantes sobrepresando TcRBP19. Se comparó los niveles de ARNm en estado estacionario de epimastigotas control transfectados con el vector *pTEX* vacío *versus* epimastigotas transfectadas con el vector *pTEX*-TcRBP19 mediante hibridación competitiva de ARN polisomal en microarreglos de *T. cruzi*.

El análisis fue realizado en triplicado, es decir, se realizaron 3 extracciones de ARN polisomal para cada una de las dos réplicas biológicas del transfectante *pTEX*-TcRBP19 (A y B). Se realizaron además, dos duplicado técnicos alternando los fluoróforos del marcado de los ARNs (*dye swap*). Adicionalmente, cada lámina cuenta con las sondas del microarreglo en triplicado.

Se obtuvieron resultados similares para las dos replicas biológicas analizadas. En la **FIGURA 5.4.1.1** se muestra la correlación del resultado de ARN polisomal de las dos poblaciones independientes de epimastigotas transfectantes sobrepresando TcRBP19 (Exp A y Exp B).

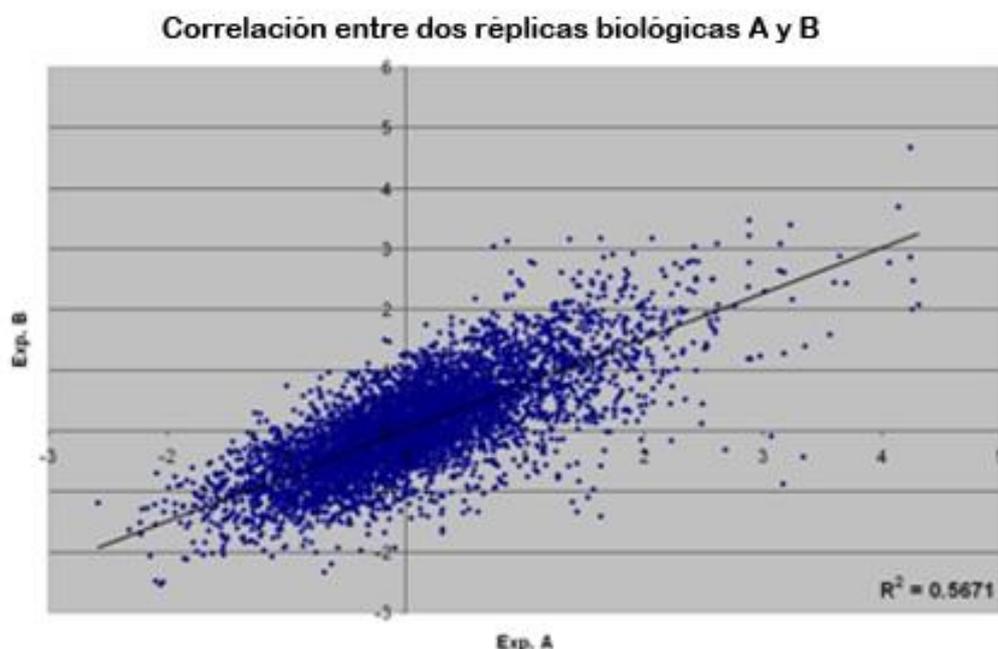


FIGURA 5.4.1.1 Gráfico de dispersión de datos para los valores de intensidad de hibridación en el microarreglo con ARN polisomal. Se muestra la correlación en la intensidad de ARN polisomal correspondiente a dos réplicas biológicas (ExpA y ExpB) de transfectantes sobrepresando TcRBP19 se hibridó en el microarreglo de ADN de *T. cruzi* usando como referencia el transfectante con el vector *pTEX* vacío.

Se puede apreciar que la sobrepresión de TcRBP19 tiene un efecto marcado en la abundancia de una subpoblación de genes. Considerando solo los genes que muestran cambios en los niveles de ARNm de al menos un

factor FC (*fold change*) de 2 ($\log_2 \geq 2$), se encontraron 50 transcritos aumentados en parásitos sobreexpresando TcRBP19 con respecto al control *pTEX* (TABLA 5.4.1.1).

Gen	Log2(FC)	Producto
Tc00.1047053510795.10*	3,917	Tirosín aminotransferasa
Tc00.1047053508923.10*	3,551	Aminoácido permeasa
Tc00.1047053511287.49	3,318	Aldo ceto reductasa
Tc00.1047053506053.10	3,262	Transportador de aminoácidos
Tc00.1047053507029.30	3,176	Proteína de choque térmico 70 kDa, precursor mitocondrial
Tc00.1047053507101.10*	3,072	Aminoácido permeasa
Tc00.1047053507017.120	3,050	Ubiquitín hidrolasa /cisteín peptidasa
Tc00.1047053507837.20	2,896	Proteín quinasa
Tc00.1047053509895.30	2,892	Proteína hipotética, conservada (dominio RNA metiltransferasa)
Tc00.1047053506633.90	2,832	Transportador folato/pteridina
Tc00.1047053506321.280	2,733	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053511003.160	2,707	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053504741.124	2,625	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053506725.20	2,623	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053508693.50	2,619	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510751.10	2,574	Ribonucleasa
Tc00.1047053506943.50	2,570	Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa
Tc00.1047053509793.10	2,542	Proteína asociada al ADN kinetoplasto
Tc00.1047053506297.260	2,514	Lanosterol 14-alfa-demetilasa
Tc00.1047053507949.250	2,462	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053506279.60	2,417	<i>trans</i> -sialidasa
Tc00.1047053507555.80	2,408	Proteína RHS (<i>retrotransposon hot spot</i>)
Tc00.1047053510595.40	2,403	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053508241.10	2,368	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
Tc00.1047053505987.60	2,325	Proteína hipotética
Tc00.1047053503861.50	2,271	Beta galactofuranosil glicosiltransferasa
Tc00.1047053508177.40	2,253	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510187.20*	2,243	Tirosín aminotransferasa*
Tc00.1047053504929.10	2,229	Caseín quinasa, isoforma delta
Tc00.1047053508257.170	2,225	Cadena pesada dineína
Tc00.1047053507933.10	2,167	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053511621.50	2,159	Proteína de unión al ARN (motivo de unión a minicírculo)
Tc00.1047053487507.10	2,140	Tryparredoxín peroxidasa

Tc00.1047053510131.30	2,131	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053506817.10	2,129	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053507241.30	2,123	Arginín quinasa
Tc00.1047053507713.30	2,116	Proteína de choque térmico 85
Tc00.1047053511325.40*	2,112	Aminoácido permeasa
Tc00.1047053511277.60	2,102	Alcohol deshidrogenasa
Tc00.1047053510243.30	2,092	Proteína chaperona DnaJ
Tc00.1047053506357.50	2,057	Alcohol deshidrogenasa
Tc00.1047053506989.70	2,056	<i>flagellar radial spoke protein-like</i>
Tc00.1047053510103.24	2,040	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053511801.60	2,039	Proteína mitocondrial <i>DEAD box</i> (RNA helicasa)
Tc00.1047053506963.10	2,033	Proteína ribosomal 60S L10a
Tc00.1047053507617.9	2,027	prostaglandin F2 alfa sintasa
Tc00.1047053508557.29	2,024	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053503837.10	2,021	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053508307.70	2,015	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053508441.20	2,001	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa glicosomal

TABLA 5.4.1.1 Transcriptos aumentados en epimastigotas como resultado de la sobreexpresión de TcRBP19. Se muestran los genes cuya expresión mostró un aumento de más de 4 veces (Log2 FC) en la cantidad de ARN polisomal de epimastigotas sobreexpresando TcRBP19 con respecto al control. Se señala con asterisco (*) los alelos del mismo gen.

La mayoría de estos ARNm aumentados por efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 codifican para proteínas hipotéticas (17); todas ellas, excepto una, son proteínas hipotéticas conservadas. De los transcriptos aumentados que han sido anotados se encontraron: proteínas de choque térmico (3), proteínas de superficie (1), proteínas con dominios de unión a ácidos nucleicos (6), proteínas involucradas en proceso metabólicos tales como enzimas proteín quinasa (3), transportadores (6) y otras enzimas involucradas en procesos metabólicos (6).

Para tener un panorama general de la función de los transcriptos aumentados, se realizó un análisis de ontología por *Blast2GO* [411] sobre las 50 secuencias de la **TABLA 5.4.1.1**. El programa realiza un BLAST [366] en la base de datos del NCBI, luego vincula los homólogos con la anotación funcional que proporciona el *Gene Ontology Consortium*, aplica las reglas de anotación del programa al conjunto de datos y facilita la visualización y análisis de los resultados. Los resultados de estos estudios muestran diferentes agrupamientos de las secuencias seleccionadas **FIGURA 5.4.1.2**. En cuanto al nivel de *Proceso Biológico*, se pudo asignar un término GO sólo a 19 transcriptos que se agrupan en tres grupos principales: proteínas involucradas en procesos de oxidación-reducción, proteínas involucradas en procesos biosintéticos, y en procesos del metabolismo de proteínas

celulares. Por otro lado, a nivel de *Función Molecular*, donde se asignó término GO a 27 transcritos, se definen 5 grupos: dos grupos mayoritarios de proteínas con actividad transferasa y actividad oxidorreductasa, y tres grupos de proteínas de unión (a ácidos nucleicos, a ATP y a iones metálicos). Finalmente, a nivel de *Componente Celular*, el programa asignó término GO a 19 transcritos y los clasificó en 3 grupos definidos que incluyen proteínas citoplasmáticas, proteínas de membrana de organelos y proteínas integrales de membrana.

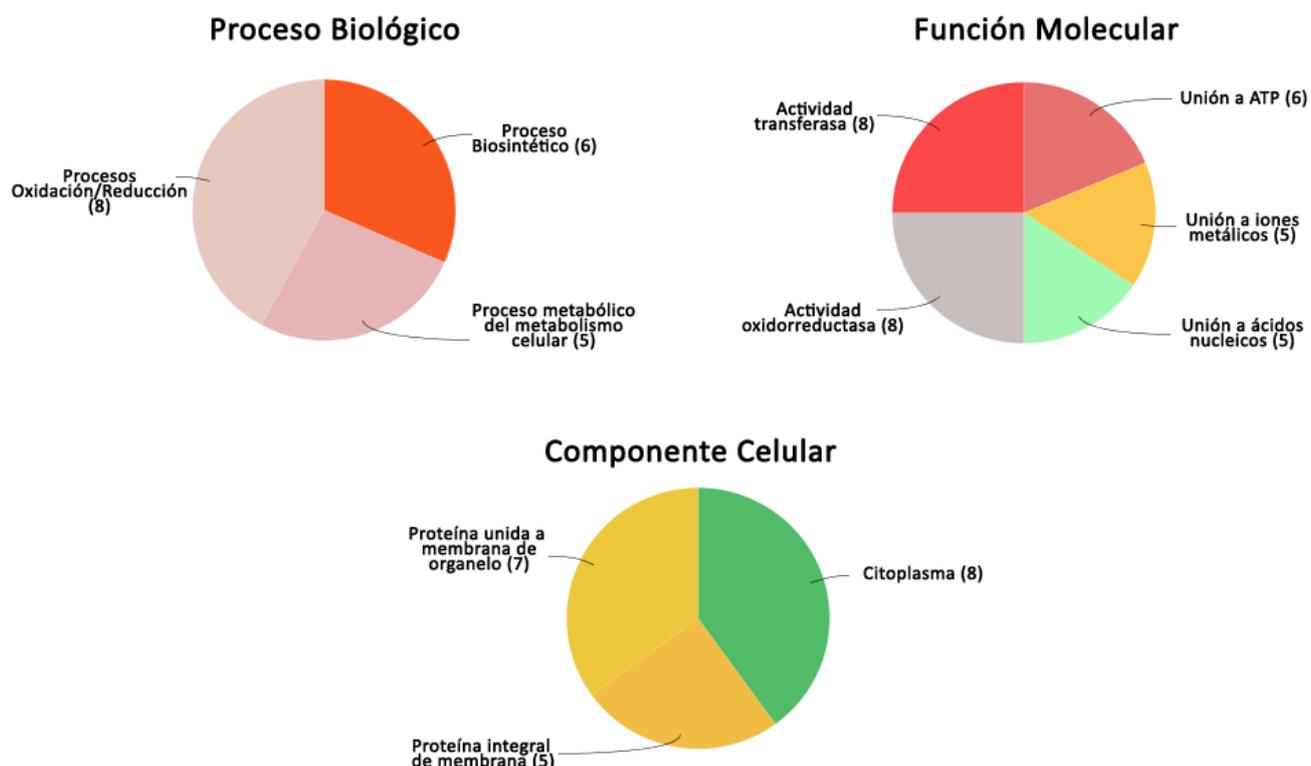


FIGURA 5.4.1.2 Análisis por Blast2GO de las secuencias de los transcritos que resultan aumentados en respuesta a la sobreexpresión de TcRBP19 en epimastigotas de *T. cruzi*. Se muestran los gráficos de distribución de secuencias de las tres categorías de ontología.

Aunque no resulta evidente una asociación funcional entre los genes afectados, es posible considerar que la distribución de genes en la fracción polisomal de epimastigotas salvajes podría abarcar más categorías en cualquiera de los tres niveles de GO que los encontrados como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19.

Teniendo en cuenta los datos de expresión de Minning y cols., en la **FIGURA 5.4.1.3** se muestra el patrón de expresión en el ciclo de vida de 38 de los 50 genes aumentados como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19. Puede apreciarse una tendencia para la mayoría de los genes de expresión aumentada en los estadios replicativos del parásito (amastigotas y epimastigotas).

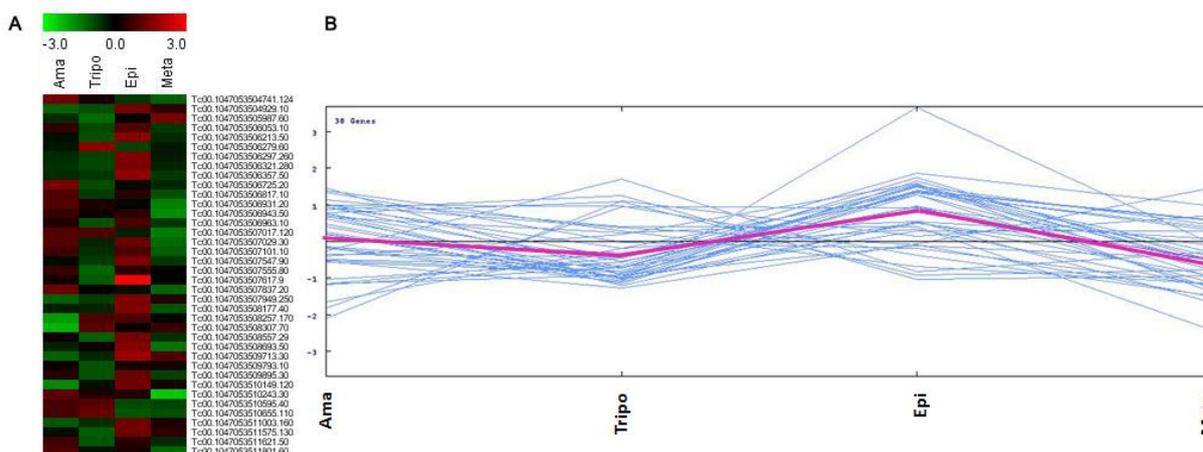


FIGURA 5.3.1.3 Datos de expresión de los transcritos aumentados como resultado de la sobreexpresión de *TcRBP19* en epimastigotas. **A)** Mapa de calor mostrando la expresión en el ciclo de vida del parásito de los genes seleccionados o sus alelos. **B)** Gráfico de expresión de dichos genes donde se representan los cuatro estadios de izquierda a derecha: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas. Se muestra con una línea rosa el patrón de expresión promedio de todos los genes. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa MultipleExperiment Viewer versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

Visto que en este ensayo se comparó el perfil de ARN polisomal en estado estacionario de parásitos epimastigotas que sobreexpresaban *TcRBP19* en comparación con parásitos control, era de esperar la aparición del ARNm que codifica para la proteína *TcRBP19* en la lista de transcritos aumentados. Sin embargo, este gen no aparece en la **TABLA 5.4.1.1** dado que para este experimento, se usó una lámina de microarreglo en la cual dicho gen no estaba representado.

En cuanto a los transcritos que estarían afectados negativamente por la presencia de *TcRBP19*, esto es, transcritos disminuidos con respecto al control, se encontraron solo 2 ARNm que cumplen esta condición considerando un criterio de disminución en un factor $FC \leq 2$ ($\log_2 \leq -2$) con respecto a parásitos transfectados con el vector vacío. Estos dos transcritos disminuidos codifican para dos proteínas hipotéticas, ambas conservadas (**TABLA 5.3.1.2**). Para ninguna de las dos proteínas hay datos de GO disponibles en ninguna de las tres categorías (*Proceso Biológico, Función Molecular, Componente Celular*).

Gen	Log ₂ (FC)	Producto
Tc00.1047053506517.149	-2,293	Proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053509885.40	-2,110	Proteína hipotética, conservada

TABLA 5.3.1.2 ARN mensajeros disminuidos en epimastigotas como consecuencia de la sobreexpresión de *TcRBP19*. Se muestran los genes cuya expresión mostró una disminución de más de 4 veces ($\log_2 FC$) en la cantidad de ARN polisomal de epimastigotas sobreexpresando *TcRBP19* hibridado con respecto al control.

Los datos de expresión de Minning y cols. para estos dos genes indican que se expresan en estadios diferentes del ciclo de vida (**FIGURA 5.4.1.4**).

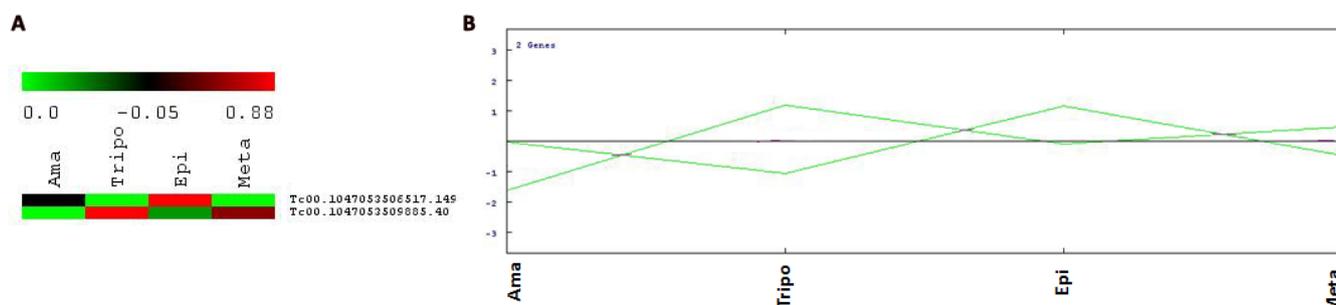


FIGURA 5.3.1.4 Datos de expresión de los transcritos disminuídos como resultado de la sobreexpresión de TcRBP19 en epimastigotas. **A)** Mapa de calor mostrando la expresión de los dos ARNm seleccionados en el ciclo de vida del parásito. **B)** Gráfico de expresión de dichos genes donde se representan los cuatro estadios analizados de izquierda a derecha: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa MultipleExperiment Viewer versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

5.4.2 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE AMASTIGOTAS QUE SOBREPRESAN TcRBP19

Se realizó el análisis del efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 en la modificación global de los ARNs polisomales, como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19 en el estadio amastigota, estadio en el cual la proteína se expresa, aunque a muy bajos niveles. Para ello, se realizó una hibridación competitiva de ADNc de amastigotas control transfectados con el vector *pTEX* vacío contra ADNc de amastigotas sobreexpresando TcRBP19.

Para el análisis se consideraron solo los transcritos que muestran cambios en los niveles de ARNm en al menos un factor $FC \geq 1,5$. Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas afecta el nivel de 25 transcritos que corresponden a un bajo porcentaje de las secuencias presentes en el microarreglo. De estos transcritos, 16 se encuentran aumentados en los transfectantes sobreexpresando TcRBP19 (**TABLA 5.4.2.1**).

Gen	Log2(FC)	Producto
Tc00.1047053508213.20	3,234	TcRBP19
Tc00.1047053511407.30	2,652	Proteína hipotética
Tc00.1047053506661.80	1,989	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053506943.69	1,966	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053509053.130	1,905	Protein chaperona DnaJ

Tc00.1047053506637.110	1,86	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053511755.10	1,79	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053504575.20	1,677	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053508533.10	1,651	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053511229.20	1,621	Oxidorreductasa
Tc00.1047053511421.230	1,586	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053511565.20	1,577	Proteína hipotética
Tc00.1047053506145.24	1,567	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053506943.40	1,564	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053506175.10	1,525	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053509269.4	1,513	Proteína asociada a membrana tipo Tb-291

TABLA 5.4.2.1 Transcriptos cuya expresión se encuentra aumentada en respuesta a la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas. Se muestran los genes cuya expresión mostró un aumento de más de 2,8 veces ($\log_2 \geq 1,5$) en la cantidad e ARN polisomal de amastigotas sobreexpresando TcRBP19 hibridado con respecto al control.

Tal como se esperaba, el transcripto que aparece más aumentado en los transfectantes *pTEX-TcRBP19* con respecto al control *pTEX* vacío, es el transcripto que codifica para el ARNm *tcrbp19* que aparece aumentado en un FC de 3,23. A diferencia del análisis del transcriptoma de epimastigotas sobreexpresando TcRBP19, en este caso, se usó una lámina de microarreglo que sí contenía el gen *tcrbp19*. Entre los otros ARN mensajeros aumentados seleccionados se encuentra una proteína chaperona del tipo DNA J, una proteína oxidorreductasa con similaridad a miembros de la familia de oxidorreductasas glucosa-metanol colina (GMC), una proteína asociada a membrana tipo Tb-291 y dos proteínas de la familia génica DGF-1 (*dispersed gene family 1*), el resto son proteínas hipotéticas, la mayoría de ellas conservadas. Un análisis más detallado de las proteínas hipotéticas codificadas por los transcriptos aumentados pudo determinar similitudes con proteínas del HMG (*High Mobility Group*), una ARN metiltransferasa, una Ribonucleasa H III, una proteína con dominio dedo de Zinc del tipo C2H2 y dos proteínas similares a cisteín peptidasas. El resto de los transcriptos aumentados, codifican para proteínas hipotéticas sin homología con proteínas o dominios conocidos. De estas 7 proteínas hipotéticas, 4 son conservadas.

Mediante análisis de ontología por *Blast2GO* [411] sobre los 16 ARNm aumentados por la sobreexpresión de TcRBP19, sólo se pudo asignar un término *Componente Celular* asociado para 3 transcriptos donde se encuentran dos proteínas celulares en general y una proteína unida a membrana de organelo. Por otro lado, a nivel de *Función Molecular*, donde se asignaron términos GO a 7 transcriptos, se definen 2 grupos, uno de ellos compuesto por proteínas con función catalítica y otro grupo con proteínas de unión. Entre las proteínas de unión se encuentran proteínas con función de unión a iones, a ácidos nucleicos, a otras proteínas y a cofactores. El

grupo de proteínas con función catalítica incluye proteínas con actividad transferasa y con actividad oxidorreductasa. Por último, a nivel de *Proceso Biológico* se asignaron término GO a 5 transcritos observándose una agrupación de los mismos en 3 grupos. Estos grupos comprenden proteínas que participan en procesos celulares en general, procesos metabólicos y procesos de respuesta a estímulos (FIGURA 5.4.2.1).

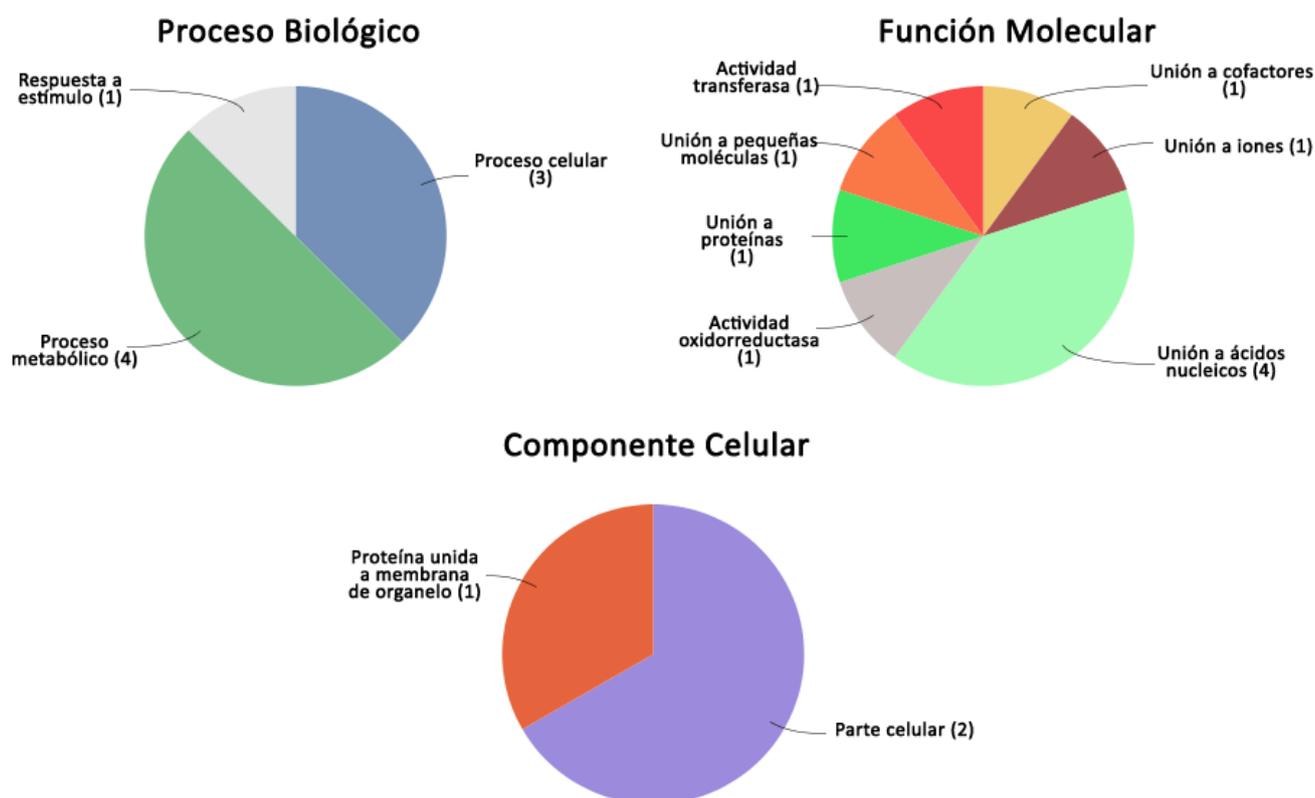


FIGURA 5.4.2.1 Análisis por Blast2GO de las secuencias de los transcritos que resultan aumentados en respuesta a la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas de *T. cruzi*. Se muestran los gráficos de distribución de secuencias de las tres categorías: *Proceso Biológico*, *Función Molecular* y *Componente Celular*.

Dado que se pudo clasificar muy pocos genes y que además, estos se encuentran dispersos en diferentes categorías, no fue posible establecer la existencia de un agrupamiento funcional de los genes afectados. Sin embargo, llama la atención la alta proporción de genes que codifican para proteínas de unión a ácidos nucleicos. Este hecho podría estar sugiriendo una ubicación jerárquicamente alta en el rol funcional de TcRBP19.

En relación a los ARNm disminuidos como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas con respecto al control *pTEX*, se seleccionaron 9 transcritos cuya disminución con respecto al control tiene un valor de FC menor a -1,5 (TABLA 5.4.2.2). De estos 9 ARNm seleccionados, 6 codifican para proteínas hipotéticas conservadas, 1 codifica para una subunidad del complejo Arp2/3, aparece también una enzima de la vía de la glicólisis, la enolasa y una subunidad de la proteína condensina (subunidad 1).

Gen	Log2(FC)	Producto
Tc00.1047053420369.40	-2,011	proteína hipotética conservada
Tc00.1047053508817.110	-1,774	proteína hipotética conservada
Tc00.1047053412435.10	-1,729	proteína hipotética conservada
Tc00.1047053511807.250	-1,727	proteína hipotética conservada
Tc00.1047053511635.30	-1,608	Subunidad del complejo Arp2/3
Tc00.1047053506677.30	-1,535	proteína hipotética conservada
Tc00.1047053507777.20	-1,530	proteína hipotética conservada
Tc00.1047053509941.110	-1,514	Subunidad 1 condensina
Tc00.1047053504105.140	-1,507	Enolasa

TABLA 5.4.2.2 Transcriptos cuyo nivel se encuentra disminuído en respuesta a la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas. Se muestran los genes cuya expresión mostró un decaimiento de más de 2,8 veces ($\log_2 \leq -1,5$) en la cantidad e ARN polisomal de amastigotas sobreexpresando TcRBP19 hibridado con respecto al control.

Las condensinas son complejos proteicos conservados que unen los cromosomas y facilitan su segregación, reparación del ADN y regulación génica (revisado en [412,413]).

El rol central del complejo Arp2/3 en la regulación de la dinámica de la actina en el citoplasma ha sido descrito para una variedad de procesos celulares y del desarrollo [414,415]. En particular, el complejo Arp2/3 es uno de los mediadores más importantes del proceso de ensamblaje de actina [416]. El mismo consiste en dos proteínas que están estrechamente relacionadas en secuencia y conformación a la actina llamadas Arp2 y Arp3 y cinco proteínas incluyendo p41, p34, p21, p20 y p16 en humanos [417]. Existe evidencia que el complejo Arp2/3 puede también localizarse en el núcleo y participar en la regulación de la transcripción aparentemente regulando la polimerización de actina nuclear y la transcripción dependiente de la ARN Polimerasa II [418]. Otras funciones del complejo Arp2/3 incluyen su participación en la biogénesis y movilidad de las mitocondrias a través de su interacción con la proteína de unión al ARN Puf3p en levaduras [419]. Otros autores adjudican una función del complejo Arp2/3 en la movilidad del proteasoma en levaduras [420] y por supuesto una función del complejo Arp2/3 en diversos tipos de movilidad celular [421,422], incluyendo diversas etapas de la vía endocítica [423,424] y fagocítica [425], la cual es usada a menudo por diversos patógenos para penetrar exitosamente en las células [426].

Los análisis de ontología por *Blast2GO* sobre los 9 ARNm disminuídos en relación al control *pTEX* mostrados en la **TABLA 5.4.2.2** adjudican un término GO a pocos transcriptos en las tres categorías. A nivel de *Componente Celular* se agrupan los genes en 3 grupos: proteínas celulares en general, proteínas que forman parte de complejos macromoleculares y proteínas de organelos. Por otro lado, a nivel de *Proceso Biológico*, el programa

clasifica a los genes seleccionados en 4 grupos: proteínas que participan en procesos celulares en general, proteínas involucradas en procesos metabólicos, proteínas de organización/biogénesis de componentes celulares y proteínas de regulación biológica. En cuanto a la *Función Molecular*, se asignó término GO a dos transcritos: uno que codifica para una proteína con actividad liasa y otro para una proteína de unión a iones metálicos (FIGURA 5.4.2.2).

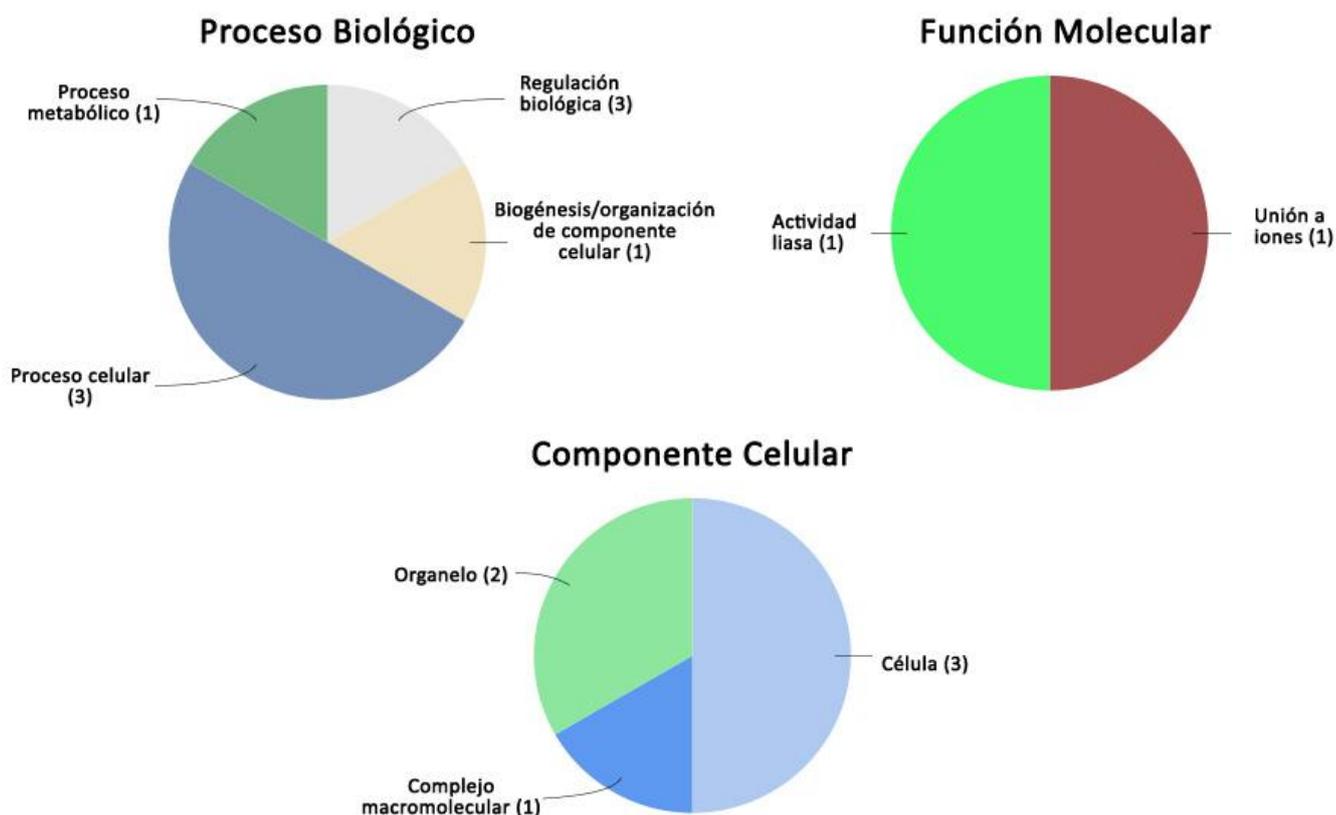


FIGURA 5.4.2.2 Análisis de ontología de los genes disminuídos como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19 en el estadio amastigota. Se muestra el agrupamiento de proteínas en las diferentes categorías: *Componente Celular*, *Proceso Biológico* y *Función Molecular*.

Se analizó el perfil de expresión de los genes seleccionados a lo largo del ciclo de vida del parásito utilizando datos disponibles del transcriptoma de los diferentes estadios de *T. cruzi* [408]. En la FIGURA 5.4.2.3 se muestra el perfil expresión de los genes cuyos ARNm resultan aumentados y en la FIGURA 5.4.2.4 el perfil de los genes que resultan disminuídos en su expresión como consecuencia de la expresión forzada de TcRBP19.

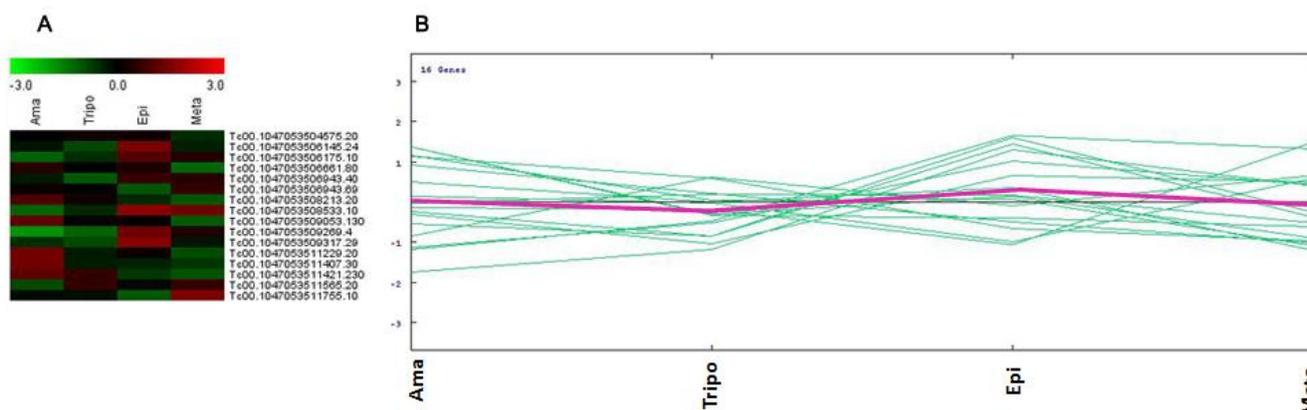


FIGURA 5.4.2.3 Datos de expresión de los transcritos aumentados como resultado de la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas. **A)** Mapa de calor mostrando la expresión en el ciclo de vida del parásito de los 16 genes aumentados seleccionados o sus alelos. **B)** Gráfico de expresión de dichos genes donde se representan los cuatro estadios de izquierda a derecha: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos. Se muestra con una línea rosa el patrón de expresión promedio de todos los genes. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa MultipleExperiment Viewer versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

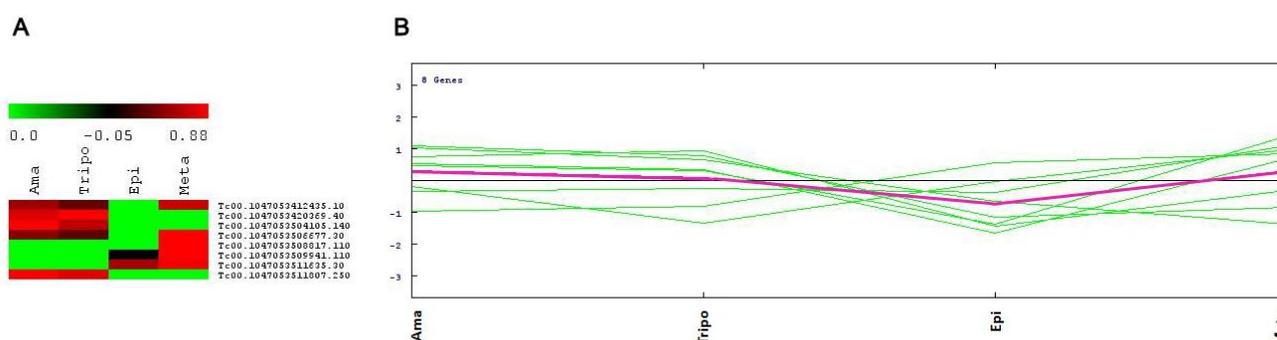


FIGURA 5.4.2.4 Datos de expresión de los transcritos disminuídos como resultado de la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas. **A)** Mapa de calor mostrando la expresión en el ciclo de vida del parásito de 8 de los 9 genes disminuídos seleccionados o sus alelos. **B)** Gráfico de expresión de dichos genes donde se representan los cuatro estadios de izquierda a derecha: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos. Se muestra con una línea rosa el patrón de expresión promedio de todos los genes. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa MultipleExperiment Viewer versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

Tanto los transcritos que se encuentran aumentados como los disminuídos pueden agruparse en subgrupos con patrones de expresión similares a lo largo del ciclo de vida lo cual sugiere que podrían estar sujetos a un tipo de regulación coordinada **FIGURA 5.4.2.5.**

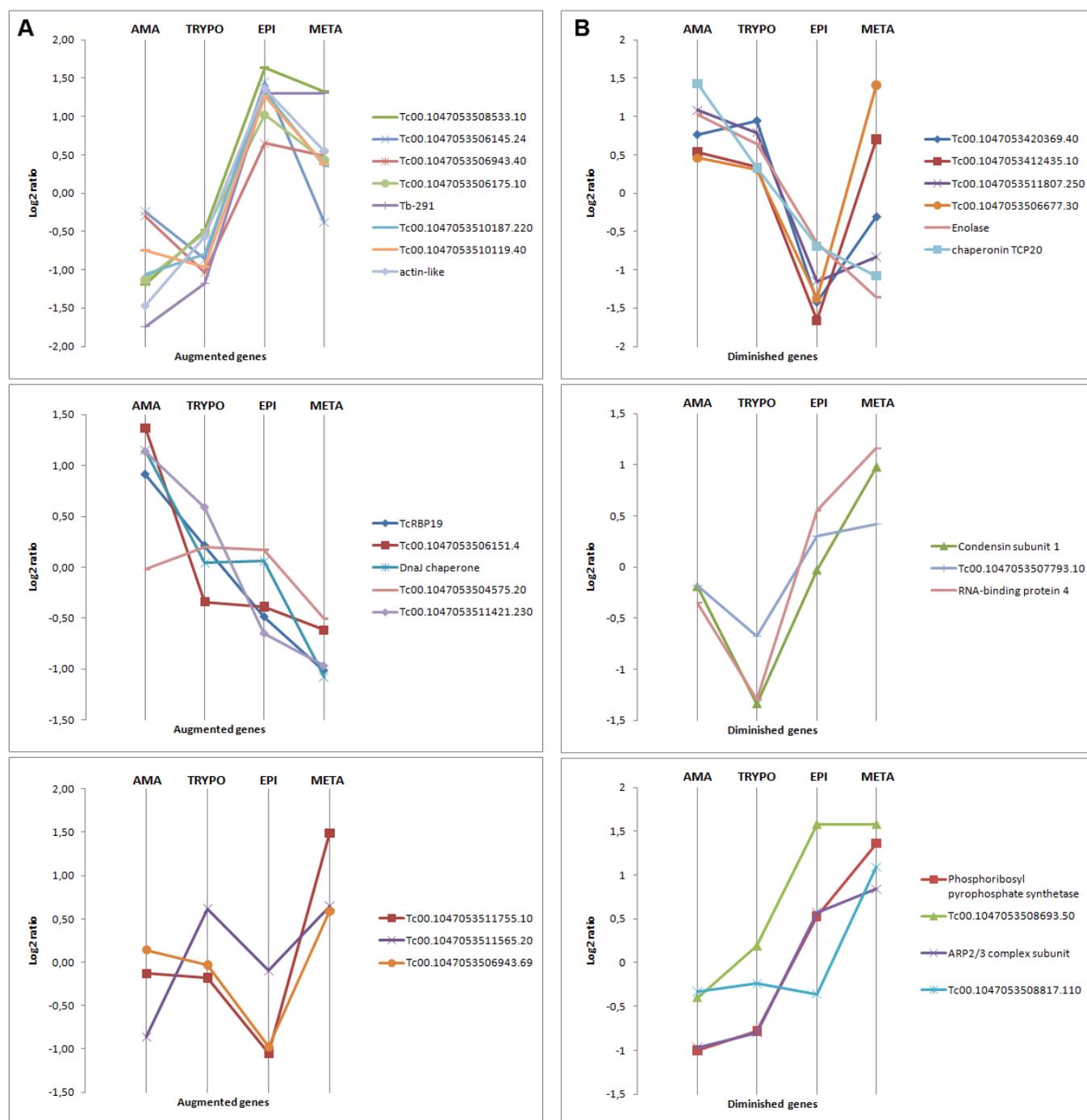


FIGURA 5.4.2.5 Agrupamiento de transcritos afectados como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas. Se muestran los patrones de expresión estadio específico disponibles en el trabajo de Minning y cols. [408] para los transcritos aumentados (A) y disminuidos (B) como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína TcRBP19 en amastigotas.

Todos los transcritos aumentados y disminuidos por la sobreexpresión de TcRBP19 en amastigotas, son genes de expresión diferencial a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi* (FIGURA 5.4.2.5).

En general, los resultados globales de análisis del transcriptoma de parásitos que sobreexpresan TcRBP19 comparado con parásitos control, indican que no existe correlación entre los transcritos que resultan afectados en el estadio epimastigota y amastigota, existiendo diferencias en la abundancia de los ARNs polisomales en ambos estadios. Este hecho podría ser el resultado de mecanismos específicos de procesamiento y/o desestabilización/estabilización de mensajeros que estarían actuando diferencialmente en ambos estadios del parásito. Dada la gran cantidad de proteínas hipotéticas seleccionadas, los datos de ontología no permiten asignar una función, proceso o compartimento celular común al grupo de genes afectados por la sobreexpresión de TcRBP19. Los datos de expresión disponibles indican que tampoco hay una correlación en la expresión de los transcritos afectados como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19.

5.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A TcRBP19

El estudio de las interacciones proteína-proteína es fundamental para entender cómo funciona una proteína en su contexto celular. Si bien cada proteína tiene alguna función “asignada” en la célula, su mecanismo de acción depende de la formación de complejos con otras proteínas formando redes que regulan innumerables procesos.

Para analizar los compañeros de acción de TcRBP19, decidimos abordar diferentes técnicas como inmunoprecipitación, GST *pull down* y cromatografías de afinidad. Dada la gran cantidad de material proteico de partida necesario para este tipo de experimentos, estos ensayos se realizaron en el estadio epimastigota, algo inviable de realizar en nuestro laboratorio con el estadio amastigota. Se utilizó la proteína recombinante GST-TcRBP19 acoplada a una columna de afinidad y extracto total de parásitos salvajes, o en el caso de las inmunoprecipitaciones, se utilizó un extracto proteico total de epimastigotas sobrexpresando TcRBP19.

5.5.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE TcRBP19 ACOPLADA A AFFI GEL-10™

Para identificar proteínas que interaccionan con TcRBP19 se adsorbió la proteína recombinante GST-TcRBP19 a un soporte de *Affi Gel-10™* en las condiciones descritas (ver 4.25.1). Brevemente, se empaquetó la matriz en una columna y se realizó una cromatografía de afinidad con extractos proteicos totales de epimastigotas de *T. cruzi*. Las proteínas retenidas fueron eluidas a concentraciones crecientes de KCl y analizadas en geles de SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata. Las bandas de interés fueron recortadas y sometidas a análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF usando el servicio UByPA del IPMont. Como control negativo se realizó el mismo experimento acoplando la proteína recombinante de fusión GST-Tc38, una proteína de unión a ácidos nucleicos específica de *T. cruzi* previamente caracterizada en nuestro laboratorio [427]. Las bandas comunes entre los dos experimentos fueron consideradas inespecíficas. Los espectros obtenidos no fueron de buena calidad, lo que hizo que los resultados no fueran concluyentes.

5.5.2 GST-PULL DOWN DE PROTEÍNAS

Los ensayos de GST-*pull down* de proteínas se realizaron con extractos proteicos totales de parásitos salvajes. Se incubaron dichos extractos con la proteína GST-TcRBP19 y luego de sucesivos lavados, se eluyeron los complejos resultantes de la interacción con TcRBP19. Dichas proteínas fueron precipitadas y separadas por SDS-PAGE. Las bandas diferenciales correspondientes a proteínas presentes en el *pull down* con la proteína GST-TcRBP19 y ausentes en el control con la proteína GST, fueron recortadas y sometidas a análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF usando el servicio UByPA del IPMont.

Los péptidos trípticos identificados en el análisis de espectrometría de masas fueron ingresados en el servidor Mascot para su identificación usando la base de datos del NCBI. En la **TABLA 5.5.2.1** se muestran las proteínas identificadas.

Proteína	Score	Cobertura (%)	Peso molecular teórico (Da)
β tubulina	217	30	49668
α tubulina	77	20	46927
Glutatión S-transferasa GST	69	32	29469
Histona H2B	215	51	12353
Histona H3	67	36	14753
Histona H4	128	32	11163

TABLA 5.5.2.1 Proteínas de epimastigotas salvajes retenidas por interacción con la proteína recombinante GST-TcRBP19. La identificación se realizó con el programa Mascot usando los siguientes parámetros: oxidación de Metioninas y carbamidometilación de Cisteínas como modificación variable; valores de masas monoisotópicas; Tolerancia de Péptidos de $\pm 0,05$ Da; Tolerancia de fragmentos de $\pm 0,8$ Da y permitiendo que la tripsina se saltee no más de un sitio de corte. En todos los casos se usaron datos de MS y MS/MS. *El Score corresponde a $-10^{\text{Log}(P)}$, donde P es la probabilidad de que el hallazgo de la proteína sea un evento al azar. Los scores mayores a 80 se consideraron significativos ($P < 0.05$).

Dado que TcRBP19 es una proteína de expresión diferencial que no se expresa en niveles detectables en epimastigotas salvajes, a través de esta aproximación, solo estarían identificándose las interacciones que eventualmente tengan lugar con proteínas que se expresan en epimastigotas. Para identificar proteínas que interaccionan con TcRBP19 y que se expresan exclusivamente en amastigotas, debería repetirse el mismo experimento usando extractos proteicos totales de amastigotas salvajes. Esto no pudo ser posible debido a la limitante de obtener grandes cantidades de amastigotas en el laboratorio. Por tanto, las proteínas identificadas en la **TABLA 5.5.2.1** son el resultado del uso de una aproximación *in vitro* en la cual podrían observarse interacciones “forzadas”. Por este motivo y en forma complementaria, decidimos abordar la identificación de los compañeros de acción de TcRBP19 utilizando una estrategia *in vivo*.

5.5.3 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A TcRBP19 MEDIANTE AFINIDAD EN TANDEM: TAP-TAG.

Se utilizó el sistema de purificación en *tandem* de afinidad (TAP) [350]. La técnica consiste en la unión de la proteína de interés a dos TAGs (proteína A y CBP) y su posterior expresión en el organismo de *T. cruzi*, para luego preparar extractos y purificar los complejos formados *in vivo* mediante cromatografías de afinidad con los TAGs empleados. La combinación del TAP y el análisis por espectrometría de masas se ha utilizado con éxito en *T.*

brucei para la identificación de varios complejos proteicos (por ejemplo ver [161,195,428-433]). Para la expresión de proteínas fusionadas al TAG en *T. cruzi* se ha diseñado un vector episomal (*pTEX-TAP-tag* cedido por el Dr. Esteban Serra de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina) basado en el vector *pTEX* [349]. La ventaja de este sistema frente al *GST-pull down* radica en que se está evaluando la interacción *in vivo* de la proteína de interés con sus compañeros de acción. Este hecho reviste especial importancia en el caso supuesto de que TcRBP19 estuviera sometida a modificaciones *post*-traduccionales.

Se clonó en fase la proteína TcRBP19 al vector *pTEX-TAP-tag* y se secuenció en el servicio de secuenciación automática de Macrogen (Seúl, Corea) para verificar que el clonado hubiera quedado efectivamente en fase (FIGURA 5.5.3.1).

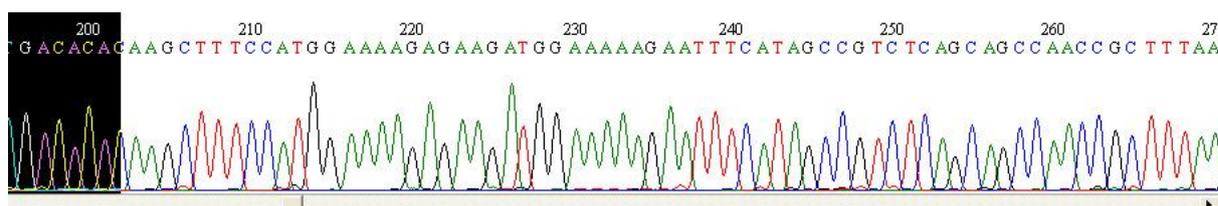


FIGURA 5.5.3.1 Secuencia nucleotídica del vector *pTEX-TcRBP19-TAP-tag*. El clonado en fase de TcRBP19 con la fusión proteína A-CBP fue confirmado por secuenciación automática. Se señala en negro el final de la secuencia codificante del gen *tcrbp19*.

Una vez confirmada la secuencia del vector, se transfectaron epimastigotas de *T. cruzi* (ver 4.21) y se seleccionaron los transfectantes. La verificación de la expresión de la proteína de fusión se realizó por *Western blot* con un anticuerpo anti-TcRBP19 y un anticuerpo anti-Proteína A (FIGURA 5.5.3.2).

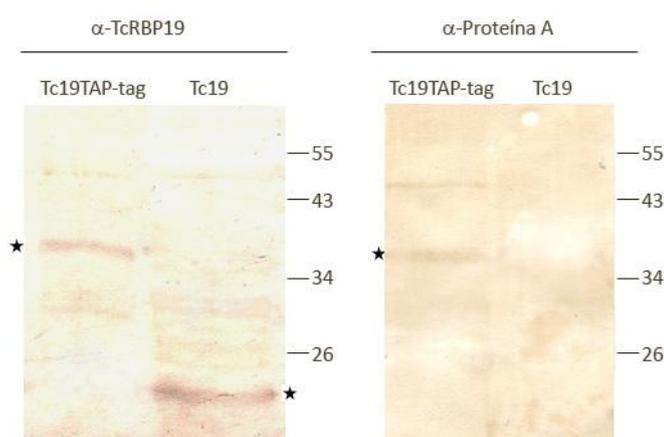


FIGURA 5.5.3.2 Expresión de la fusión TcRBP19-CBP-Proteína A en epimastigotas de *T. cruzi*. *Western blot* de extractos totales de parásitos transfectantes sobreescribiendo la proteína TcRBP19 (Tc19) y la fusión TcRBP19-TAP-tag (Tc19TAP-tag). Se muestra el resultado de la hibridación con un anticuerpo anti-TcRBP19 (α -TcRBP19) y

anti-Proteína A (α -Proteína A). Con un asterisco se marcan las bandas correspondientes a la fusión TcRBP19 con el *tag* Proteína A-CBP (≈ 38 kDa) y la proteína TcRBP19 (≈ 17 kDa).

Se usaron los extractos totales de transfectantes *pTEX-TcRBP19-TAP-tag* y se purificaron por afinidad los complejos proteicos. En una primera purificación, se acoplaron los complejos proteicos unidos a TcRBP19 fusionado a la proteína A-CBP en una columna de IgG Sefarosa. Luego de sucesivos lavados, las proteínas unidas a la fusión TcRBP19 fueron eluidas junto con TcRBP19 mediante incubación con la proteasa TEV. De esta forma, el CBP queda unido a la proteína TcRBP19 junto con el complejo y la proteína A queda retenida en la columna. En la segunda purificación, este último complejo es retenido en una columna de calmodulina Sefarosa. El propósito de las dos purificaciones en *tandem* es el de evitar interacciones inespecíficas. En nuestro caso, luego de la segunda purificación, no se recuperaron cantidades significativas de proteínas unidas a la fusión TcRBP19 por lo que solo se realizó la primera purificación. Sería interesante, y queda para un futuro, realizar este experimento partiendo de un número mayor de parásitos (por lo menos 5×10^{10} parásitos) para poder realizar las dos purificaciones sucesivas.

Como control negativo se utilizó una población de parásitos transfectados con el vector *pTEX-TAP-tag* vacío. Las bandas eluidas de la purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE y teñidas con plata. Las bandas diferenciales que no aparecían en el experimento control fueron purificadas y enviadas al Servicio del UByPA del IPMont para su análisis por espectrometría de masas. En la **TABLA 5.5.3.1** se muestran las tres proteínas de *T. cruzi* que pudieron ser identificadas, aunque solamente para una de ellas (cruzipaína) el *score* resultó significativo. Las otras dos proteínas que aparecen con un *score* no significativo igualmente fueron consideradas dado que si bien no se obtuvieron datos de MS/MS, la cobertura obtenida era buena y correspondían a proteína de *T. cruzi*.

Proteína	Score*	Cobertura (%)	Peso molecular teórico (Da)
Cruzipaína	112	33	42182
Adenilil ciclasa	70	31	22444
Factor de elongación 1- γ	45	43	11214

TABLA 5.5.3.1 Proteínas de epimastigotas que sobreexpresan TcRBP19 TAP-tag retenidas en columna de afinidad IgG Sefarosa. Se muestran tres proteínas de interacción con la proteína TcRBP19 fusionada al *tag* proteína A-CBP identificadas con el programa Mascot usando los siguientes parámetros: oxidación de Metioninas y carbamidometilación de Cisteínas como modificación variable; valores de masas monoisotópicas; Tolerancia de Péptidos de $\pm 0,05$ Da; Tolerancia de fragmentos de $\pm 0,8$ Da y permitiendo que la tripsina se saltee no más de un sitio de corte. En todos los casos se usaron datos de MS y MS/MS. *El *Score* corresponde a $-10^{\log(P)}$, donde *P* es la probabilidad de que el hallazgo de la proteína sea un evento al azar. Los *scores* mayores a 80 se consideraron significativos ($P < 0.05$). En gris se muestran los *scores* menores a 80 obtenidos para dos proteínas igual fueron considerados en el análisis.

5.5.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A TcRBP19

En forma paralela y alternativa al GST-pull down de proteínas y a las cromatografías de afinidad TAP-tag, se realizó otro abordaje para identificar proteínas de interacción con TcRBP19 *in vivo* mediante inmunoprecipitación. Dada la dificultad de obtener amastigotas puros en grandes cantidades requeridas para estas metodologías y que TcRBP19 se expresa en niveles no detectables en epimastigotas, estos experimentos fueron realizados con parásitos en estadio epimastigota donde se forzó ectópicamente la expresión de TcRBP19. Esta estrategia tiene ventajas sobre el GST-pull down por ser una aproximación *in vivo*. Además, es ventajosa sobre la metodología TAP-tag ya que en este caso, la proteína TcRBP19 se expresa sin fusionarse a grandes módulos proteicos, como ser proteína A-CBP, que resultan de mayor tamaño que la proteína misma. Estos voluminosos dominios adicionales podrían interferir impidiendo alguna modificación *post*-traduccional a la que podría estar sometida la proteína o con la interacción con otras proteínas en el parásito.

Para la inmunoprecipitación, se inmovilizó el anticuerpo anti-TcRBP19 en un soporte usando dos metodologías diferentes. Por un lado se usó una resina de proteína A Sefarosa. La columna proteína A Sefarosa-anticuerpo fue incubada durante toda la noche con un extracto total de *T. cruzi* correspondiente a 1×10^9 parásitos sobrexpresando TcRBP19. Como control, se realizaron en paralelo experimentos idénticos en los que se usó un anticuerpo policlonal anti-Tc38 [427]. Las bandas comunes entre los dos experimentos fueron consideradas inespecíficas.

Por otro lado, se usó el sistema *Dynabeads protein A*® para inmovilizar el anticuerpo anti-TcRBP19 a la proteína A (ver 4.25.2). En este caso, se incubó un extracto total de *T. cruzi* correspondiente a 1×10^9 parásitos sobrexpresando TcRBP19 y, por otro lado, se realizó el experimento con parásitos transfectantes *pTEX* control. Además, se realizaron los mismos experimentos con extractos totales de parásitos sobrexpresando TcRBP19 y parásitos control *pTEX* en presencia de un anticuerpo pre-inmune. Como control de la inmunoprecipitación, se realizó un *Western blot* con las diferentes fracciones obtenidas a fin de identificar la inmunoprecipitación de la proteína TcRBP19 (FIGURA 5.5.4.1).

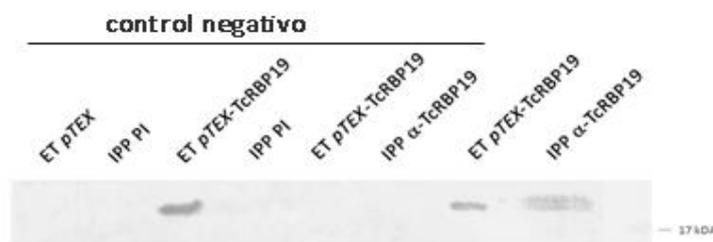


FIGURA 5.5.4.1 Control de inmunoprecipitación de TcRBP19 mediante el sistema Dynabeads™ Ensayo de *Western blot* de la inmunoprecipitación de proteínas totales de parásitos epimastigotas control (*pTEX*) y

sobrexpresando TcRBP19 (*pTEX*-TcRBP19) con anticuerpo anti-TcRBP19 (α -Tc19) o anticuerpo preinmune (PI). ET: extracto total; IPP: fracción proteica inmunoprecipitada por el anticuerpo indicado.

Luego de analizar la electroforesis de proteínas, las bandas diferenciales presentes en las muestras provenientes de la inmunoprecipitación de parásitos sobrexpresando TcRBP19 y ausentes en los controles fueron analizadas mediante espectrometría de Masas Maldi-TOF en el UByPA del IPMont. El análisis de péptidos resultantes en el servidor Mascot permitió identificar las proteínas que se listan en la **TABLA 5.5.4.1**. En todos los casos se usaron datos de MS y MS/MS.

Proteína	Score*	Cobertura (%)	Peso molecular teórico (Da)
Prostaglandin F2 α sintasa (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	112	33	42182
Deshidrogenasa (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	134	38	42258
β -tubulina (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	293	41	49668
Tirosín aminotransferasa (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	125	26	46123
Piruvato fosfato diquinasa 1 (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	179	32	100749
α -tubulina (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	214	49	49768
Tc52 tiol transferasa (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	92	17	48914
Factor de elongación 2 (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	146	24	94129
Triparredoxina peroxidasa (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	83	11	25490

TABLA 5.5.4.1 Proteínas presentes en el inmunoprecipitado de proteínas totales de epimastigotas que sobrexpresan TcRBP19 con anticuerpo anti-TcRBP19. La identificación se realizó con el programa Mascot usando los siguientes parámetros: oxidación de Metioninas y carbamidometilación de las Cisteínas como modificación variable; valores de masas monoisotópicas; Tolerancia de Péptidos de $\pm 0,05$ Da; Tolerancia de fragmentos de $\pm 0,8$ Da y permitiendo que la tripsina saltee hasta un sitio de corte. *El Score corresponde a $-10^{\text{Log}(P)}$, donde P es la probabilidad de que el hallazgo de la proteína sea un evento al azar. Los scores mayores a 80 se consideraron significativos ($P < 0.05$).

Los espectros obtenidos a partir de las bandas recortadas de geles de poliacrilamida resultaron ser bastante complejos de analizar pues en cada banda había varias proteínas que resultaban en una mezcla de diferentes péptidos. Este hecho hace que en la identificación de los mismos, puedan perderse ciertas proteínas de interacción con TcRBP19 que quedarán enmascaradas. Para tener una mejor resolución y obtener proteínas aisladas, las proteínas inmunoprecipitadas junto a TcRBP19 fueron analizadas en geles bidimensionales. Los geles bidimensionales han sido el método de elección en la detección, caracterización y cuantificación de proteínas [434-436]. En la electroforesis de geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE), las proteínas son separadas por isoelectroenfoque en la primera dimensión y por SDS-PAGE en la segunda dimensión. Dado que las

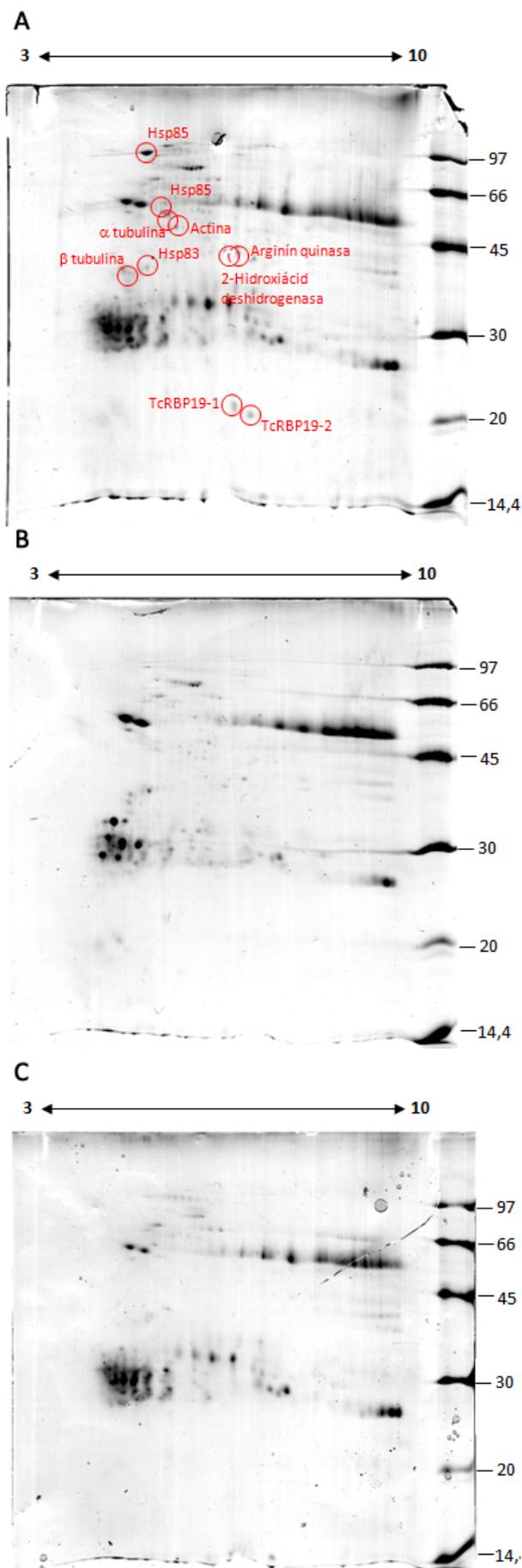
proteínas se separan por punto isoeléctrico y por tamaño en general se ve cada proteína como una mancha o *spot* único en el gel.

Se realizó la inmunoprecipitación con el sistema *Dynabeads protein A*[®] inmovilizando el anticuerpo anti-TcRBP19 utilizando extractos proteicos totales correspondientes a 1×10^9 parásitos sobrexpresando TcRBP19. Se realizaron dos controles, por un lado se realizó el mismo experimento usando la misma cantidad de parásitos control transfectados con el vector *pTEX* vacío y por otro lado se realizó la inmunoprecipitación con anticuerpo pre-inmune usando extractos de parásitos sobrexpresando TcRBP19. Las proteínas inmunoprecipitadas con este sistema fueron sometidas a geles bidimensionales, servicio ofrecido por la UByPA del IPMont. Para la primera dimensión, se usaron tiras con un rango de pH entre 3 y 10. La segunda dimensión se realizó en un minigel SDS-PAGE al 12,5% (**FIGURA 5.5.4.2**).

Se recortaron los *spots* diferenciales presentes en los geles correspondientes a la inmunoprecipitación con parásitos sobrexpresando TcRBP19 y ausentes en los controles, para ser analizadas en el espectrómetro de Masas Maldi-TOF en el UByPA del IPMont. Se identificaron las proteínas que se listan en la **TABLA 5.5.4.2**. En todos los casos se usaron datos de MS y MS/MS.

PÁGINA SIGUIENTE:

FIGURA 5.5.4.2 Geles bidimensionales de la inmunoprecipitación de TcRBP19 con el sistema *Dynabeads protein A*[®]. **(A)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-TcRBP19 usando extractos totales de parásitos sobrexpresando TcRBP19. **(B)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-TcRBP19 usando extractos totales de parásitos control transfectados con el vector *pTEX* vacío. **(C)** Inmunoprecipitación con anticuerpo pre-inmune usando extractos totales de parásitos sobrexpresando TcRBP19. Los geles fueron teñidos con Coomassie. Se señalan en rojo las proteínas correspondientes a los *spots* recortados y sometidos a espectrometría de masas Maldi-TOF. Marcador de Peso molecular: *Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare).



Proteína	Score*	Cobertura (%)	Peso molecular teórico (Da)
TcRBP19	167	50	17235
HSP85	598	42	80707
HSP83	159	39	33942
2-hidroxiacid-deshidrogenasa	339	67	38486
Cadena corta 3-hidroxiacil-Coa deshidrogenasa	121	7	35509
Arginín-quinasa	90	20	40458
α tubulina	158	28	49768
β tubulina	182	33	49630
Actina	254	55	42201

TABLA 5.5.4.2 Proteínas presentes en el inmunoprecipitado con proteínas totales de epimastigotas que sobreexpresan TcRBP19 con anticuerpo anti-TcRBP19. La identificación se realizó con el programa Mascot usando los siguientes parámetros: oxidación de Metioninas y carbamidometilación de las Cisteínas como modificación variable; valores de masas monoisotópicas; Tolerancia de Péptidos de $\pm 0,05$ Da; Tolerancia de fragmentos de $\pm 0,8$ Da y permitiendo que la tripsina saltee hasta un sitio de corte. *El Score corresponde a $-10^{\text{Log}(P)}$, donde P es la probabilidad de que el hallazgo de la proteína sea un evento al azar. Los scores mayores a 80 se consideraron significativos ($P < 0.05$).

En la **FIGURA 5.5.4.2** se observan dos *spots* que corresponden a TcRBP19 (TcRBP19-1 y TcRBP19-2) indicando que dicha proteína estaría sometida a alguna modificación *post*-traduccional que altera el punto isoeléctrico y el peso molecular de la misma. El hecho que TcRBP19 se presente en la célula en dos isoformas, no había sido constatado en electroforesis en geles 1D lo cual sugiere que dicha modificación no altera significativamente el tamaño de la misma. En el espectro de la tripsinización de TcRBP19-2, se genera un péptido extra correspondiente a TcRBP19 que no está presente en el espectro para TcRBP19-1 (**FIGURA 5.5.4.4**). Se realizó la fragmentación de dicho péptido con el fin de identificar la modificación que hace la diferencia en la migración en los geles 2D pero los datos de MS/MS resultantes no fueron concluyentes. Los otros picos no señalados en el espectro de TcRBP19-1 que no aparecen en TcRBP19-2 corresponden a la fragmentación de la tripsina y a queratina humana.

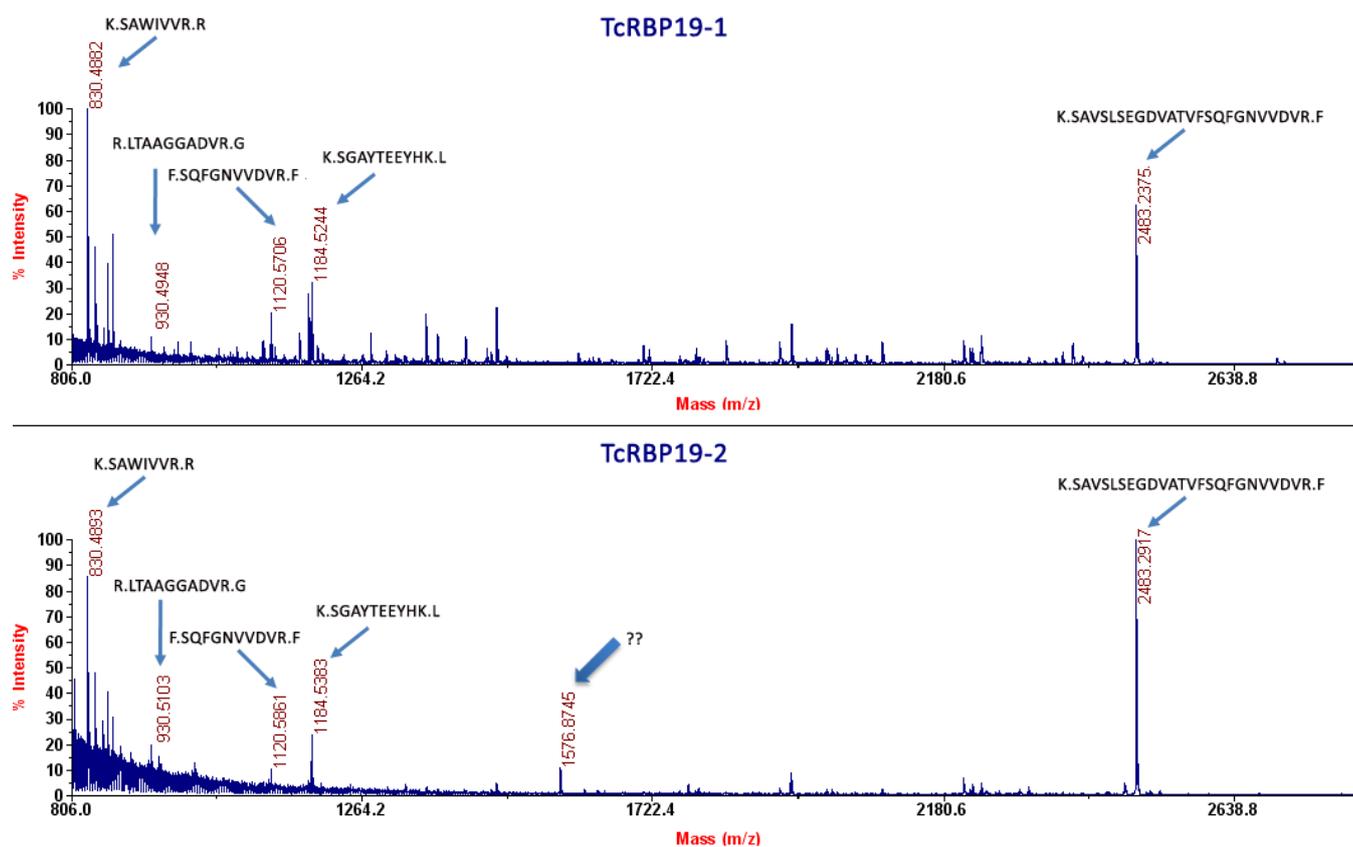


FIGURA 5.5.4.4 Espectro MALDI-TOF MS de los *spots* correspondientes a las dos isoformas de la proteína TcRBP19: TcRBP19-1 (parte superior) y TcRBP19-2 (parte inferior). Los espectros fueron obtenidos en modo Reflector Positivo. Se señalan los picos y sus péptidos correspondientes identificados por fragmentación de iones. Con una flecha gruesa se indica el pico diferencial entre ambas proteínas que no corresponde ni a queratina ni a tripsina.

El significado de esta modificación es incierto y algunas opciones son posibles. Por un lado, se puede interpretar que la sobreexpresión conlleva a mecanismos de modificación tendientes a degradar la proteína. El hecho de tratarse de una proteína que está siendo expresada ectópicamente, podría desencadenar que el “exceso” de la misma fuera marcada para degradación para evitar concentraciones de proteína altas que resulten tóxicas para la célula. Por otra parte, podría tratarse de una modificación con sentido fisiológico que resulta limitada en el contexto de la sobreexpresión. Es tentador especular que esta modificación podría a su vez modular la funcionalidad de TcRBP19 así como también la interacción con otros compañeros de acción.

5.5.5 RESUMEN DE LAS POSIBLES INTERACCIONES DE TcRBP19 CON PROTEÍNAS DE EPIMASTIGOTAS

Los datos obtenidos con las diferentes aproximaciones *in vitro* (GST-pull down) e *in vivo* (Cromatografía de afinidad TAP-tag e inmunoprecipitación) se resumen en la **TABLA 5.5.5.1**. Las proteínas identificadas corresponden a probables compañeros de acción que se expresan en epimastigotas.

Proteína	ID	In vivo		In vitro	
		IPP 1D	IPP 2D	Tap- tag	GST-pull down
HSP85	Tc00.1047053507713.30		X		
HSP83	Tc00.1047053509643.139		X		
Piruvato fosfato diquinasa 1	Tc00.1047053506297.190	X			
2-hidroxiacido-deshidrogenasa	Tc00.1047053506263.10		X		
Cadena corta 3-hidroxiacil-Coa deshidrogenasa	Tc00.1047053509717.90		X		
Arginín quinasa	Tc00.1047053411235.9		X		
Adenilil ciclase	Tc00.1047053511893.30			X	
Tirosín aminotransferasa	Tc00.1047053510571.30	X			
Prostaglandin F2 α sintasa	Tc00.1047053508461.80	X			
Tc52 tiol transferasa	Tc00.1047053509105.70	X			
Triparredoxina peroxidasa	Tc00.1047053504839.28	X			
Cruzipaína	Tc00.1047053507537.20			X	
α tubulina	Tc00.1047053411235.9	X	X		X
β tubulina	Tc00.1047053506563.40	X	X		X
Actina	Tc00.1047053503419.30		X		
Histona H4	Tc00.1047053510351.31				X
Histona H3	Tc00.1047053507817.18				X
Histona H2B	Tc00.1047053506779.150				X
Factor de elongación de la traducción	Tc00.1047053510963.90/Tc00.1047053510275.180	X		X	
TcRBP19	Tc00.1047053508213.20		X		

TABLA 5.5.5.1 Proteínas identificadas como posibles compañeros de acción de TcRBP19 en epimastigotas a partir de las diferentes aproximaciones *in vivo* ó *in vitro* implementadas. Se indica con una cruz el experimento a partir del cual fueron identificadas las proteínas listadas. Las aproximaciones *in vivo* se realizaron en condiciones de sobrexpresión de la proteína TcRBP19.

Se analizaron los antecedentes de las proteínas identificadas aunque los resultados no fueran en general reproducibles por los diferentes métodos. Las mismas comprenden proteínas de choque térmico HSP83 y HSP85. Estas proteínas asisten al plegamiento, localización y degradación de proteínas para mantener la homeostasis proteica en respuesta a un estrés como consecuencia de un cambio de temperatura [437]. Este fenómeno podría tener que ver con el pasaje de un estadio del parásito a otro, ya que durante la diferenciación a lo largo de su ciclo de vida, *T. cruzi* debe atravesar dos hospederos que implican dos entornos de temperatura diferentes (28 y 37°C para el insecto vector y el mamífero respectivamente). Se ha reportado que en este proceso se inducen varias proteínas de choque térmico [438,439]. De hecho, análisis proteómicos durante la diferenciación de *T. cruzi* han revelado un aumento en la síntesis de HSP60, HSP70 y de las HSP70 y HSP90 mitocondrial [131]. Sin embargo, aún no está claro si la expresión aumentada de las HSP es parte del proceso de diferenciación en sí mismo o es un fenómeno asociado a la adaptación al nuevo entorno al que está sometido el parásito. De todas

formas, esta hipótesis se correlaciona con el hecho previamente descrito de que TcRBP19 tiene un rol en el ciclo de vida del parásito (ver 5.2). Dado que las HSP tienen también un rol en asistir en el ensamblaje de complejos proteicos, no se descarta la posibilidad que TcRBP19 sea parte de un complejo multiproteico.

Se identificaron también proteínas relacionadas con diferentes aspectos del metabolismo tales como deshidrogenasas, la enzima piruvato fosfato diquinasa, la arginín quinasa, la adenilil ciclasa y la tirosín aminotransferasa así como proteínas que participan en el metabolismo oxidativo del parásito como ser la prostaglandin α sintasa, la Tc52 y la triparredoxina peroxidasa.

La piruvato fosfato diquinasa es una enzima glicosomal que cataliza la conversión reversible de fosfoenolpiruvato a piruvato en la glicólisis. La piruvato fosfato diquinasa de *T. cruzi* ha sido caracterizada como una proteína de ≈ 100 kDa y un punto isoelectrico de 8,4 que se expresa en los estadios epimastigota, tripomastigota y amastigota del parásito [440,441]. Dado que esta enzima no está presente en mamíferos pero sí en tripanosomátidos, la misma ha sido propuesta como un nuevo blanco quimioterapéutico para tratamiento de la enfermedad de Chagas [442]. Hasta el momento ningún reporte en la literatura, ha descrito que esta proteína tenga algún rol en el ciclo de vida de *T. cruzi* o en la interacción con otras proteínas de unión al ARN o con el ARN mismo.

La proteína arginín quinasa es una enzima involucrada tanto en proveer energía al parásito a través de la formación de fosfoarginina como en mecanismos de respuesta al estrés nutricional y de pH [443]. El hecho que esta proteína sufra un aumento de expresión en condiciones de estrés podría llevar a pensar que también aumenta su expresión en los estadios del parásito en que está sometido a condiciones de estrés, por ejemplo cuando penetra en la célula en la vacuola parasitófora. Dicha proteína se localiza en el citosol en *foci* discretos [444] y también constituye un interesante blanco quimioterapéutico dado que no está presente en tejidos de mamíferos.

La adenilil ciclasa es otra de las proteínas que precipita con TcRBP19 en estas condiciones. Se ha descrito una función en la regulación de la división celular para esta proteína en *T. brucei* [445]. Por otro lado, se ha visto un aumento en las concentraciones de AMPc en el proceso de invasión de *T. cruzi* a la célula hospedera [49,446,447]. Este hecho junto con la observación de una disminución en la capacidad de infectar células por parte de parásitos sobreexpresando TcRBP19 llevan a plantear la hipótesis de que la probable interacción de TcRBP19 con la adenilil ciclasa resulta en una inhibición de la función de la adenilil ciclasa de parte de TcRBP19.

La tirosín aminotransferasa es una enzima que cataliza la transaminación de tirosina y otros aminoácidos aromáticos y que también se asocia con la resistencia del parásito al estrés oxidativo contribuyendo con su supervivencia dentro de la célula hospedera [448,449].

Finalmente, mediante este tipo de metodologías se identificaron proteínas con función oxidoreductasa tales como la prostaglandin F2 α sintasa, la Tc52 y la triparredoxina peroxidasa como posibles candidatos de interacción con TcRBP19.

La prostaglandin F2 α sintasa es una NAD(P)H flavín oxidoreductasa que cataliza la síntesis de prostaglandina F2 α y la reducción de algunas drogas tripanocidas [450]. La proteína Tc52 comparte propiedades estructurales y funcionales con las proteínas de la familia tiorredoxina y glutarredoxina implicadas en reacciones redox que involucran tioles. Estudios inmunológicos han demostrado que la Tc52 es una proteína considerada un factor de virulencia en *T. cruzi* [75,451]. La triparredoxina peroxidasa, al igual que la Tc52 y la prostaglandin F2 α sintasa [452], cumple un rol en la detoxificación del parásito frente a especies reactivas de oxígeno que se expone el parásito al invadir la célula hospedera [453-455]. La interacción de TcRBP19 con la triparredoxina peroxidasa fue analizada por *Western blot*. En este caso, contábamos con un anticuerpo policlonal anti-triparredoxina peroxidasa citoplásmica cedido por la Mag. M^a Laura Chiribao del IPMont (**FIGURA 5.5.5.1**). Mediante esta técnica y en las condiciones ensayadas, no pudo confirmarse la interacción observada dado que no se detectó la presencia de triparredoxina peroxidasa en el inmunoprecipitado de TcRBP19.

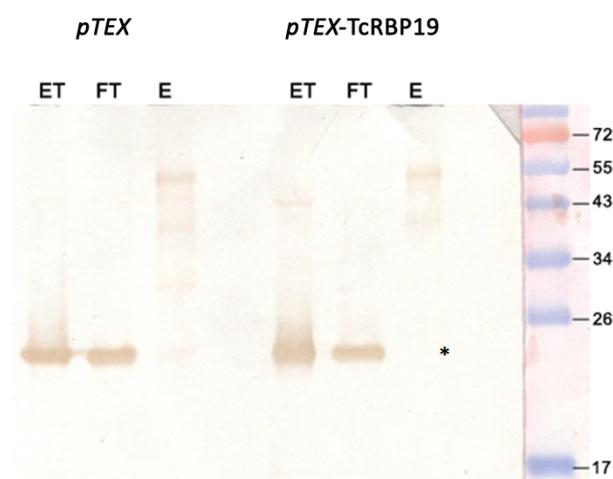


FIGURA 5.5.5.1 Análisis de la interacción Triparredoxina peroxidasa-TcRBP19. Ensayo de *Western blot* en la inmunoprecipitación con parásitos epimastigotas control (*pTEX*) y parásitos sobreexpresando *pTEX-TcRBP19*. ET: Extracto total; FT: Flow through; E: eluito. Con un asterisco se indica el lugar de la banda de triparredoxina peroxidasa esperada.

Otra proteína interesante candidata a interactuar con TcRBP19 es la cruzipaína. La cruzipaína es la principal cisteín proteasa de *T. cruzi* y juega un rol muy importante en la invasión a la célula hospedera además de participar en los mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero [67,456].

Según los datos de espectrometría de masas, TcRBP19 interactuaría también con α y β tubulina y con actina. Los heterodímeros de α/β tubulina son la unidad estructural que forma los microtúbulos, componentes básicos del citoesqueleto de las células eucariotas junto con la actina. Los microtúbulos son importantes en la movilidad celular ya que están presentes en cilios y flagelos [457], en división celular porque forman parte de las fibras del huso mitótico, en el transporte de complejos ribonucleoproteicos en la célula y en el establecimiento de la arquitectura celular que reviste especial interés en el proceso de invasión de la célula huésped por parte de parásitos [458,459].

Por otro lado, se identificaron Histonas como posibles candidatos a interactuar con TcRBP19. Este hecho llama la atención dado que estas proteínas son de localización nuclear y TcRBP19 se localiza en el citoplasma. De todas formas se ha reportado en *Plasmodium falciparum* que la histona H3 modificada por acetilación y metilación en aminoácidos específicos localiza en la vacuola parasitófora sugiriendo que dicha proteína ha evolucionado hacia una nueva función asociada directamente con la invasión del parásito y/o su interacción con la célula hospedera [460].

Es de señalar que son cada vez más las proteínas identificadas como proteínas “moonlighting”. Las proteínas moonlighting comprenden un grupo de factores multifuncionales en las cuales, una sola cadena polipeptídica cumple más de una función [461,462]. En levaduras por ejemplo, muchas proteínas con actividad de unión al ARN cumplen roles duales como enzimas metabólicas y RBPs a pesar de su falta de motivo de unión al ARN [256,463,464].

No se descarta la idea de que TcRBP19 pueda actuar promoviendo la traducción de ciertos ARNm blancos. Esta hipótesis se desprende de dos resultados obtenidos en este trabajo: la cosedimentación de TcRBP19 con fracciones polisomales pesadas, y los resultados de la inmunoprecipitación de dicha proteína con factores de elongación de la traducción.

Se analizó el perfil de expresión de los transcritos que codifican para las proteínas seleccionadas utilizando los datos de transcriptoma de Minning y cols. [408]. Para los casos que hay datos de transcripción, se aprecia un perfil similar de expresión aumentado en los estadios amastigota y epimastigota y disminuídos en estadios tripomastigota y metacíclico del parásito (**FIGURA 5.5.5.2**).

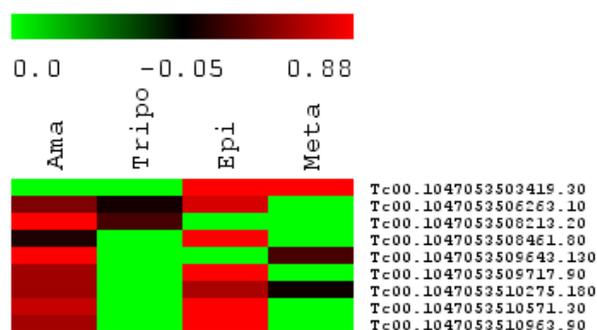


FIGURA 5.5.5.2 Datos de expresión de transcritos que codifican para las proteínas identificadas como posibles compañeras de acción de TcRBP19. Se muestra el mapa de calor mostrando la expresión los mismos o de sus alelos, en el ciclo de vida del parásito. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa MultipleExperiment Viewer versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

Con respecto a las proteínas prostaglandin F2 α sintasa, triparredoxin peroxidasa, hsp85 y arginín quinasa, es de destacar que en el análisis del transcriptoma de parásitos epimastigotas que sobreexpresan TcRBP19 se vio que sus correspondientes transcritos resultan aumentados en su expresión en un factor de FC ≥ 2 (TABLA 5.4.1.1). Por tanto, no queda claro si la interacción con TcRBP19 es el resultado del aumento del ARNm y el consiguiente aumento en la cantidad de proteína traducida, o si efectivamente existe una interacción funcional. Vale la pena señalar que por la metodología utilizada, no podemos asegurar si existe una interacción directa entre estas proteínas, o si la misma es mediada por otra proteína, e incluso por ARN.

Si bien con las diferentes aproximaciones se lograron identificar algunas proteínas, en muchos casos se obtuvieron masas trípticas que no coincidían con ninguna proteína de la base de datos de *T. cruzi*. Esto podría deberse a la presencia de modificaciones *post*-traduccionales que incluyen desde simples modificaciones tales como fosforilación y metilación hasta modificaciones más complejas como la glicosilación y sumoilación. Además, la interacción de TcRBP19 con las proteínas de la TABLA 5.5.5.1, deberá ser confirmada por otras técnicas a fin de descartar falsos positivos. Este tipo de interacciones proteína-proteína pueden ser confirmados mediante ensayos de doble híbrido en levadura, y si se dispone de un anticuerpo que reconozca la proteína de interacción con TcRBP19, podrían realizarse inmunoprecipitaciones cruzadas, co-localización por inmunofluorescencia, etc. [465].

En suma, se identificaron mediante espectrometría de masas algunas proteínas de interacción con TcRBP19, con un score significativo. Sin embargo se obtuvieron varios espectros trípticos que no pudieron asignarse a ninguna proteína conocida de T. cruzi. Esto puede deberse a modificaciones post-traduccionales que alteren el espectro esperado haciendo más difícil la identificación. Entre las proteínas identificadas, se elaboraron dos hipótesis que deben ser confirmadas. La primera propone la interacción de TcRBP19 con proteínas involucradas en la invasión y

supervivencia del parásito en la célula huésped y la segunda hipótesis adjudica un rol de TcRBP19 en la traducción de los ARNm en los polisomas interactuando con factores de elongación de la traducción. Finalmente, se vio que TcRBP19 podría estar sujeta a una modificación.

5.6 IDENTIFICACIÓN DE LOS ARN BLANCO DE UNIÓN DE TcRBP19

Según los resultados presentados anteriormente (ver 5.4), la sobreexpresión de TcRBP19 afecta una sub-población de ARNm aumentando o disminuyendo los niveles de los mismos en los estadios estudiados. Estos cambios, o algunos de ellos, podrían ser debidos a una interacción directa con la proteína. Sin embargo, es también posible que su aumento o disminución sea el resultado de una cascada regulatoria, desencadenada por TcRBP19 al regular unos pocos ARNms. Consideramos que la identificación de los ARN blanco de TcRBP19 constituye una aproximación poderosa para entender su rol funcional en el parásito.

El mapeo masivo de sitios blancos de proteínas de unión a ADN o ARN, se vio facilitado con el uso de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina o RBPs asociados a la metodología de microarreglos (ChIP-Chip o RIP-Chip) [466,467]. La integración de estos datos ha permitido la descripción de una compleja red transcripcional regulatoria que involucra grandes grupos de genes que controlan respuestas globales en programas fisiológicos y del desarrollo celular [468-470]. La ribonómica, identificación masiva de los ARN blanco de una RBP, puede incluir tanto la purificación por afinidad como la inmunoprecipitación, seguida del análisis de los ARNs asociados ya sea por hibridación con microarreglos de ADN (RIP-CHIP) o secuenciación masiva (RIP-Seq). El grupo de Keene y cols. [471] fue pionero en usar esta aproximación para estudiar ARNs asociados con tres RBPs en una línea celular de cáncer. Aunque usaron microarreglos de baja densidad, se pudo asociar a cada RBP distintos *sets* de ARNm presentes en un lisado celular total. Estos resultados llevaron a proponer la existencia de grupos de ARNs mensajeros que codifican para proteínas relacionadas formando “*operones post-transcripcionales*” o *regulones* [472]. Análogamente a los operones procariotas, este modelo predice que RBPs específicas pueden coordinar la expresión de grupos de ARNm que codifican para proteínas funcionalmente relacionadas en eucariotas. Existen varios trabajos que refuerzan esta hipótesis. Un ejemplo son las proteínas Pumilio-Fem-3 (PUF) en levaduras [289,473] que conforman una familia de RBPs estructuralmente emparentadas que regulan negativamente la expresión génica de ARNm específicos relacionados funcional o espacialmente [474]. Desde entonces, las aproximaciones ribonómicas están siendo usadas exitosamente para la caracterización de muchas RBPs [256,267-289,471,473,475-494]. Los resultados de estos trabajos validan la propuesta del modelo del operón *post*-transcripcional. Cada RBP analizada tiene un espectro de ARNs unidos que comprende entre 20 y más de 1000 transcritos diferentes, que a menudo comparten una funcionalidad relacionada. Cada uno de estos grupos de ARNs blanco se solapa parcialmente con el de otras RBPs, sugiriendo una unión combinatoria de diferentes RBPs a elementos específicos en un mismo ARNm. Usando herramientas bioinformáticas se pueden identificar elementos estructurales o secuencias compartidas entre los diferentes ARNs blanco.

Considerando estos antecedentes, decidimos proceder a realizar una aproximación ribonómica para identificar los ARNm unidos a TcRBP19, aproximaciones análogas fueron llevadas a cabo en paralelo para otras proteínas de unión a ARN en *T. cruzi* [329,333,335,495].

Para el análisis de los ARNs blancos de TcRBP19 se usó la metodología del GST-*pull down* usando la proteína recombinante GST-TcRBP19 acoplada a una columna de glutatión Sefarosa y el ARN total de parásitos salvajes (ver 4.28.2.1). Este ensayo se realizó por un lado con ARN total de **amastigotas**, el estadio en el cual se expresa TcRBP19. En paralelo, se analizó la interacción de GST-TcRBP19 con el ARN total de **epimastigotas**, el estadio del parásito que se cultiva de rutina en el laboratorio. En ambos casos, se realizó el experimento con la proteína GST acoplada a la columna como control negativo. Los ARNs capturados *in vitro* por la proteína, fueron identificados en un microarreglo de ADN en el cual se hibridó competitivamente el ARN capturado por TcRBP19 y el ARN no capturado.

Para ello, se amplificó el ARN retenido en la columna como consecuencia de su interacción con TcRBP19 y se marcó con Cy3. Por otro lado, se amplificó el ARN eluído, no retenido en la columna y se marcó con Cy5. Ambas poblaciones fueron usadas para hibridar competitivamente sobre microarreglo de ADN de *T. cruzi* (FIGURA 4.28.2.2).

5.6.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS ARNm QUE INTERACCIONAN CON TcRBP19 EN EPIMASTIGOTAS

Se realizaron dos experimentos independientes usando ARN total de epimastigotas. En cada uno de ellos se realizaron duplicados con los respectivos *dye swaps*. Se seleccionaron los genes retenidos por afinidad en la columna de glutatión Sefarosa enriquecidos en un FC de 2 ($\log_2 \geq 2$) para un experimento y en un factor de 3 para el segundo experimento¹. De esta manera, se identificaron 23 sondas que hibridaban con los transcritos purificados en los dos experimentos independientes y que no aparecían en el control realizado con GST (TABLA 5.6.1.1). De estos 23 transcritos, 15 codifican para proteínas hipotéticas, 13 de las cuales son proteínas conservadas. Aparecen también transcritos que codifican para: 1 proteína de superficie, 2 proteínas de unión a ácidos nucleicos, 1 proteína de choque térmico y algunas enzimas metabólicas.

Gen	Producto	PD1 Log2(FC)	PD2 Log2(FC)
Tc00.1047053507873.34	Proteína hipotética conservada	3,700	3,323
Tc00.1047053508213.20	TcRBP19	ND	2,524
Tc00.1047053507801.144	Proteína hipotética conservada	5,582	2,457

¹ La diferencia de criterio entre los dos experimentos de *pull down* (PD1 y PD2) se debe a que se usaron dos láminas de microarreglos diferentes para cada experimento tal como se describe en *Materiales y Métodos* 4.28.2.

Tc00.1047053506825.210	Proteína hipotética conservada	3,855	2,422
Tc00.1047053505945.80	Proteína hipotética conservada	4,362	2,270
Tc00.1047053511201.40	Proteína hipotética conservada	4,600	2,259
Tc00.1047053503673.18	Proteína hipotética conservada	4,804	2,209
Tc00.1047053506825.70	Proteína tipo treonina deshidratasa	4,414	2,198
Tc00.1047053511671.140	Proteína hipotética	4,516	2,185
Tc00.1047053509103.20	Tubulin-tirosín ligasa	5,034	2,151
Tc00.1047053506783.39	Proteína de superficie asociada a mucinas (MASP)	4,641	2,146
Tc00.1047053508909.200	Proteína hipotética	4,324	2,134
Tc00.1047053510651.10	Proteína hipotética conservada	4,196	2,125
Tc00.1047053506831.30	Proteína hipotética conservada	4,496	2,116
Tc00.1047053503527.40	Proteína de biosíntesis ancla GPI (GPI anchor)	4,898	2,106
Tc00.1047053508181.30	Proteína hipotética conservada	4,243	2,103
Tc00.1047053507513.50	Proteína de choque térmico hsp70kDa	6,890	2,103
Tc00.1047053508277.180	Proteína de reparación de <i>mismatch</i> MSH3	4,151	2,087
Tc00.1047053508545.20	Proteína hipotética conservada	3,830	2,078
Tc00.1047053510755.19	Proteína hipotética conservada	4,009	2,053
Tc00.1047053511753.90	Proteína hipotética conservada	3,649	2,037
Tc00.1047053511111.30	Proteína hipotética conservada	3,600	2,027
Tc00.1047053507611.370	Proteína disulfuro isomerasa	3,306	2,009

TABLA 5.6.1.1 ARNs de epimastigotas salvajes que copurifican con TcRBP19. Genes seleccionados a partir de la hibridación competitiva sobre microarreglo de ADN de *T. cruzi*, usando ARN total de epimastigotas retenidos en la columna de afinidad por la proteína de fusión GST-TcRBP19 *versus* ARN no retenido. Se muestran aquellos ARNs seleccionados en dos experimentos independientes.

Se realizaron análisis con el paquete de *software* MEME para identificar señales específicas reconocidas por TcRBP19 en los transcritos seleccionados. Para ello se usó el largo promedio de las 3'UTRs (264 nucleótidos) definido en el trabajo de Campos y cols. [496]. En este trabajo se investigaron los requerimientos a nivel de secuencia primaria implicados en el procesamiento del ARNm en *T. cruzi* en base a las EST disponibles (TcruziDB y NCBI) conteniendo en sus cola poliA y miniexón. Los autores determinaron un tamaño promedio de las regiones 5'UTR y 3'UTR en *T. cruzi* que resulta en 35 y 264 nucleótidos respectivamente (**FIGURA 5.6.1.1**). Estos tamaños concuerdan con varios estudios que revelan la presencia de secuencias regulatorias principalmente para la región 3'UTR [257,272,274,497]. Además, se estableció una distancia media entre los sitios de adición del miniexón y el tracto precedente de polipirimidinas (poliPy) que debe contener al menos 9 residuos permitiendo solo una purina interna de 18 nucleótidos (máx. 50 nts) y una distancia entre el sitio de adición de la cola poliA y el poliPy corriente abajo de 40 nucleótidos en promedio (máx. 100 nts). El sitio de poliadenilación debe encontrarse

rodeado de dos regiones ricas en poliPy. El primer trecho coincide con el sitio de poliadenilación y está compuesto principalmente por timinas seguido por una región con un aumento en el contenido de adeninas. Por otro lado el segundo trecho rico en poliPy se encuentra aproximadamente 100 nucleótidos corriente abajo del final del transcripto.

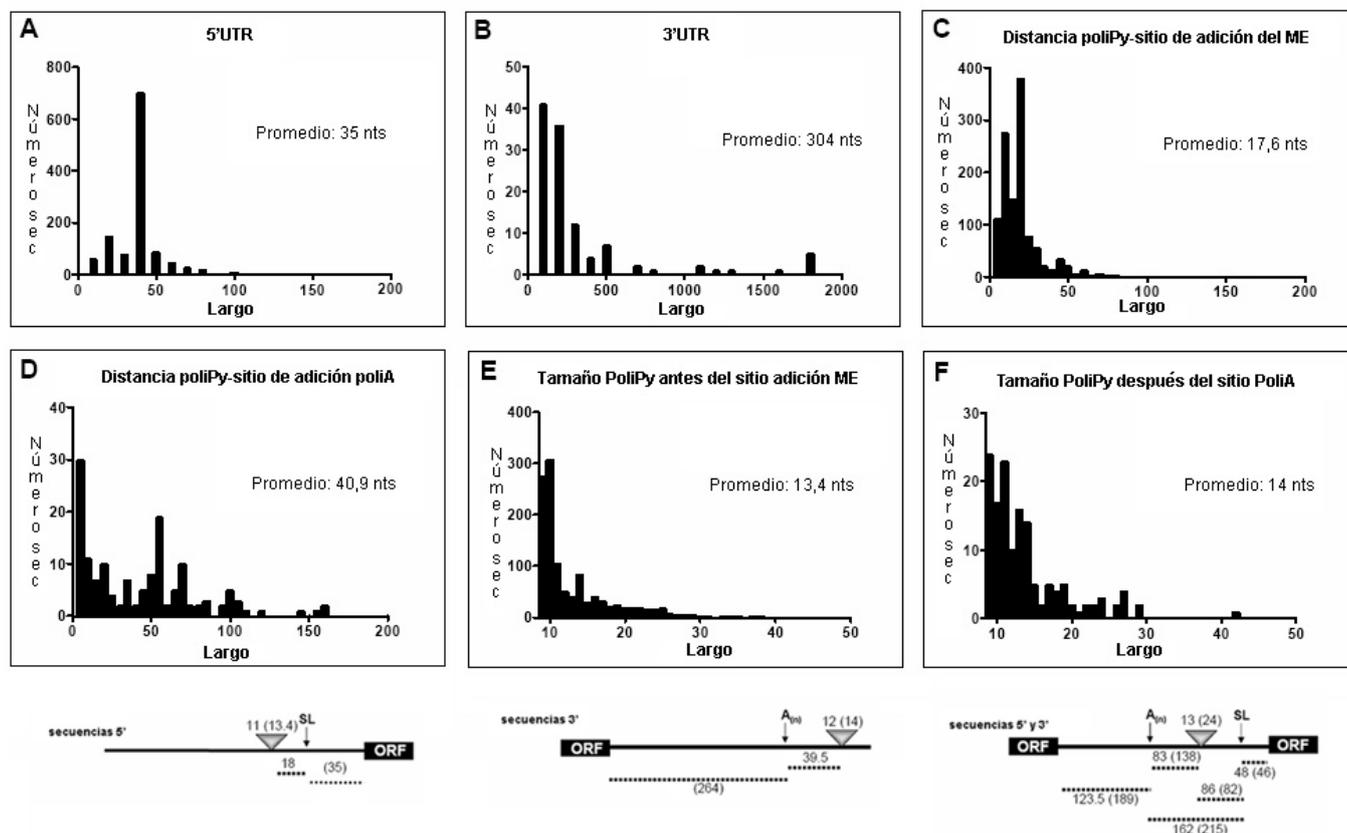


FIGURA 5.6.1.1 Tamaño promedio de las regiones 5' y 3' UTRs y distancias de señales de procesamiento de los ARNm de *T. cruzi* según Campos y cols. Los histogramas **A** y **B** muestran el largo de la distribución de diferentes regiones 5' y 3' UTR respectivamente. En **C** y **D** se muestran las distancias entre el trecho de poliPy y el sitio aceptor del miniexón corriente abajo, y las distancias entre el trecho de poliPy y el sitio de poliadenilación corriente arriba respectivamente. En los paneles **E** y **F** se muestran los largos de los motivos ricos en poliPy localizados corriente arriba del sitio de adición del miniexón y corriente abajo del sitio de poliadenilación respectivamente. Debajo, se representa esquemáticamente el procesamiento del ARN pre mensajero en *T. cruzi*. Los números bajo las líneas punteadas indican la mediana de los largos de las regiones 5'UTR, 3' UTR y regiones intergénicas. La mediana de las distancias desde el tracto de polipirimidinas hasta el sitio de adición del miniexón o del sitio de poliadenilación se indica por encima de las líneas punteadas. Los trectos de polipirimidinas se representan con un triángulo gris con un número arriba que denota su largo. Entre paréntesis se indica el valor de la media. ORF: marco abierto de lectura. SL: miniexón. (A)_n: sitio de poliadenilación. Tomado y modificado de Campos y cols. [496].

Con los parámetros de análisis utilizados en el análisis de MEME (tamaño ≥ 5 bases), se pudo identificar la presencia de un elemento conservado rico en U en estas regiones (**FIGURA 5.6.1.2**). Dicho motivo consta de 22 nucleótidos y aparece 27 veces en las secuencias 3'UTR en 15 de los 23 transcritos

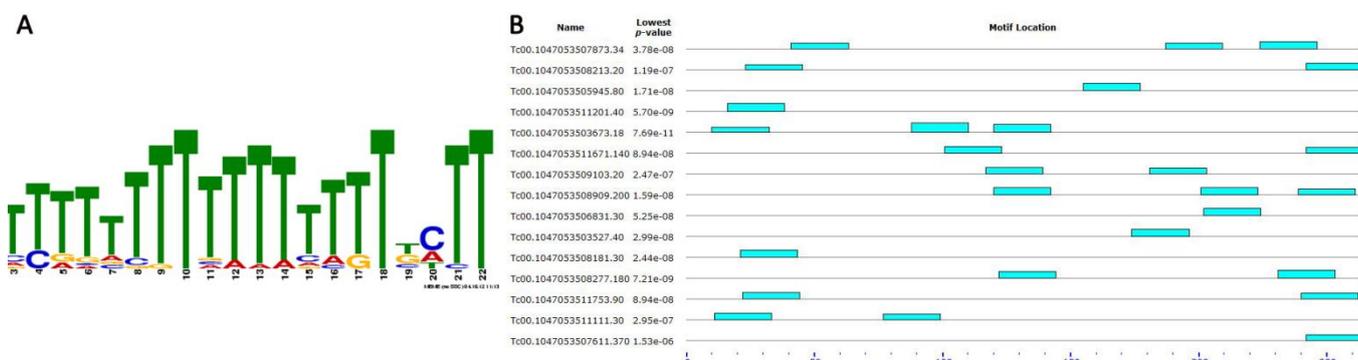


FIGURA 5.6.1.2 Motivos ricos en U/T presentes en las regiones 3'UTR de los ARN de epimastigotas capturados por TcRBP19. **(A)** Motivo consenso encontrado por el programa MEME (E value: $1,6 \times 10^{-40}$). El tamaño de cada letra representa la probabilidad de aparecer en cada posición indicada. **(B)** Con cajas celestes se representa la ocurrencia del motivo en las secuencias indicadas.

De los ARNm afectados en el perfil del transcriptoma de los epimastigotas sobreexpresando TcRBP19 solamente el ARNm que codifica para una HSP70 fue retenido directamente en los experimentos de *GST-pull down* (comparar **TABLA 5.6.1.1** con **TABLAS 5.3.1.1** y **5.3.1.2**). Esto sugiere que TcRBP19 estaría involucrada en algún proceso temprano en la regulación génica.

Los análisis de ontología por *Blast2GO* solo pudieron asignar un término GO a la mitad de los transcritos (**FIGURA 5.6.1.3**). En el análisis del *Proceso Biológico* se asignaron términos GO a 9 transcritos formando 4 grupos de proteínas involucradas en regulación biológica, proceso celular, proceso metabólico y respuesta a estímulos. A nivel de *Función Molecular* se asignaron términos GO a 11 transcritos seleccionados agrupándose en 2 grandes categorías: una de proteínas con actividad catalítica (dentro de las que se encuentran proteínas con actividad transferasa, actividad hidrolasa, actividad isomerasa, actividad ligasa y actividad oxidoreductasa) y otra categoría de proteínas de unión (tales como unión a cofactores, a ácidos nucleicos, y a pequeñas moléculas). Finalmente, el análisis a nivel de *Componente Celular* reveló información para únicamente 3 transcritos que codificaban para proteínas anotadas como componente celular, componente de membrana, componente de organelo y de organelo unido a membrana.

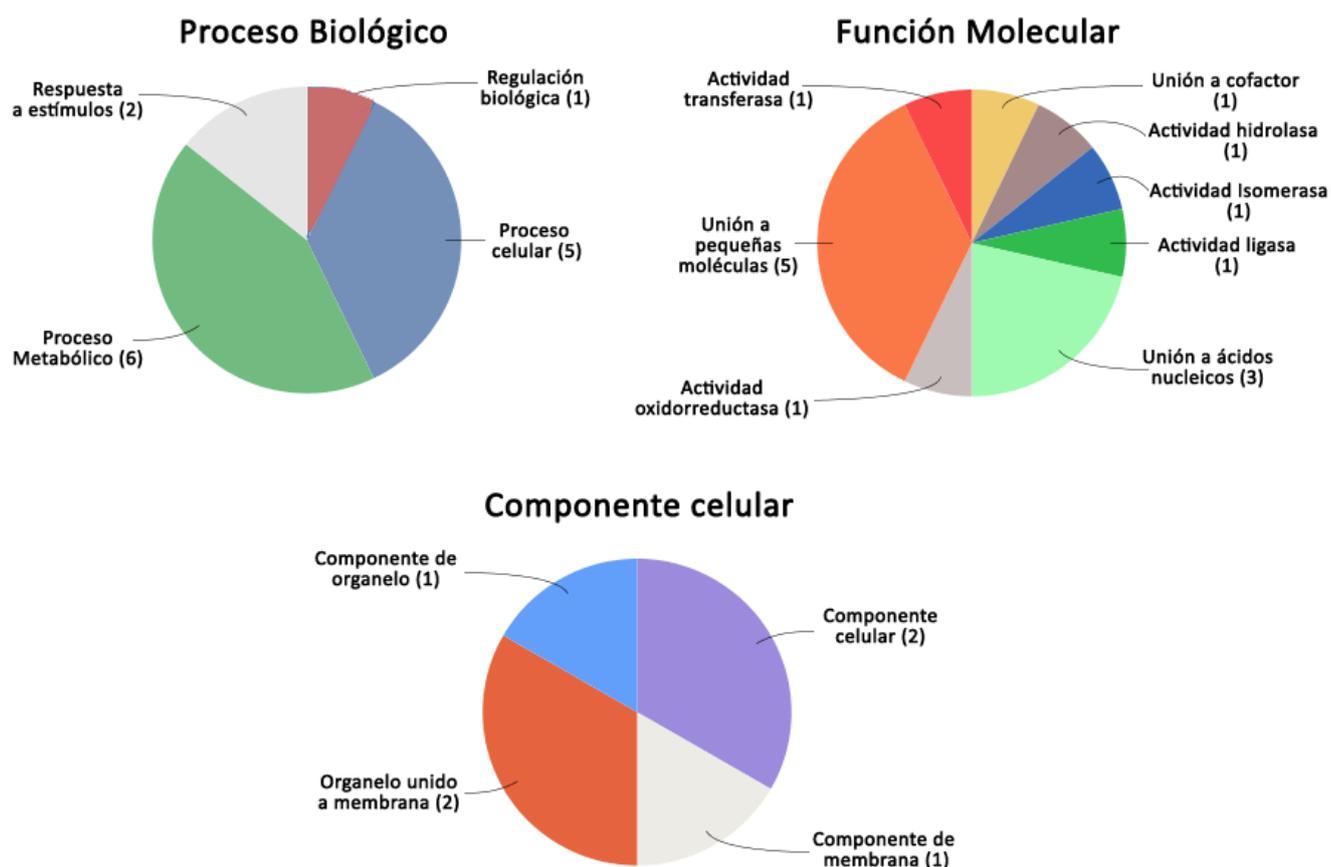


FIGURA 5.6.1.3 Análisis de ontología de los genes seleccionados en el GST-pull down con ARN de epimastigotas. Se muestra el agrupamiento de proteínas en las diferentes categorías: *Componente Celular*, *Proceso Biológico* y *Función Molecular*.

Probablemente, estos datos no permiten definir la existencia de algún operón *post*-transcripcional potencial [201] debido a la cantidad de transcritos que codifican para proteínas hipotéticas para las cuales no hay datos de ontología asignados.

Interesantemente, en un experimento de GST-pull down (PD2), fue retenido el ARNm que codifica para la proteína TcRBP19 (Tc00.1047053508213.20) aumentado en un FC de 2,5. Esto sugiere un mecanismo de auto-regulación de la expresión de la proteína TcRBP19. La ausencia del gen *tcrbp19* en la lámina de microarreglo de ADN usada para la hibridación en el PD1 justificaría la discrepancia.

Existen datos de expresión para 16 de los 23 ARNm seleccionados en el GST-pull down con ARN total de epimastigotas [408], los mismos se resumen en la **FIGURA 5.6.1.4**.

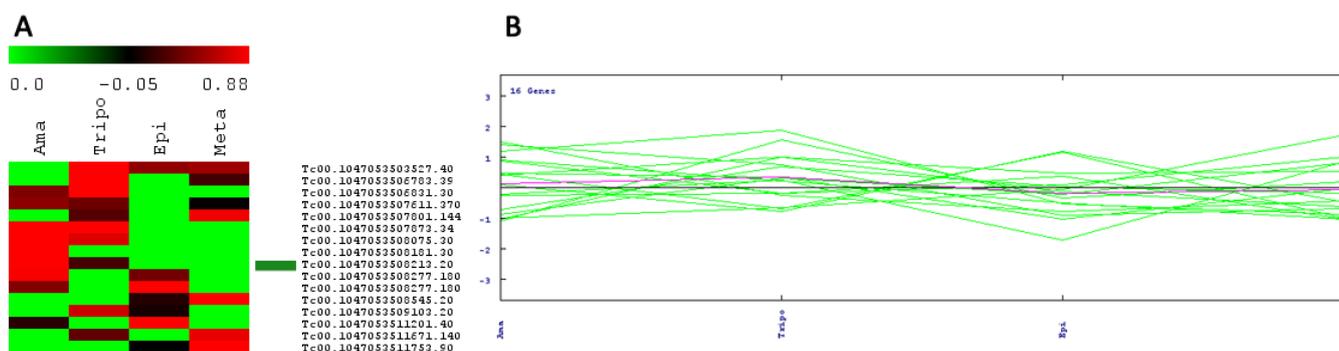


FIGURA 5.6.1.4 Datos de expresión de los transcritos retenidos en el GST-*pull down* con ARN total de epimastigotas salvajes. **A)** Mapa de calor mostrando la expresión en el ciclo de vida del parásito de 16 de los 23 ARNm capturados *in vitro* o sus alelos. La barra verde horizontal señala el gen que codifica para la proteína TcRBP19 que resulta aumentado cuando se sobreexpresa TcRBP19 en amastigotas. **B)** Gráfico de expresión de dichos genes donde se representan los cuatro estadios analizados por Minning y col, de izquierda a derecha: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa *Multiple Experiment Viewer* versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

Consideramos que el análisis de GST-*pull down* con ARN total del estadio epimastigota es una aproximación válida para identificar los ARNs que interactúan con TcRBP19, aún siendo esta una proteína que se expresa en amastigotas. Al no existir regulación a nivel de inicio de la transcripción para los genes que codifican proteínas, estos se transcriben constitutivamente. Por tanto, en el estadio epimastigota, se pueden encontrar ARNs que codifican para proteínas que se expresan mayoritariamente en otros estadios del parásito. Sin embargo, los mecanismos de regulación de la estabilidad de los mensajeros, podrían actuar en la célula lo suficientemente rápido como para que no se puedan detectar algunos ARNm blanco de TcRBP19 en este estadio. Por tanto, para no perder estos blancos estadio específicos de la proteína, se procedió a realizar el mismo ensayo en idénticas condiciones, pero esta vez con ARN total del estadio amastigota.

5.6.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS ARNm QUE INTERACCIONAN CON TcRBP19 EN AMASTIGOTAS

Se analizó la interacción *in vitro* de la proteína TcRBP19 con los ARNs en estadio amastigota usando la misma metodología descrita anteriormente para el GST-*pull down* con ARN de epimastigotas. Tal como se describió, se utilizó la proteína recombinante GST-TcRBP19 acoplada a una columna de glutatión Sefarosa y se amplificó el ARN retenido en la columna. Este ARN fue amplificado y luego marcado con los fluoróforos Cy3 o Cy5 para realizar la hibridación competitiva con el ARN no retenido en microarreglos. Este ensayo se realizó por cuadruplicado usando ARN total de amastigotas, cada uno con su respectivo *dye swap*. Se seleccionaron los transcritos enriquecidos en un FC mayor a 2,5 con respecto al ARN no unido. Con este criterio, se identificaron

14 sondas que hibridaban con los transcritos purificados en los cuatro experimentos independientes y que no aparecían en el control realizado con GST (TABLA 5.6.2.1).

Gen	Producto	PD3 Log2(FC)
Tc00.1047053508213.20	TcRBP19	8,9
Tc00.1047053510155.30	proteína hipotética, conservada	4,4
Tc00.1047053504035.84	Subunidad SDH11 del complejo mitocondrial II [353]	4,3
Tc00.1047053507981.40	proteína hipotética	4,0
Tc00.1047053506367.50	proteína hipotética, conservada	3,9
Tc00.1047053506825.210	proteína hipotética, conservada	3,6
Tc00.1047053509453.30	proteína tipo GCN5	3,6
Tc00.1047053506469.139	Homólogo Dph3 (ver texto)	3,3
Tc00.1047053506247.74	proteína hipotética, conservada	3,2
Tc00.1047053506419.69	proteína hipotética, conservada	3,0
Tc00.1047053506661.100	proteína hipotética, conservada	2,9
Tc00.1047053508545.20	proteína hipotética, conservada	2,9
Tc00.1047053507801.144	proteína hipotética, conservada	2,9
Tc00.1047053508737.194	Subunidad complejo ARP2/3	2,6

TABLA 5.6.2.1 ARNs de amastigotas salvajes que copurifican con TcRBP19. Se listan los genes seleccionados a partir de la hibridación competitiva sobre microarreglo de ADN de *T. cruzi*, usando ARN total de amastigotas retenidos en la columna de afinidad por la proteína de fusión GST-TcRBP19 versus ARN no retenido. Se muestra el resultado promediado de cuatro experimentos independientes.

Entre los ARNm unidos a TcRBP19, el representado con el *score* más alto es el que codifica para la proteína TcRBP19 sugiriendo, al igual que en el experimento PD2 con ARN de epimastigotas, que la proteína modula de alguna forma la expresión de su propio transcrito.

El **mecanismo de auto-regulación**, ha sido descrito para otras proteínas de unión al ARN que modulan diferentes procesos celulares. Por ejemplo, se ha reportado en células de mamífero que la proteína de unión a polipirimidinas (PTB) controla su propia expresión alterando el *splicing* del pre-ARNm que la codifica, lo que conlleva al decaimiento por el sistema NMD (*non sense mediated decay*) [498]. Existen otros reportes de proteínas RBP que autorregulan su procesamiento, tales como las proteínas hnRNP M [499] y Sl (*sex lethal protein*) en *Drosophila* [500] y la proteína tra2- β 1 [501] en humanos. Estas RBPs también se unen a sus respectivos pre-ARNm y alteran su *splicing*. Además de factores de *splicing*, otras RBPs modulan su propia

expresión afectando otros mecanismos, por ejemplo la proteína anexina A2 que se asocia con su ARNm afectando su traducción [502]. Otro ejemplo de auto-regulación, es la proteína TTP (tritetraprolina) en ratón que se une a su propio ARNm promoviendo su decaimiento [503] o la proteína AUF1, un factor de unión a secuencias ricas en AU, cuya expresión correlaciona con el decaimiento del ARNm que la codifica [504,505].

Búsquedas *in silico* de regiones conservadas en las regiones 3'UTR de los genes seleccionados mediante el *software* MEME, lograron identificar la presencia de un elemento conservado rico en U en estas regiones **FIGURA 5.6.2.1**. Este elemento es muy semejante al descrito para la región 3'UTR de los ARNm blanco identificados en epimastigotas. Para el análisis se consideraron regiones 3'UTRs de 264 nucleótidos siguiendo los criterios definidos por Campos y cols. [496]. El motivo encontrado consta de 22 nucleótidos y aparece 27 veces en las secuencias 3'UTR en 12 de los 14 transcritos reconocidos por TcRBP19.

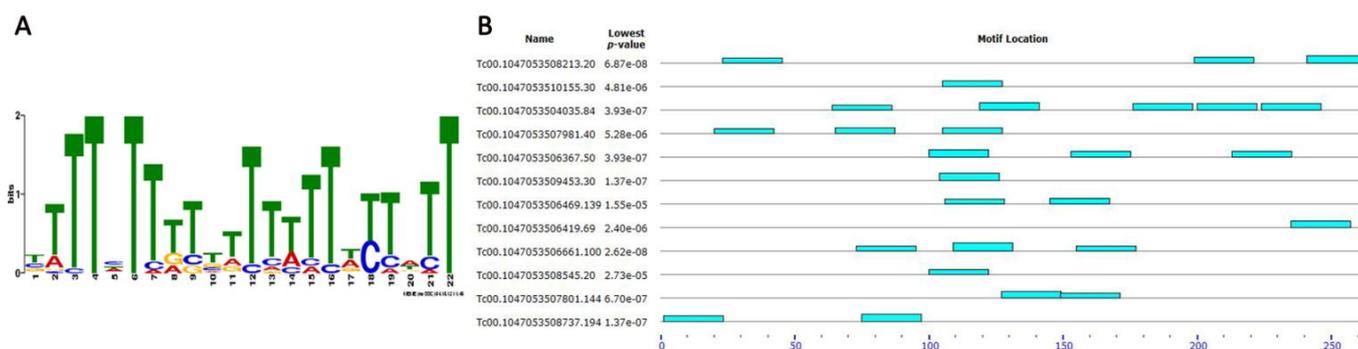


FIGURA 5.6.2.1 Motivos ricos en U/T presentes en las regiones 3'UTR de los ARN de amastigotas capturados por TcRBP19. **(A)** Motivo consenso encontrado por el programa MEME (E value: $3,4 \times 10^{-12}$). El tamaño de cada letra representa la probabilidad de aparecer en cada posición indicada. **(B)** Con cajas celestes se representa la ocurrencia del motivo en las secuencias indicadas.

Se realizaron análisis de ontología con el fin de encontrar agrupamientos correspondientes a una localización celular o función común de estos ARNm capturados por TcRBP19 *in vitro*. Al igual que anteriormente, se realizó un *Blast2GO* para buscar ontología génica [411]. De los 14 genes seleccionados en este *pull down* solo pudo asignarse un término GO a muy pocos genes clasificándose en categorías dispersas de *Función Molecular*, *Proceso Biológico* y *Componente Celular* (**FIGURA 5.6.2.2**).

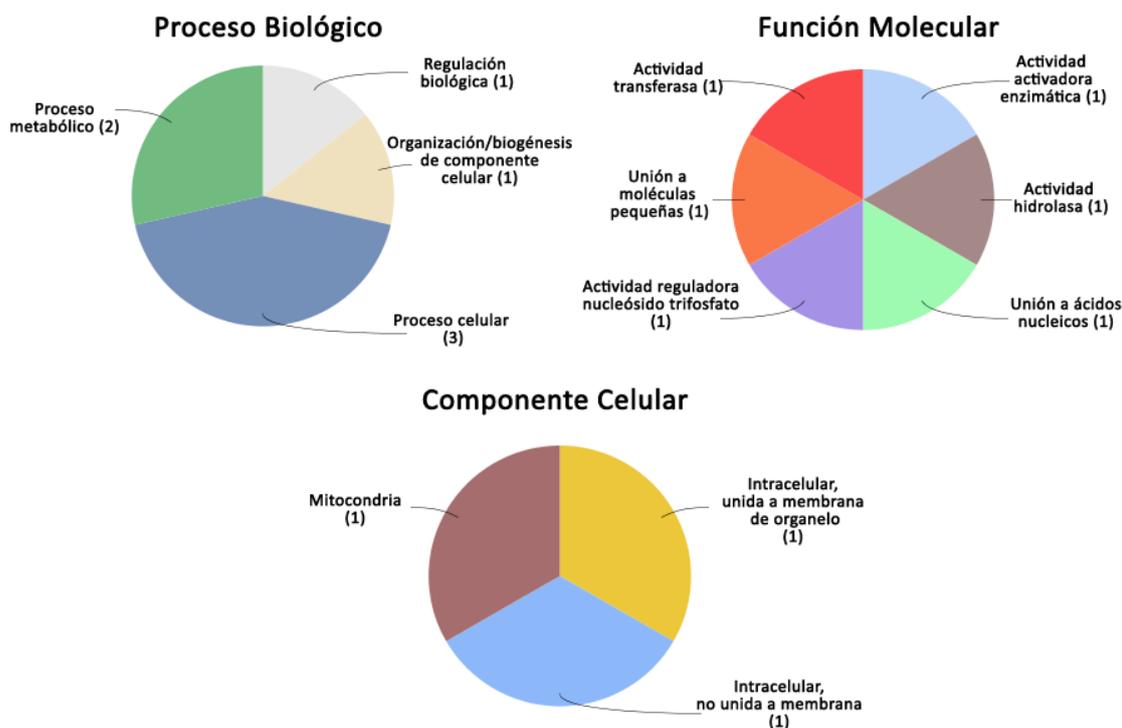


FIGURA 5.6.2.2 Análisis de ontología de los genes seleccionados en el *GST-pull down* de amastigotas. Se muestra el agrupamiento de proteínas en las diferentes categorías: *Componente Celular*, *Proceso Biológico* y *Función Molecular*.

El hecho de que no exista una clara tendencia de distribución de *Función Molecular*, ni de *Componente Celular*, o *Proceso Biológico* común entre los transcritos seleccionados por TcRBP19, puede deberse a la cantidad de proteínas hipotéticas cuya función/localización celular se desconoce y no puede asignarse un término ontológico para la clasificación.

Sin embargo, se puede apreciar que todos los ARNm seleccionados son de expresión diferencial en los diferentes estadios y que existe una tendencia común de expresión a lo largo del ciclo de vida entre algunos de los ARNm seleccionados (**FIGURA 5.6.2.3**).

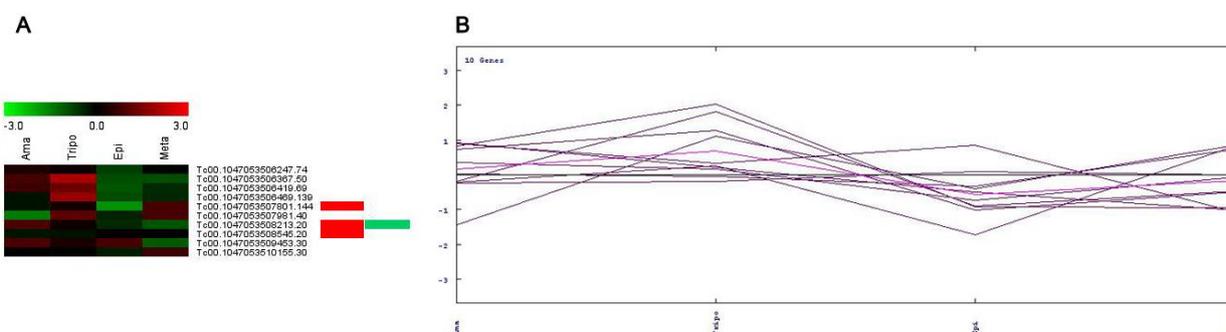


FIGURA 5.6.2.3 Datos de expresión de los transcritos retenidos en el *GST-pull down* con ARN total de amastigotas salvajes. **A)** Mapa de calor mostrando la expresión en el ciclo de vida del parásito de 10 de los 14

ARNm seleccionados o sus alelos. La barra verde horizontal señala el gen que codifica para la proteína TcRBP19 que resulta aumentado cuando se sobrexprende TcRBP19 en amastigotas y que aparece también enriquecida en el *GST-pull down* con ARN de epimastigotas. La barra roja horizontal indica además, los genes Tc00.1047053507801.144 y Tc00.1047053508545.20 que resultan capturados también en el *GST-pull down* con ARN de epimastigotas al igual que TcRBP19 (Tc00.1047053508213.20). **B)** Gráfico de expresión de dichos genes donde se representan los cuatro estadios, de izquierda a derecha: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos. Los valores de expresión fueron procesados mediante el programa *Multiple Experiment Viewer* versión Mev v.4.8.1 [373] y los datos fueron tomados del trabajo de Minning y cols. [408].

Entre los otros ARNm unidos, se encontraron además, 8 transcritos que codifican para proteínas hipotéticas, todas ellas conservadas. Es interesante señalar que tres de estos transcritos también fueron seleccionados, junto con el transcritos para *tcrbp19*, como blanco de unión en los ensayos en epimastigotas (TABLA 5.6.2.2).

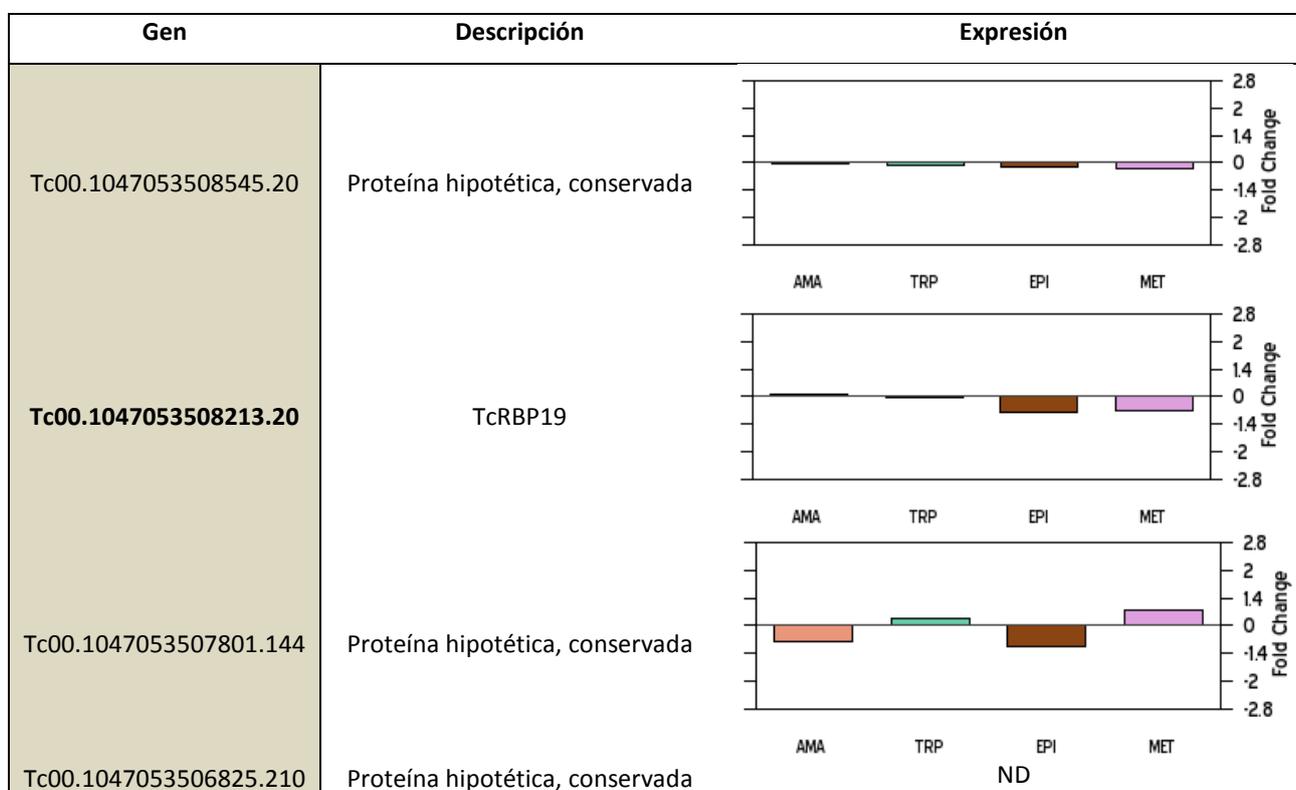


TABLA 5.6.2.2 Genes correspondientes a ARNm que fueron capturados en el *pull down* con ARN total de epimastigotas y de amastigotas. En la columna de la derecha se muestran los datos de expresión de cada transcritos según los datos de Minning y cols. [408] extraídos del TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). ND: dato no determinado.

Analizando las regiones 3'UTR de estos transcritos mediante la herramienta informática MEME, no se encontró ningún elemento conservado con un *score* significativo. Por otro lado, estos ARNs no se encontraron en ninguno de los análisis de transcriptoma con ARN polisomal realizados. Esto sugiere que el efecto de la sobrexpresión de

TcRBP19 no afectaría su abundancia en estado estacionario o bien, afectaría la abundancia del ARN no movilizado a polisomas. Finalmente, dado que los microarreglos utilizados fueron generados por personal del Instituto Carlos Chagas, y no tenemos a nuestra disposición la lista de genes depositados en ellos, no tenemos certeza que estos genes de interés estuvieran incluidos en la lámina.

En cuanto a los demás transcritos retenidos por TcRBP19 en amastigotas, se identificó al producto del gen Tc00.1047053504035.84 que codifica para la Subunidad SDH11 del complejo mitocondrial II [353]. Los tripanosomátidos se caracterizan por una incompleta oxidación de la glucosa con secreción de productos finales tales como succinato, alanina, etanol, acetato, piruvato y glicerol [506,507]. En la mitocondria de los tripanosomátidos, el ciclo de Krebs es ineficiente y el piruvato es convertido en acetato vía la acetato:succinato CoA transferasa. El Complejo Mitocondrial II (succinato:quinona reductasa (SQR) y succinato deshidrogenasa (SDH)) es un complejo proteico de ≈ 550 kDa, unido a la membrana, que sirve como enzima del ciclo de Krebs. Todas las subunidades del complejo Mitocondrial II (excepto la SDH11) son específicas de tripanosomátidos [353] y se postula que este complejo juega un importante rol en la adaptación del parásito al hospedero [508,509] por lo que constituye un blanco potencial interesante para el desarrollo de nuevas drogas.

Se encontró además, como blanco de unión de TcRBP19 en amastigotas, el transcripto Tc00.1047053509453.30 que codifica para una proteína del tipo GCN5. Estas proteínas tienen actividad acetil transferasa y se les ha adjudicado un rol en la regulación de la activación transcripcional en levaduras [510].

Por otro lado, se identificó entre los transcritos seleccionados, el ARNm producto del gen Tc00.1047053506469.139 que codifica para una proteína hipotética conservada cuyo ARNm está aumentado en tripomastigotas sanguíneos [408]. Dicha proteína contiene un motivo dedo de zinc conservado (CSL *zinc finger*). Hay evidencia experimental, de que este dominio puede unir un átomo de Zn^{2+} a partir de cuatro residuos cisteína conservados [511]. El homólogo de esta proteína en *S. cerevisiae* es la proteína Kti11p/Dph3. La diftamida (Dph) es una modificación *post*-traduccional de un residuo de histidina que se encuentra exclusivamente en el factor de elongación de la traducción 2 (eEF-2). Esta modificación se encuentra en las arqueobacterias y eucariotas pero no en eubacterias y es el blanco de la toxina diftérica y de la exotoxina A de *Pseudomonas* [512]. Se sabe que estas toxinas catalizan la transferencia de ADP-ribosa a la Dph en el factor eEF-2 inactivándolo y deteniendo la síntesis proteica causando muerte celular. La proteína Dph3 participa en un complejo multiproteico formado por 5 proteínas conservadas que cataliza la formación de esta curiosa modificación *post*-traduccional [513]. De estas 5 proteínas requeridas para la biosíntesis de la diftamida, Dph3 es la única a la cual se le ha asignado un rol en otros procesos. Mutantes de este gen en *S. cerevisiae* han manifestado defectos en el crecimiento y son más sensibles a la temperatura y a drogas [513,514]. En ratones, la pérdida de los dos alelos *dph3* llevaron a un retardo en el desarrollo embrionario [515]. Estas, y otras

observaciones llevan a pensar que esta proteína tiene un rol en otros importantes procesos biológicos celulares [516]. El rol de esta proteína, a la que llamaremos TcDph3, no ha sido estudiado ni en *T. cruzi* ni en otros tripanosomátidos.

TcRBP19 interactúa también con el ARNm Tc00.1047053508737.194 que codifica para un componente del complejo Arp2/3. Este ARNm resultó estar disminuído en amastigotas sobrexpresando TcRBP19 con respecto a parásitos control del mismo estadio (TABLA 5.4.2.2). Estos hechos aunados podrían ser evidencia de que la unión de TcRBP19 a este ARNm en particular, estuviera afectando su estabilidad reduciendo la abundancia del transcripto en la célula probablemente, induciendo su degradación.

Dada la relevancia potencial del involucramiento de TcRBP19 en mecanismos de auto-regulación, se abordaron diferentes técnicas para confirmar la interacción de TcRBP19 con su propio ARNm. En primer lugar, el ARN de amastigotas purificado a partir del *pull down* con GST-TcRBP19 fue retrotranscripto usando un cebador oligo(dT) y amplificado con oligonucleótidos específicos para TcRBP19 (TABLA 4.20.2.1). Como control se realizó un PCR sobre ADNc obtenido a partir de ARN no retenido en la columna (FIGURA 5.6.2.4).

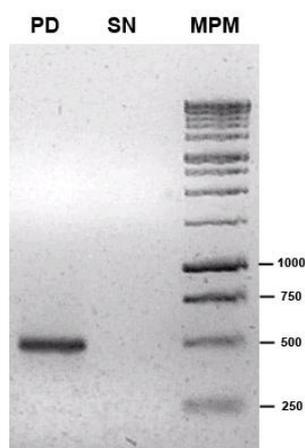


FIGURA 5.6.2.4 Interacción *in vitro* de TcRBP19 con su propio ARNm. PD: ADNc generado a partir de ARN retenido por *-pull down* con GST-TcRBP19; SN: ADNc generado a partir de ARN eluído en el *-pull down* con GST-TcRBP19; MPM: marcador de peso molecular *1kb ladder* Fermentas®.

La interacción *in vitro* de la proteína TcRBP19 con el ARNm que la codifica fue además analizada *in vivo* mediante inmunoprecipitación de ARN (ver 4.27.1). Para ello se realizó un *crosslinking* en un extracto total de 1×10^8 parásitos sobrexpresando TcRBP19 y luego se incubó con anticuerpo anti-TcRBP19. Los complejos ribonucleoproteicos capturados por el anticuerpo fueron purificados y se verificó la presencia de transcripto *tcrbp19* en el complejo mediante RT-PCR usando cebador Oligo(dT)₍₁₈₎ y un oligo específico TcRBP19fw (LP1) (FIGURA 5.6.2.5).

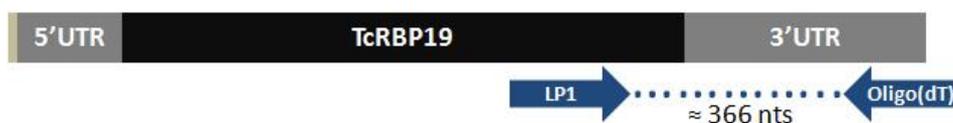


FIGURA 5.6.2.5 Esquema de la región amplificada con los oligos *LP1* y *Oligo(dT)* a partir del ADNc generado con el ARN retenido en la inmunoprecipitación de TcRBP19.

Los resultados mostrados en la **FIGURA 5.6.2.6** verifican la interacción *in vivo* de TcRBP19 con su propio ARNm dado que en la reacción de RT-PCR se observó un producto del tamaño esperado (≈ 360 pb). Este amplicón no se observa en el control sin anticuerpo.

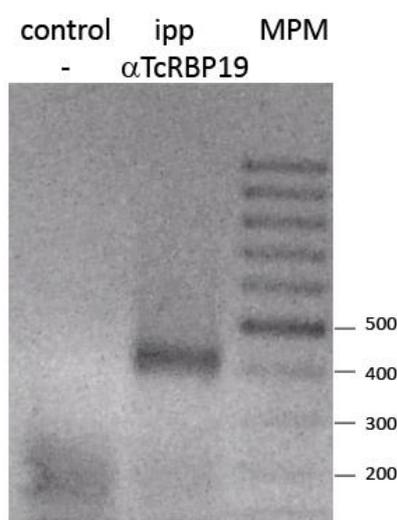


FIGURA 5.6.2.6 Inmunoprecipitación de ARN confirmando interacción de TcRBP19 con su ARNm. Electroforesis en gel de agarosa del producto de RT-PCR, usando oligonucleótidos específicos para el transcrito de *tcrbp19*, a partir de ARN de epimastigotas sobrexpresando TcRBP19. En el carril de la izquierda se muestra el resultado de la amplificación, luego de realizar el procedimiento sin el agregado del anticuerpo anti-TcRBP19. En el carril del medio, *ídem* pero usando anticuerpo anti-TcRBP19. En el carril de la derecha se muestra el marcador de peso molecular *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Fermentas®).

Por último, se realizó la comparación cuantitativa de la cantidad de ARNm *tcrbp19* capturado en el *pull down* con GST-TcRBP19 con la cantidad de ARNm de *tcrbp19* en ARN total de amastigotas (**TABLA 5.6.2.3** y **FIGURA 5.6.2.7**). Las medidas se realizaron relativas al transcrito de *gapdh*. Se observa que la cantidad relativa del ARNm que codifica para la proteína TcRBP19 está enriquecida ≈ 29 veces en la fracción retenida en la columna de afinidad a TcRBP19, comparado con el ARN total de amastigotas. Como control negativo, se cuantificó también la cantidad relativa del transcrito de *tcpuf6*. Estos datos confirman la interacción específica de la proteína TcRBP19 con su propio ARNm.

En paralelo, se verificó también la interacción de TcRBP19 con otros transcriptos identificados en el *pull down*, mediante qRT-PCR, cuantificando la cantidad de ARNm retenido relativo al ARNm para *gapdh*. Los transcriptos elegidos para confirmar por qRT-PCR fueron aquellos que tenían función asignada por homología con otros genes y provenían además del ensayo en amastigotas: Tc00.1047053504035.84, la subunidad SDH11 del complejo mitocondrial II [353]; Tc00.1047053509453.30, la proteína tipo GCN5; Tc00.1047053506469.139, el homólogo de Dph3 al que llamamos TcDph3 y Tc00.1047053508737.194, la subunidad complejo ARP2/3 (**FIGURA 5.6.2.7 y TABLA 5.6.2.3**). La interacción con TcRBP19 no se verificó para el ARNm que codifica para la proteína del tipo GCN5. En cambio, se observó que la población de ARN retenido en la columna de afinidad a TcRBP19, está enriquecido en los transcriptos que codifican para TcDph3, SDH11, y Arp2/3, con respecto al ADNc obtenido a partir de ARN total. Esto confirma su interacción con TcRBP19 y valida los resultados obtenidos a partir de la hibridación del microarreglo.

TcRBP19		TcDph3	
total amastigotas	pD amastigotas	total amastigotas	pD amastigotas
1,01	26,17		
1,17	32,00		
1,04	26,35	1,46	227,02
0,90	30,91	0,85	213,29
1,06	31,56	0,80	135,92
1,03 ± 0,01	29,39 ± 2,89	1,03 ± 0,36	192,07 ± 49,11

GCN5 like		SDH11	
total amastigotas	pD amastigotas	total amastigotas	pD amastigotas
		1,00	105,42
1,22	0,14	1,02	171,25
0,82	0,01	0,98	172,45
1,02 ± 0,28	0,075 ± 0,09	1,00 ± 0,02	149,71 ± 38,35

ARP2/3		TcPuf6	
total amastigotas	pD amastigotas	total amastigotas	pD amastigotas
1,52	4030,29	1,00	0,30
0,72	3460,26	0,92	0,00
0,92	1097,50	1,08	0,00
1,05 ± 0,41	2862,68 ± 1555,03	1,00 ± 0,08	0,1 ± 0,17

TABLA 5.6.2.3 Interacción de TcRBP19 con algunos ARNm. Se cuantificó por qRT-PCR la cantidad de ARN de interés relativa al ARN de *gapdh* en el ARN total de amastigotas y en el retenido en la columna de afinidad a TcRBP19.

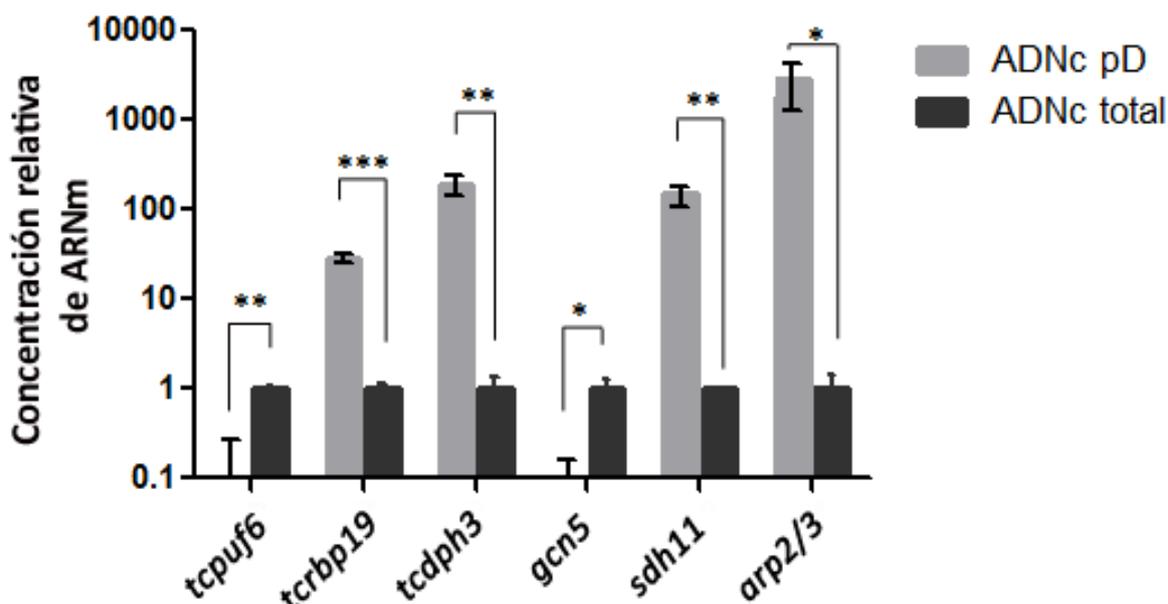


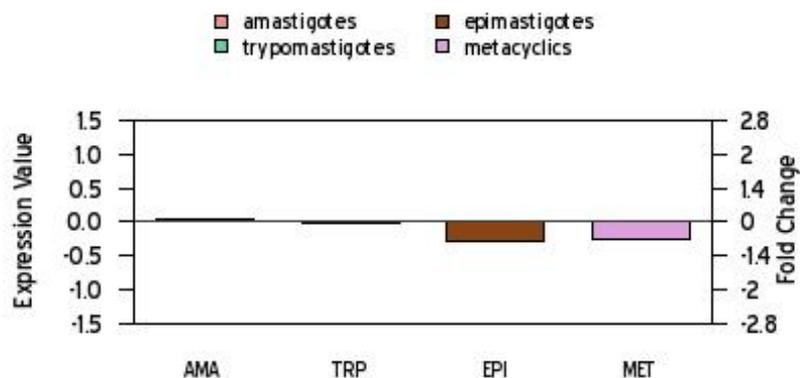
FIGURA 5.6.2.7 Interacción de TcrBP19 con algunos ARNm. Se cuantificó por qRT-PCR la cantidad de ARN de interés relativa al ARN de *gapdh* en el ARN total de amastigotas y en el retenido en la columna de afinidad a TcrBP19. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA). Se aplicó el test *t* para determinar la significancia estadística. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$).

Estos transcritos comparten el motivo conservado rico en U en su región 3'UTR. Además, aunque son todos de expresión diferencial **FIGURA 5.6.2.8**, no se observa un perfil común de expresión.

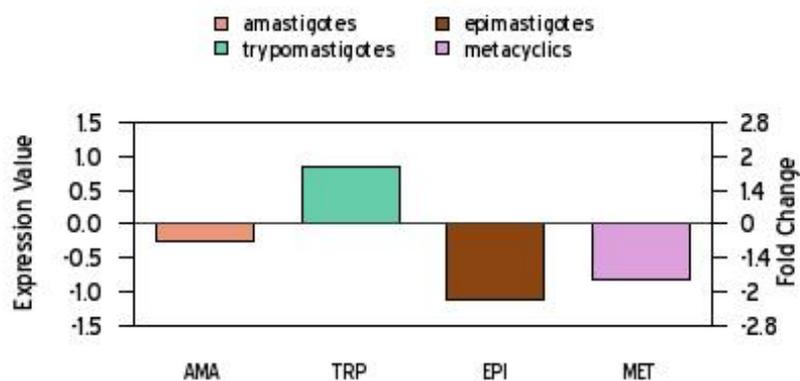
PÁGINA SIGUIENTE:

FIGURA 5.6.2.8 Datos de expresión de cuatro ARNm blanco de TcrBP19 a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*. Resultados de ARN de tres réplicas biológicas de cada estadio sometida a análisis de expresión en microarreglos de ADN conteniendo sondas para todo el genoma anotado de *T. cruzi*. Se representa el FC de datos de un estadio en particular comparado con el control representado por una población conteniendo mezclas iguales de parásitos en los cuatro estadios analizados. Amastigotas (AMA), Tripomastigotas (TRP), Epimastigotas (EPI), Metacíclicos (MET). Los datos son extraídos de la base de datos TriTrypDB [365] (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) a partir de valores obtenidos en el trabajo de Minning y cols. [408].

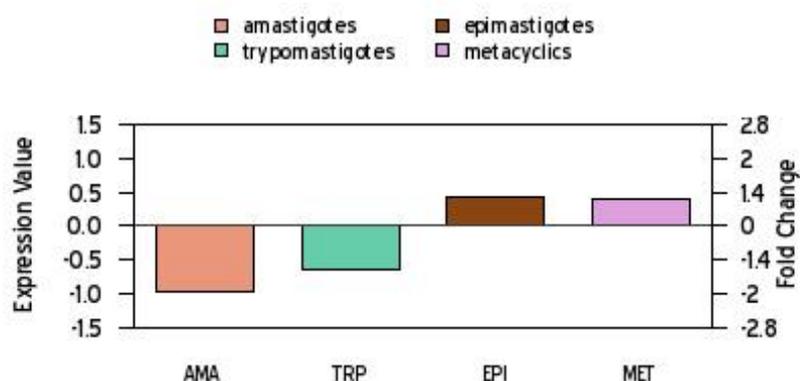
Tc00.1047053508213.20
TcRBP19



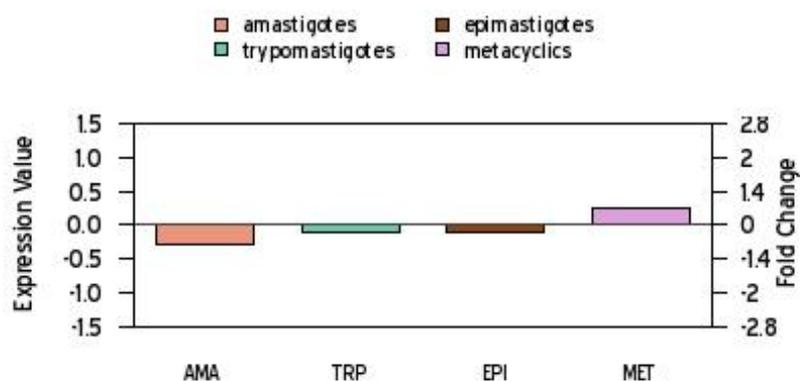
Tc00.1047053506469.139
TcDph3



Tc00.1047053504035.84
SDH11



Tc00.1047053508737.194
subunidad del complejo Arp2/3



Mediante el análisis de GST-pull down se identificaron diferentes transcriptos que corresponderían a blancos de unión de TcRBP19 en epimastigotas y amastigotas. En ninguno de los dos casos se pudo asignar una función o localización celular común a los mensajeros seleccionados. Sin embargo en el caso del análisis con ARN de amastigotas, se puede ver un patrón de expresión común a lo largo del ciclo de vida entre los genes seleccionados. Se identificaron cuatro transcriptos (incluyendo el que codifica para la proteína TcRBP19) que aparecen tanto en los ensayos con ARN de estadio epimastigota como con ARN de amastigota. Se confirmó por PCR en tiempo real, RT-PCR e inmunoprecipitación de ARN la interacción de TcRBP19 con el ARNm que lo codifica. Por PCR en tiempo real se verificó la interacción de TcRBP19 con otros ARNm blanco en amastigotas: un ARNm que codifica para una subunidad del complejo ARP2/3, una proteína con motivo dedo de Zinc (TcDph3) y una subunidad SDH11 del complejo mitocondrial II.

5.7 IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES REGULATORIAS RECONOCIDAS POR TcRBP19

5.7.1 DELIMITACIÓN DE LAS REGIONES UTRS DE LOS GENES BLANCO DE TcRBP19 SELECCIONADOS EN EL ESTADIO AMASTIGOTA

Teniendo en cuenta que las señales responsables de la regulación de la vida media, localización y destino del ARNm se localizan a menudo en las regiones transcritas no traducidas UTRs, principalmente en la región 3'UTR. Considerando además, que la regulación *post*-transcripcional depende en gran parte de las mismas [202,326,517], se buscó delimitar las regiones regulatorias no traducidas de los genes seleccionados en el experimento con ARN de amastigotas para poder estudiar la existencia de señales conservadas contenidas ya sea de secuencia primaria o secundaria en el ARN.

Las regiones 5' y 3'UTR de *tcrbp19* fueron determinadas por RT-PCR a partir de ARN total de amastigotas. Los productos de amplificación fueron clonados en *pGem-T easy* y secuenciados. Para la región 3'UTR se determinó la existencia de 3 productos de amplificación de diferente largo, que podrían corresponder a 3 sitios de poliadenilación alternativa (**FIGURA 5.7.1.1**). En forma análoga se determinó la región 5'UTR.

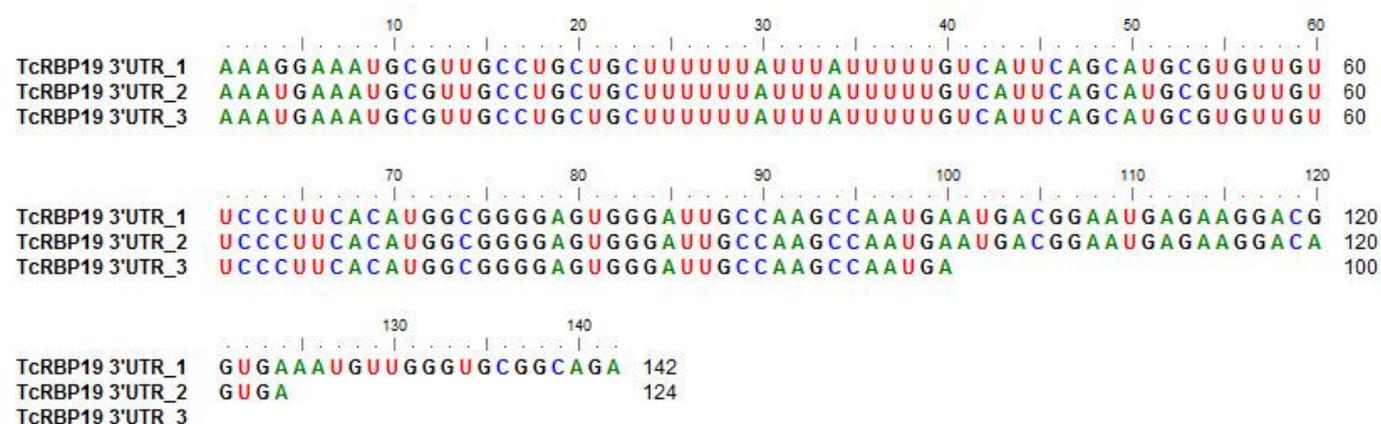


FIGURA 5.7.1.1 Región 3'UTR del ARNm que codifica para la proteína TcRBP19. Se muestra la secuencia de los tres largos obtenidos por RT-PCR para la región 3'UTR del transcrito *tcrbp19*.

El hecho de que pueda existir regulación de la expresión del transcrito *tcrbp19* a nivel de mecanismos de poliadenilación alternativa resulta sumamente interesante en este parásito y abre nuevas interrogantes para futuros estudios en el marco de la regulación *post*-transcripcional. Si los diferentes ARNm que contienen las diferentes 3'UTR son traducibles, es un hecho que queda por demostrar.

Sin embargo, datos de RNA-Seq de UTRs de amastigotas y tripomastigotas, usando la tecnología Illumina® confirman la presencia de la región 3'UTR de 142 nucleótidos tanto en tripomastigotas como en amastigotas (Dr.

Como se indicó anteriormente, mediante el análisis de las UTRs de los genes antencionados, se identificó la presencia de un elemento conservado rico en U en las regiones 3'UTR de la mayoría de los ARNm blanco de TcRBP19. La mayoría de dichos genes contienen trechos ricos en U también en las regiones 5'. Análisis de estructura secundaria, modeladas *in silico* con el software RNAfold (FIGURA 5.7.1.3) predicen que estas secuencias ricas en U se localizarían tanto en regiones de simple hebra como de doble hebra de las horquillas formadas por las UTRs para las conformaciones termodinámicamente más favorables.

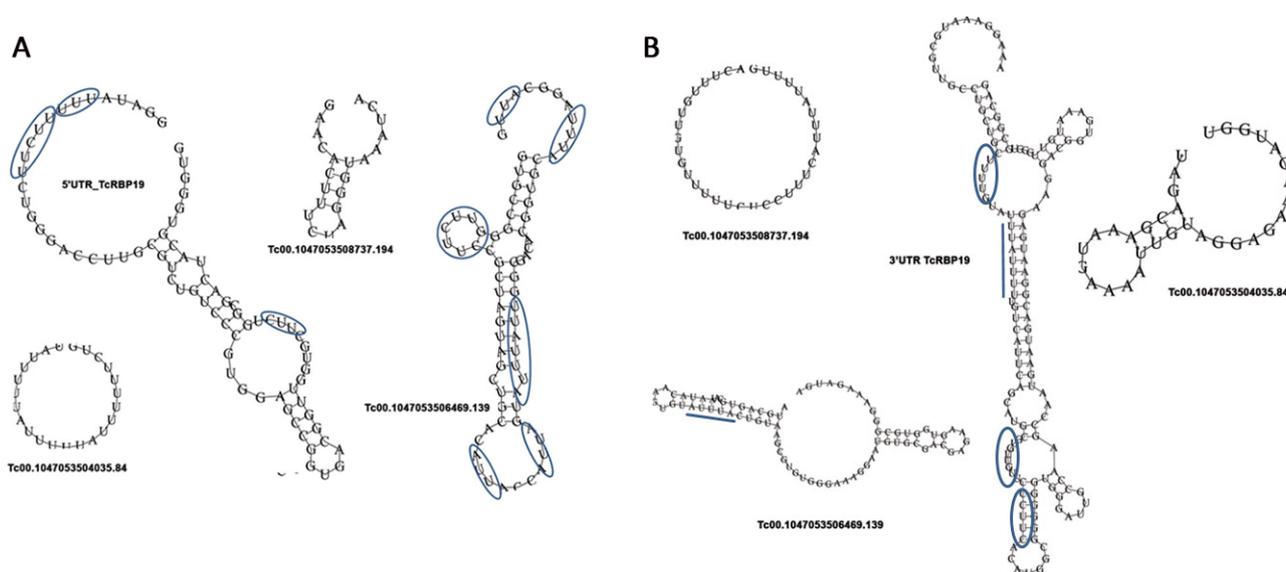


FIGURA 5.7.1.3 Estructuras secundarias predichas de las regiones UTR seleccionadas. Se muestran las estructuras correspondientes a la mínima energía libre para los ARNm blancos de TcRBP19 seleccionados modeladas con el software *RNAfold web server*. **(A)** Regiones 5'UTR **(B)** Regiones 3'UTR. Se señala en azul algunas regiones ricas en U.

Dentro de los tramos ricos en U de estas regiones UTRs, se destaca la presencia de repetidos GU y CU imperfectos, así como también del pentámero conservado del elemento ARE (AUUUA). Las secuencias ARE son los elementos regulatorios mejor caracterizados y se han encontrado en ARNm eucariotas de corta vida media [282,518]. Los ARE pueden regular la estabilidad de un ARNm en particular, promoviendo su degradación o inhibiéndola. Estos elementos se han encontrado en los ARNm de proto-oncogenes (ej. *c-FOS*) y de mediadores inflamatorios (ej. el factor de necrosis tumoral TNF- α , las interleuquinas IL-1, IL-2, IL-3 y el factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos GM-CSF) [284,519,520] que constituyen proteínas cuyo nivel debe estar fuertemente regulado (revisado en [240]). Se ha visto que algunos ARNm que contienen uno o más elementos ARE sufren un decaimiento acelerado bajo diferentes condiciones, y otros no. Esto podría ser el resultado de la contribución de otros elementos regulatorios *in cis* presentes en la región, de estructuras secundarias que podrían formarse y/o de la presencia de diferentes proteínas o ARNs pequeños no codificantes que interactúan con dicha secuencia alterando su estabilidad. Muchas de las proteínas de unión a ARE caracterizadas pueden

determinar diferencialmente el destino del ARNm dependiendo del contexto ambiental y celular [521]. Por ejemplo, para la proteína de unión a ARE Tritetraprolina (TTP) se han caracterizado varios ARNm blanco fisiológicos [522]. También se han identificado al menos 300 ARN blanco potenciales para la proteína TIA-1 (*T-cell intracellular antigen 1*), muchos de ellos conteniendo motivos ricos en U [268].

La vía regulatoria que involucra este elemento rico en U parece ser bien conservada, ya que la sobreexpresión de la proteína de unión a ARE HuR de mamíferos, causa en *T. brucei* un aumento en la estabilidad de ciertos ARNm que codifican para algunas proteínas estadio específicas tales como las proteínas EP: la principal proteína de superficie de procíclicos, PGKB (fosfoglicerato quinasa citosólica) y PPK (piruvato fosfato diquinasa) y proteínas que contienen elementos ricos en U parecidos al elemento ARE en sus regiones 3'UTR [523]. En *T. cruzi* se ha demostrado además que los elementos ARE median la regulación estadio específica de los ARNm para TcSMUG [272].

5.7.2 INTERACCIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA TcRBP19 CON REGIONES 3'UTR DE TRES GENES SELECCIONADOS

Mediante *GST-pull down* de ARN y análisis de microarreglos de ADN, y en paralelo, mediante PCR en tiempo real e inmunoprecipitación pudimos verificar que efectivamente la proteína TcRBP19 es capaz de interactuar con el ARNm que la codifica. Teniendo en cuenta los antecedentes en cuanto a la relevancia de la región 3'UTR en la regulación de la expresión génica, nos preguntamos si TcRBP19 era capaz de interactuar con su propio ARNm a través de su región 3'UTR. Para ello se realizaron ensayos de retardo en gel (REMSA) con la proteína de fusión GST-TcRBP19 y la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19* obtenida mediante transcripción *in vitro* (**FIGURA 4.16.1**).

En la **FIGURA 5.7.2.1** se muestra, a modo de ejemplo, el producto de transcripción *in vitro* en condiciones no radiactivas. Se observa una banda de alto peso molecular correspondiente al plásmido lineal *pGem-T Easy* conteniendo la región 3'UTR de *tcrbp19*, usado como molde. Con una migración entre 200 y 300 bases se encuentra una banda difusa correspondiente al ARN de ≈150 bases transcripto *in vitro*. Esta señal es específica de la transcripción ya que no se observa en el plásmido *pGem-TcRBP19* 3'UTR usado como molde. El aumento en el tamaño aparente del producto de transcripción probablemente se deba a las estructuras secundarias que se forman al usar geles de agarosa en condiciones nativas.

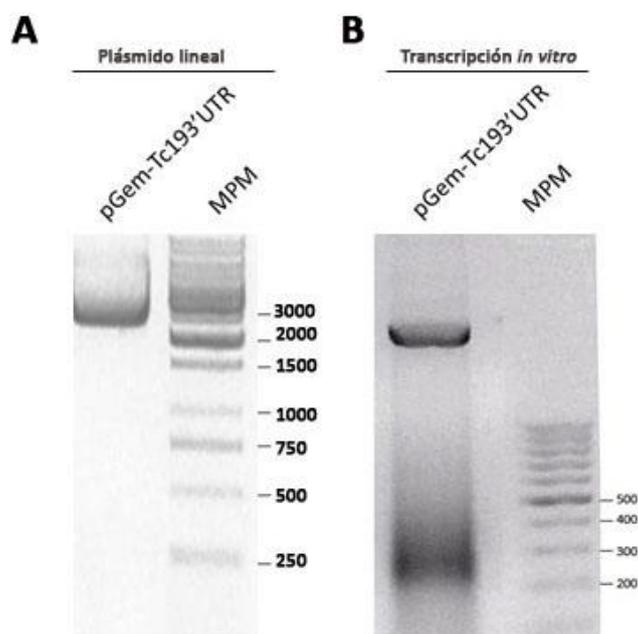


FIGURA 5.7.2.1 Transcripción *in vitro* de la región 3'UTR de *tcrbp19*. **(A)** Electroforesis en gel nativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio mostrando el plásmido *pGem-T Easy* conteniendo la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19* linealizado con la enzima *Spe I* previo a la transcripción. **(B)** Electroforesis en gel nativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio del producto de la transcripción *in vitro* de la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*. MPM: el marcador de peso molecular: *1kb ladder* y *100 pb ladder* Fermentas® en el gel de la izquierda y derecha respectivamente.

A través del ensayo de REMSA, se pudo constatar que la proteína recombinante GST-TcRBP19 (≈ 46 kDa) es capaz de formar un complejo *in vitro* con la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19* marcado radiactivamente (**FIGURA 5.7.2.2**).

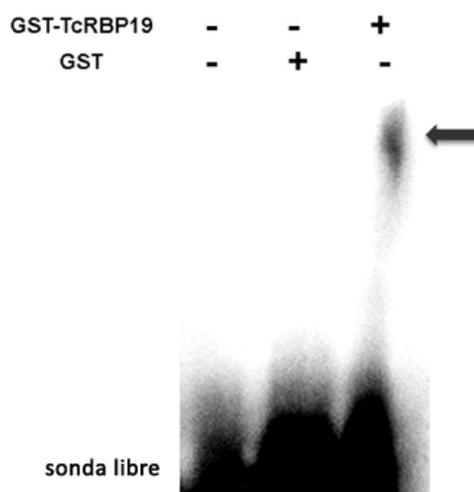


FIGURA 5.7.2.2 Interacción *in vitro* de la proteína recombinante TcRBP19 con la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*. Ensayo de REMSA usando como sonda la región 3'UTR (141 nucleótidos) del ARNm que codifica para la proteína TcRBP19. La sonda fue sintetizada en presencia de [32 P] α -UTP (50.000 cpm), y se usaron 500 ng de

proteína GST-TcRBP19 ó 1 μg de proteína GST recombinante. Con una flecha se señala el complejo ARN-proteína formado. Se indica además, la presencia/ausencia de proteína (+/-) y la migración de la sonda libre.

Por otro lado, se analizó la interacción de TcRBP19 con la región 3'UTR de otros dos de los ARNm blanco de TcRBP19. De igual manera que para la 3'UTR de *tcrbp19*, se clonó y marcó mediante transcripción *in vitro* la región 3'UTR de los ARNm que codifican para la subunidad del complejo succinato deshidrogenasa SDH11 y de la subunidad complejo ARP2/3.

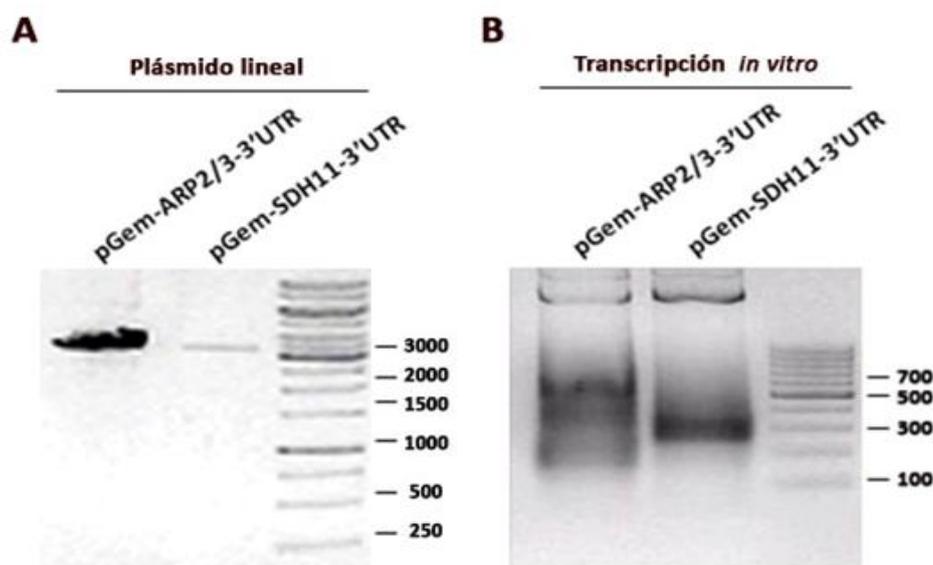


FIGURA 5.7.2.3 Transcripción *in vitro* de la región 3'UTR de dos genes blanco de TcRBP19. (A) Electroforesis en gel nativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio mostrando el plásmido *pGem-T Easy* conteniendo la región 3'UTR de los ARNm *arp2/3* y *sdh11* linealizado con la enzima *Spe I*. (B) Electroforesis en gel nativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio del producto de la transcripción *in vitro* de las correspondientes regiones 3'UTR. MPM: el marcador de peso molecular: *1kb ladder* y *100 pb ladder* Fermentas® en el gel de la izquierda y derecha respectivamente.

A modo de ejemplo, se muestra en la **FIGURA 5.7.2.3** una electroforesis en gel con el ensayo realizado “en frío”. Se observa un conjunto de bandas difusas con una migración de entre 150 y 500 bases correspondientes a las diferentes estructuras del ARN transcripto para la región 3'UTR tanto del ARNm que codifica para la subunidad Arp2/3 como del que codifica para la subunidad del complejo succinato deshidrogenasa mitocondrial SDH11 de *T. cruzi*. Las regiones 3'UTR de estos ARNm fueron transcriptas en presencia de ribouridina marcada con ^{32}P y sometidas a REMSA en presencia de proteína recombinante GST-TcRBP19. En la **FIGURA 5.7.2.4** puede apreciarse que la proteína recombinante GST-TcRBP19 es capaz de formar complejos con las dos 3'UTR ensayadas.

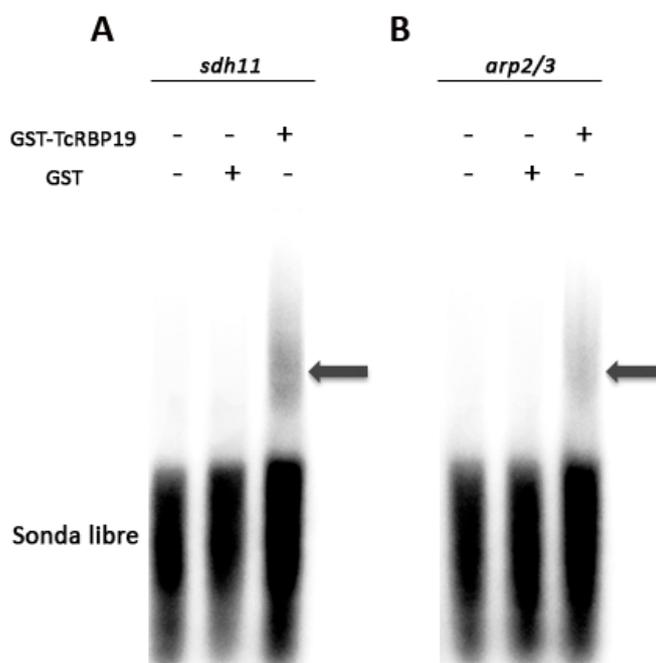


FIGURA 5.7.2.4 Interacción *in vitro* de la proteína recombinante TcrBP19 con la región 3'UTR de dos ARNm seleccionados. Ensayo de REMSA usando como sonda la región 3'UTR del ARNm que codifica para la subunidad SDH11 del complejo mitocondrial succinato deshidrogenasa (A) y para la subunidad del complejo ARP2/3 (B). La sonda fue sintetizada en presencia de [³²P]α-UTP (50.000 cpm), y se usaron 500 ng de proteína GST-TcrBP19 ó 1 µg de proteína GST recombinante. Con una flecha se señala el complejo ARN-proteína formado. Se indica además, la presencia/ausencia de proteína (+/-) y la migración de la sonda libre.

5.7.3 INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA TcrBP19 CON ELEMENTOS RICOS EN U

Dado que las secuencias ricas en U contenidas en las regiones 3'UTR de los transcritos blanco de TcrBP19 podrían constituir señales en *cis*, surge el interés en analizar estos elementos como posibles blancos de unión a TcrBP19. Como primera aproximación, se realizaron ensayos de retardo en gel con diferentes ribosondas sintéticas ricas en U disponibles en el laboratorio (TABLA 4.29.1). La sonda NRE es una sonda rica en U que posee un sitio de unión a proteínas de unión al ARN del tipo Pumilio [332]. La sonda ARE contiene cuatro trechos del pentámero ARE (AUUUA) presente en la región 3'UTR de varios ARNm blanco de TcrBP19 incluyendo el ARNm *tcrbp19*. El elemento U-rich 26mer es el responsable de la inestabilidad del ARN EP1 en formas sanguíneas de *T. brucei* confiriendo regulación a lo largo del ciclo de vida [524]. Las sondas CU y GU contienen repetidos del elemento (CUUU)₄ y (GUUU)₄ respectivamente. En la FIGURA 5.7.3.1A puede observarse la formación de complejo de GST-TcrBP19 con las ribosondas GU, U-26mer y NRE. Para determinar la especificidad de la unión *in vitro* TcrBP19-NRE y U-26mer, se realizaron competiciones con las ribosondas específicas e inespecíficas que se indican (FIGURA 5.7.3.1B). Se deduce de este ensayo que TcrBP19 es capaz de formar un complejo específico con la sonda NRE y que dicho complejo es desplazado por la adición de sonda NRE fría en un exceso de 10 y 100 veces. Por otro lado, la adición de sonda ARE fría en un exceso molar de 10 veces no es capaz de desplazar dicho

complejo y la competencia con sonda CU, GU y U-26mer fría en un exceso de 10 veces logra desplazar parte de este complejo, por lo que se necesitarían mayores cantidades para desplazarlo completamente. Para el caso de los ensayos con sonda U-26mer marcada, se observa que el complejo formado no es desplazado completamente con un exceso de sonda fría específica U-26mer, en un exceso molar de 100 veces. Sin embargo, el complejo GST-TcRBP19 con la ribosonda marcada U-26mer es desplazado completamente con la sonda NRE fría en un exceso molar de 10 veces. Esto estaría indicando una capacidad discriminatoria de la proteína TcRBP19 por diferentes sondas ricas en U y una preferencia por la sonda NRE frente a la U-26mer. En todos los casos puede apreciarse que la formación de complejo se debe a la presencia de TcRBP19 ya que el mismo no aparece en el control con GST.

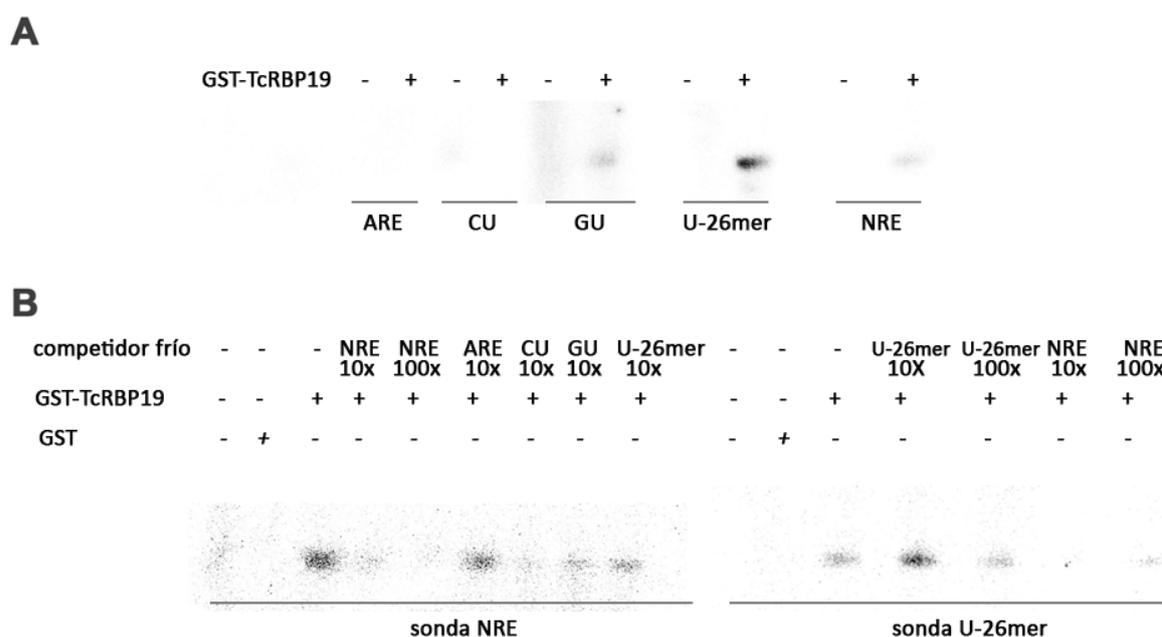


FIGURA 5.7.3.1 Interacción *in vitro* de la proteína recombinante TcRBP19 con diferentes ribosondas ricas en U. **(A)** Ensayo REMSA utilizando los oligonucleótidos sintéticos que se indican marcados con [32 P] γ -CTP (approx. 15.000 cpm) y 500 ng de proteína recombinante GST-TcRBP19 (+). **(B)** Ensayo REMSA usando 500 ng de proteína recombinante GST-TcRBP19 en presencia de sonda NRE (izquierda) ó U-26mer marcada con [32 P] γ -CTP (approx. 15.000 cpm). Se agregaron competidores específicos e inespecíficos fríos (ARE, CU, GU ó U-26mer) en un exceso molar de 10 ó 100 veces (10x y 100x) en los carriles indicados. Se realizó un control con GST para las sondas NRE y U-26mer.

Análisis de competencia usando diferentes sondas que delimitan subregiones dentro de la región 3'UTR de *tcrbp19*, podrían esclarecer las características del elemento reconocido. Sin embargo, es común que las RBPs requieran de señales dispersas en regiones relativamente amplias [525] y, en muchos casos, se definen elementos de varias decenas de pares de bases [279].

Las regiones 5' y 3' no traducidas de algunos ARNm blanco de la proteína TcRBP19 fueron determinadas de forma experimental y teórica. Todas las UTRs analizadas contienen trechos ricos en Uridinas, aunque no se encontró ningún elemento conservado. Se modelaron in silico las regiones 5' y 3'UTR de dichos ARNm y se constató la presencia de estos trechos ricos en U tanto en regiones simple hebra como en regiones doble hebra en la estructura secundaria del ARN. Los ARNm analizados que contienen trechos ricos en U son todos de expresión diferencial a lo largo de su ciclo de vida. La proteína TcRBP19 es capaz de establecer interacciones con las regiones 3'UTR de por lo menos tres de los genes seleccionados. En particular es capaz de unirse a la región 3'UTR del gen que la codifica. Finalmente, la proteína TcRBP19 es capaz de reconocer in vitro diferencialmente algunas ribosondas sintéticas ricas en U.

5.8 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN REGULATIVA DE LA REGIÓN 3'UTR DE *tcrbp19*

5.8.1 CUANTIFICACIÓN DEL ARNm REPORTERO *cat*

Para investigar la función regulativa de la región 3'UTR del gen *tcrbp19* se construyó un vector reportero (*pTEX-CAT-3'UTR*) en donde se insertó la región en estudio corriente abajo del gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) en el vector de expresión de *T. cruzi pTEX* [349]. Se realizaron dos construcciones diferentes, una con la región 3'UTR de *tcrbp19* de 142 y otra de 124 nucleótidos (**FIGURA 5.7.1.1**) para generar los plásmidos *pTEX-CAT-3'UTR-1* y *pTEX-CAT-3'UTR-2*. Con estas construcciones (**FIGURA 5.8.1.1**) se transfectaron epimastigotas de *T. cruzi* y se seleccionaron los transfectantes con neomicina. Como control se usaron parásitos transfectados con el plásmido control *pTEX-CAT* donde la expresión del reportero está dirigida por las regiones 5' corriente arriba y 3' corriente abajo del gen *gapdh* presentes en el vector original [349].

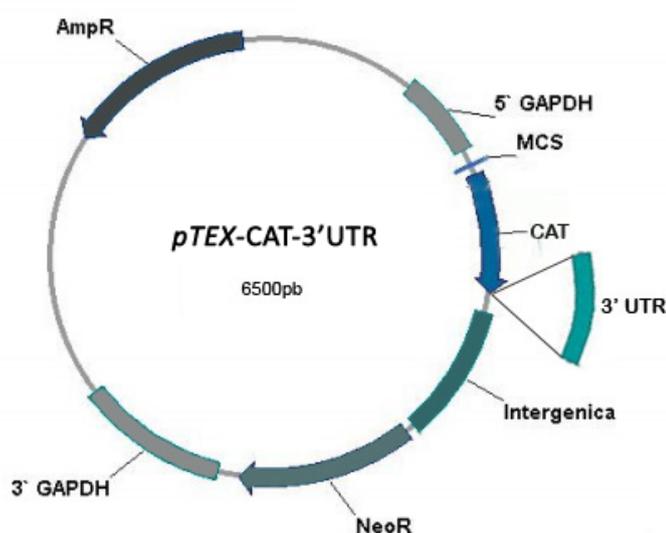


FIGURA 5.8.1.1 Esquema del vector *pTEX-CAT* conteniendo la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*.

Los parásitos conteniendo el vector *pTEX-CAT* y *pTEX-CAT-3'UTR* fueron crecidos con bajas concentraciones de antibiótico (250 µg/mL) para que, a la vez de mantener la presión selectiva evitando la pérdida del vector episomal, se puedan minimizar los efectos causados por la sobreexpresión del vector. En ambos casos, se cuantificó el número de copias de vector en la población de parásitos transfectados para normalizar los resultados en función del mismo. Para ello, mediante qPCR a partir de ADN total, se analizó la cantidad de gen *cat* relativa al gen *gapdh* usado para normalizar. En todos los casos, la cantidad de *cat* correspondía a ≈0,5 veces la cantidad de *gapdh*, presente en dos copias por genoma diploide, por lo tanto, se estimó un plásmido por parásito en la población total de transfectantes (**TABLA 5.8.1.1** y **5.8.1.2**).

		CT		CT	Δ CT	$2^{-(\Delta$ CT)}	Nº de copias relativo a <i>gapdh</i>	Nº de copias plásmido
<i>pTEX-CAT</i>	gapdh	7,11	cat	8,39	-1,28	0,41	0,44 ± 0,04	0,88 ± 0,09
	gapdh	5,57	cat	6,82	-1,25	0,42		
	gapdh	5,39	cat	6,42	-1,03	0,49		
<i>pTEX-CAT-UTR-1</i>	gapdh	6,75	cat	7,51	-0,76	0,59	0,46 ± 0,12	0,92 ± 0,23
	gapdh	5,36	cat	6,68	-1,32	0,40		
	gapdh	5,93	cat	7,32	-1,39	0,38		
<i>pTEX-CAT-UTR-2</i>	gapdh	12,28	cat	13,65	-1,37	0,39	0,43 ± 0,06	0,86 ± 0,13
	gapdh	5,8	cat	6,87	-1,07	0,48		

TABLA 5.8.1.1 Número de copias de plásmido en poblaciones de parásitos epimastigotas transfectados. Resultado de experimentos de PCR en tiempo real con ADN de parásitos transfectados con el plásmido control *pTEX-CAT*, y dos transfecciones independientes con los plásmidos *pTEX-CAT-UTR-1* y 2 conteniendo la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*. Se cuantificó la cantidad de copias del plásmido relativo al gen *gapdh* presente en dos copias por genoma diploide. Para las tres transfecciones se obtuvo un promedio de 1 copia de plásmido por parásito en la población analizada. Se muestra el resultado de triplicados técnicos con su error para cada transfección. Para el caso de la transfección *pTEX-CAT-UTR-2* se realizaron duplicados técnicos

		CT		CT	Δ CT	$2^{-(\Delta$ CT)}	Nº de copias relativo a <i>gapdh</i>	Nº de copias plásmido
<i>pTEX-CAT</i>	gapdh	9,56	cat	8,39	-1,17	0,44	0,44	0,88
<i>pTEX-CAT-UTR-1</i>	gapdh	10,68	cat	9,53	-1,15	0,45	0,45	0,90
<i>pTEX-CAT-UTR-2</i>	gapdh	13,47	cat	12,16	-1,31	0,40	0,40	0,80

TABLA 5.8.1.2 Número de copias de plásmido en poblaciones de parásitos amastigotas transfectados en cultivo. Resultados de experimentos de PCR en tiempo real con ADN total de células infectadas con parásitos transfectados con el plásmido control *pTEX-CAT*, y dos transfecciones independientes con los plásmidos *pTEX-CAT-UTR-1* y 2 conteniendo la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*. Se cuantificó la cantidad de copias del plásmido relativo al gen *gapdh* presente en dos copias por genoma diploide. Para las tres transfecciones se obtuvo un valor de 1 copia de plásmido por parásito en la población analizada. Se muestra el resultado de un ensayo de qPCR para cada transfección.

A continuación, se analizó el efecto de la presencia de la región 3'UTR sobre la abundancia del ARNm reportero *cat* en estado estacionario. Se cuantificó por qRT-PCR la cantidad de ARNm *cat* relativa a *gapdh* en parásitos conteniendo el vector *pTEX-CAT-3'UTR* normalizando con parásitos conteniendo el vector control *pTEX-CAT*. Este ensayo se realizó de forma comparativa tanto en epimastigotas como en parásitos amastigotas (**FIGURA 5.8.1.2**). Se encontró que los dos largos ensayados de la región 3'UTR (124 y 142 nts. respectivamente) promueven una reducción del nivel de transcripto en estado estacionario del reportero en el estadio epimastigota en niveles similares. En cambio, en el estadio amastigota se observa que esta región regulatoria

provoca una estabilización del mensajero reportero (**FIGURA 5.8.1.2**). Es de hacer notar que no se encontró diferencias significativas entre los dos largos de las 3'UTR ensayados (test χ cuadrado).

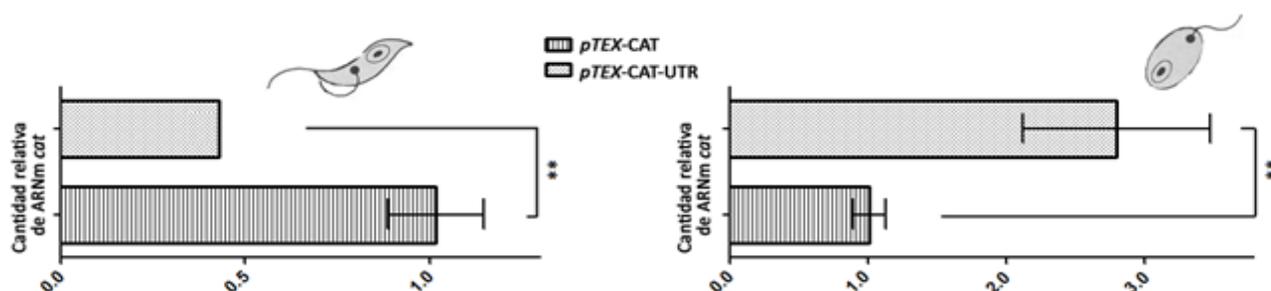


FIGURA 5.8.1.2 Efecto de la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19* en la expresión del reportero CAT. Resumen de la cuantificación del ARNm en estado estacionario del ARNm *cat* relativa a la cantidad de ARNm para *gapdh* usado como gen constitutivo de referencia. Cada barra representa el promedio de los valores representados en la **TABLA 5.8.1.4** con su desvío estándar. Los valores de ARNm *cat* en estos transfectantes fueron normalizados a 1 contra el transfectante *pTEX-CAT* usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [357]. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA). Se aplicó el test *t* para determinar la significancia estadística. (** $P < 0.005$).

En conclusión, la región 3'UTR de *tcrbp19* promueve una disminución del mensajero bajo su control, en epimastigotas. Por el contrario, en amastigotas esta región regulatoria promueve un aumento del estado estacionario del transcripto del gen reportero.

5.9 EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE TcRBP19 EN LA ESTABILIDAD DE LOS ARNm BLANCO

La expresión de genes que codifican para proteínas en eucariotas se regula a múltiples niveles, incluyendo, tal como se ha comentado previamente, la síntesis del ARN pre mensajero en el núcleo, el procesamiento nuclear de este transcrito primario a ARNm, el transporte del mismo al citoplasma, su disponibilidad para la traducción y su degradación en el citoplasma. Todas estas etapas deben estar fuertemente reguladas para garantizar la adecuada traducibilidad del ARNm, la cual determinará la cantidad de proteína resultante.

El control de la estabilidad de los ARNm constituye el principal mecanismo implicado en la regulación de la expresión génica diferencial en *T. cruzi* [223]. La regulación de este proceso, junto con los demás procesos *post*-transcripcionales, define la funcionalidad de un mensajero, dependiendo de la existencia de elementos reguladores en *cis* y factores en *trans* con los que interaccionan. Teniendo en cuenta que el 3'UTR de *tcrbp19* afecta el nivel de estado estacionario del ARN reportero que se encuentra corriente arriba y que la proteína TcRBP19 es capaz de interaccionar con esa región, surge la hipótesis de que dicha proteína constituya un factor en *trans* que tenga un efecto en la abundancia de los transcritos a los cuales reconoce. Para evaluar esta posibilidad, nos propusimos el estudio de los cambios en la abundancia, del ARNm *tcrbp19*, como consecuencia de la sobreexpresión de TcRBP19.

Por otra parte, se analizó también el efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 sobre los niveles de algunos otros ARNm blanco seleccionados (*sdh11*, *arp2/3* y *dph3*) comparando con el nivel de los mismos en parásitos salvajes. La cuantificación mediante qRT-PCR de dichos ARNm se realizó relativa al gen *gapdh* usado como control. Tanto para *tcrbp19* como para los otros tres transcritos, se observó, una disminución en la cantidad de ARNm en estado estacionario en condiciones de sobreexpresión de TcRBP19 comparado con la cantidad en parásitos salvajes (**FIGURA 5.9.1**). Este resultado sugiere que TcRBP19 actuaría como un factor potencializador de la disminución de la cantidad en estado estacionario de estos ARNm blanco en epimastigotas. La disminución de estos ARNm sugiere que los mismos no estarían siendo movilizados a polisomas en este estadio, dado que según los análisis de transcriptoma de ARN polisomal, estos genes no parecen estar afectados. Sin embargo, vale la pena destacar que para este análisis de transcriptoma, se usó una lámina de microarreglo de ADN generada en el Instituto Carlos Chagas, Curitiba y no tenemos acceso a la identidad de los genes depositados en la misma. Por tanto desconocemos si estos transcritos de interés estaban presentes. Por otro lado, la disminución de la abundancia del transcrito para la subunidad del complejo Arp2/3 como resultado de la expresión forzada de

TcRBP19 sí había sido evidenciada en análisis del transcriptoma usando ARN polisomal de amastigotas transfectantes² (TABLA 5.4.2.2).

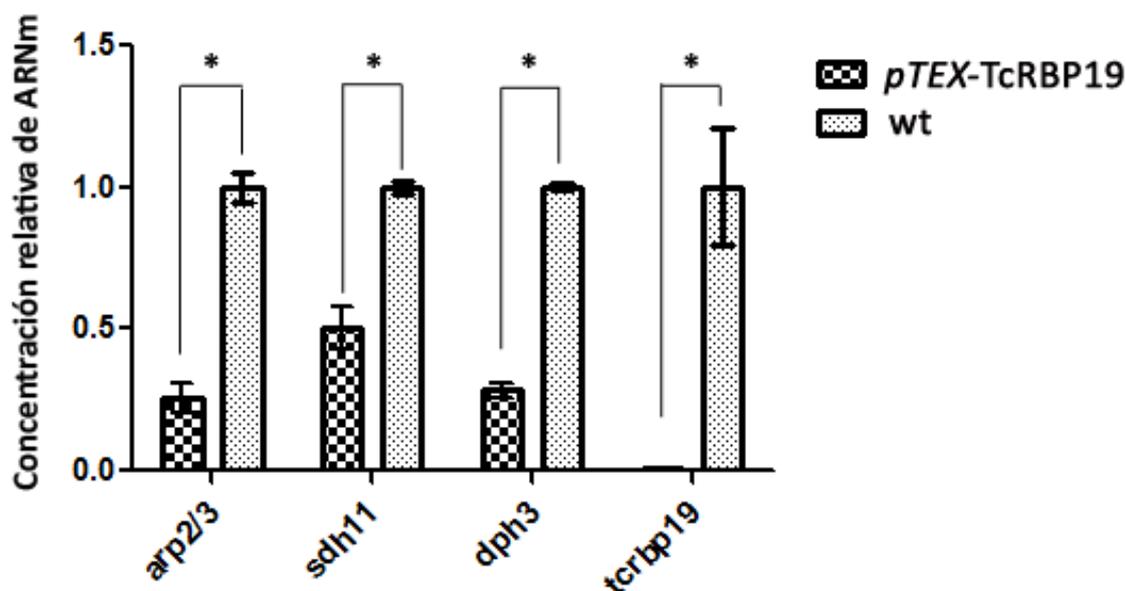


FIGURA 5.9.1. Cuantificación de algunos potenciales ARNm blanco de TcRBP19 en epimastigotas que sobreexpresan esa proteína. Se analizó por qRT-PCR la cantidad de ARNm blanco relativa al ARNm *gapdh* en parásitos salvajes y parásitos epimastigotas sobreexpresando TcRBP19. Se muestra el promedio de tres experimentos y de dos experimentos para el caso del ARNm *sdh11* con el error expresado como SEM. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA). Se aplicó el test *t* para determinar la significancia estadística ($P < 0.05$).

Este efecto negativo en la abundancia de los ARN blanco causado por sobreexpresión de TcRBP19 en el estadio epimastigota y el hecho de que en tripanosomátidos parece no existir control transcripcional, sugieren que TcRBP19 pueda tener un efecto en la estabilidad de los transcritos a los cuales se une promoviendo su degradación y por tanto afectando su abundancia. Para testar esta hipótesis, se analizó la cinética de degradación del transcripto *tcrbp19* (y luego de los otros ARNm de interés) en presencia de la droga actinomicina D que inhibe la transcripción afectando la elongación del nuevo ARNm transcripto [526].

Se cultivaron los parásitos en presencia de actinomicina D y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Se cuantificó mediante qRT-PCR la cantidad de ARNm de interés relativo al ARNm *gapdh* en las alícuotas correspondientes a los diferentes tiempos. Para poder cuantificar los niveles de ARNm *tcrbp19* endógeno, se

²No se dispone de este tipo de datos para los genes *sdh11* y *tcDph3*.

utilizaron cebadores que hibridan con la región 5'UTR del transcripto. Esta región está ausente en los transcriptos *tcrbp19* que provienen del vector *pTEX-TcRBP19* usado para alcanzar la sobreexpresión. De esta forma, se cuantificó mediante qRT-PCR la cantidad de transcripto *tcrbp19* endógeno relativo al transcripto *gapdh* usado como control. En la **FIGURA 5.9.2** se puede observar una clara caída en la estabilidad del ARNm *tcrbp19* endógeno en parásitos que sobreexpresan TcRBP19 con respecto a los parásitos control *pTEX*.

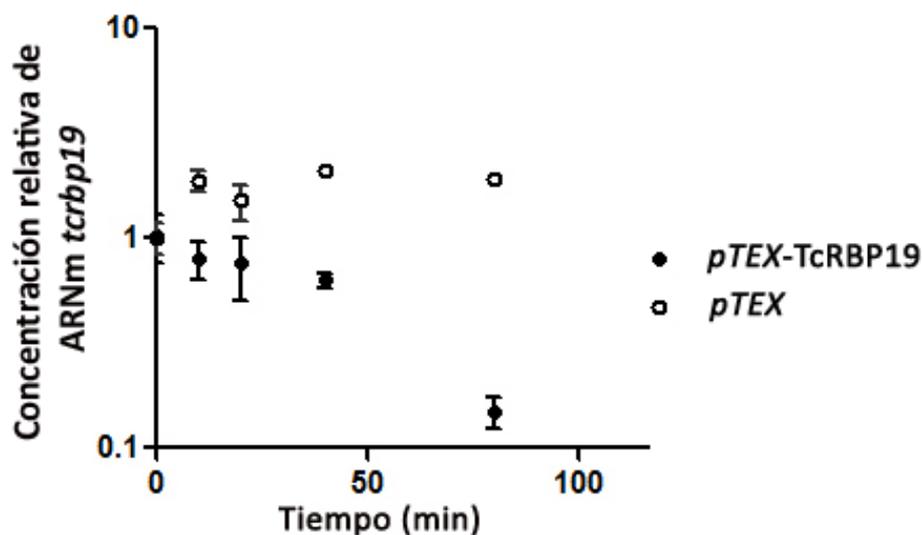


FIGURA 5.9.2 Estabilidad del ARN *tcrbp19* en epimastigotas que sobreexpresan de TcRBP19. Se analizó por qRT-PCR la cantidad de ARNm *tcrbp19* relativa al ARNm *gapdh* a distintos tiempos en presencia de ActinomicinaD en parásitos que sobreexpresan TcRBP19 y en parásitos control (transfectados con *pTEX*). Se muestra el promedio de tres experimentos con el error expresado como SEM.

Para confirmar la directa interacción de la proteína TcRBP19 ectópicamente expresada en epimastigotas con la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*, se realizaron ensayos de REMSA con los extractos proteicos totales de epimastigotas sobreexpresando TcRBP19 y la región 3'UTR de *tcrbp19* marcada radiactivamente mediante transcripción *in vitro* (**FIGURA 5.9.3**). En las condiciones ensayadas puede apreciarse la presencia de un complejo. A su vez, la incubación previa del extracto proteico con un anticuerpo anti-TcRBP19 impide la formación del mismo. Por tanto, el retardo en la sonda correspondiente a la región 3'UTR de *tcrbp19* puede atribuirse a su interacción con la proteína TcRBP19.

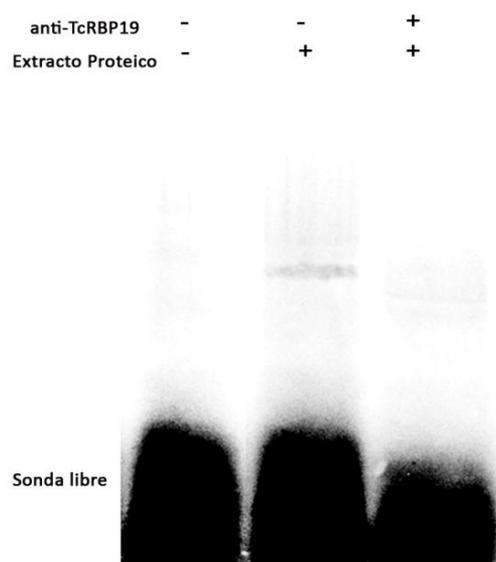


FIGURA 5.9.3 Interacción *in vitro* de la proteína TcRBP19 expresada ectópicamente en epimastigotas con la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19*. Ensayo de REMSA usando extractos proteicos totales (2 µg) de epimastigotas sobrexpresando TcRBP19, en presencia y ausencia de anticuerpo anti-TcRBP19 policlonal, y se incubaron con la sonda correspondiente a la región 3'UTR marcada con [³²P]α-UTP (50.000 cpm) y obtenida por transcripción *in vitro*.

A continuación, nos propusimos analizar si este efecto desestabilizador de la proteína TcRBP19 sobre su propio ARNm en epimastigotas se podía extender a los otros ARNm blanco seleccionados (*sdh11*, *arp2/3* y *dph3*). En la **FIGURA 5.9.4** se muestra el efecto de la sobrexpresión de TcRBP19 sobre la estabilidad de los mensajeros en el estadio epimastigota. Para los tres transcritos blanco analizados se ve una disminución de la cantidad de ARN más acelerada cuando se sobrexpresa la proteína TcRBP19.

Se ha reportado que los transcritos que codifican para proteínas metabólicas y estructurales tienen tendencia a tener vidas medias mayores, mientras que los transcritos que codifican para factores de transcripción o factores de biogénesis de ribosomas tienen vida media más corta [527,528]. Este hecho podría explicar la tendencia observada para los genes analizados en los parásitos salvajes. Como control se analizó la estabilidad del ARNm *gcn5-like*, un ARN que no parece ser blanco directo de la proteína TcRBP19, ya que si bien fue seleccionado en el ensayo de GST-pull down, dicha interacción no se verificó por qRT-PCR ni por REMSA (dato no mostrado). La estabilidad de este gen en presencia de sobrexpresión de TcRBP19 no difiere significativamente de la observada en parásitos salvajes tal como se esperaba para un gen cuyo ARNm no se une TcRBP19.

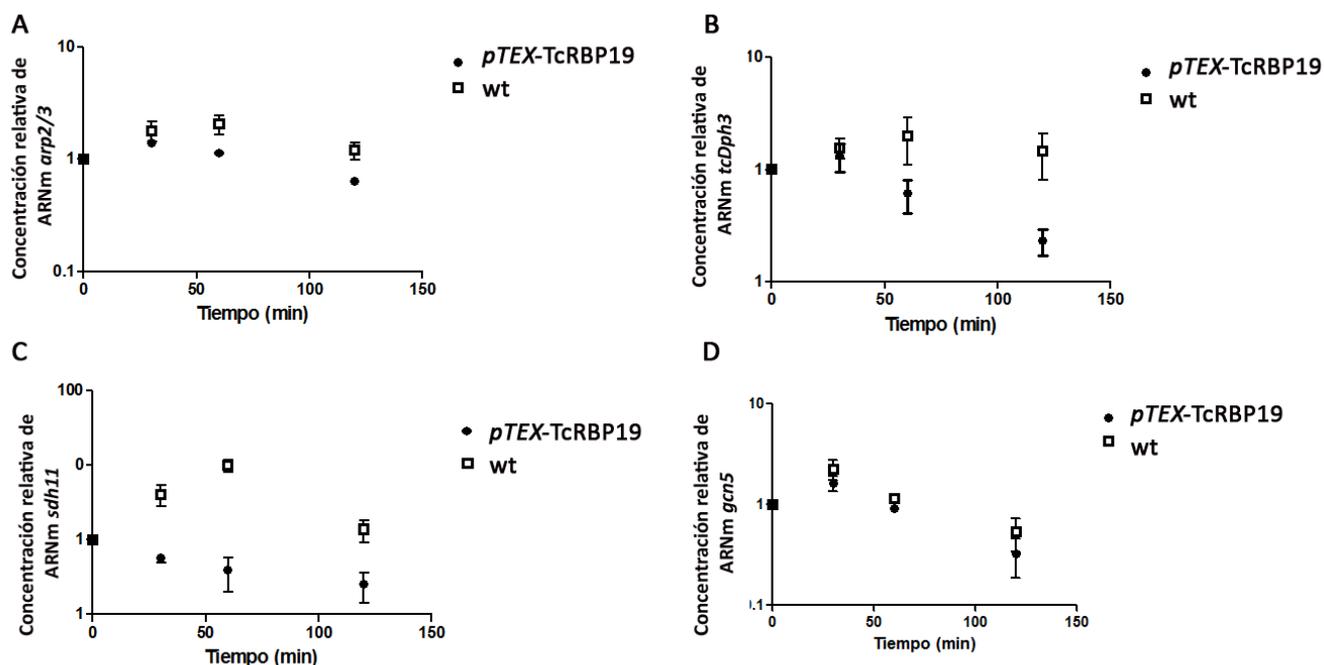


FIGURA 5.9.4 Estabilidad de ARN blanco de la proteína TcRBP19 en condiciones de sobreexpresión de la misma. Se analizó por qRT-PCR la cantidad de ARNm relativa al ARNm *gadh* a distintos tiempos en parásitos salvajes y parásitos epimastigotas sobreexpresando TcRBP19 en presencia de ActinomicinaD por diferentes tiempos. Se muestra el promedio de tres experimentos con el error expresado como SEM. Se muestra la cinética de decaimiento del ARNm que codifica para (A) la subunidad del complejo ARP 2/3, (B) la proteína homóloga a Dph3, (C) la subunidad del complejo mitocondrial succinato deshidrogenasa y (D) el factor GCN-5 like.

Mediante cuantificación relativa de la cantidad de algunos ARNm blanco, en el estadio epimastigota, se constató que dichos ARNm estaban disminuidos en parásitos que sobreexpresaban la proteína TcRBP19 con respecto a parásitos control. Se pone de manifiesto entonces una posible función desestabilizadora de parte de dicha proteína en epimastigotas transfectantes. Dicho rol desestabilizador fue analizado en epimastigotas mediante ensayos de estabilidad. Se encontró que la tasa de decaimiento, tanto del mensajero que codifica para *tcrbp19* como para otros tres ARNm blanco de TcRBP19, resulta más acelerada en parásitos que sobreexpresan TcRBP19 con respecto al control.

6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La proteína TcRBP19 es una proteína exclusiva de kinetoplastidos que presenta un dominio conservado de unión al ARN del tipo RRM. La función de esta proteína no ha podido ser inferida por homología. Estudios previos de nuestro grupo, indican que TcRBP19 es capaz de unirse a ARN *in vitro* discriminando entre diferentes ribosomas. En ensayos de *Western blot* se pudo detectar la presencia de TcRBP19 en el estadio amastigota en niveles sumamente bajos [339,340]. Surge entonces la hipótesis de que, dada la baja expresión de esta proteína, la misma podría ser catalogada como un regulador que actúa en etapas tempranas o específicas de diferentes procesos. Por otro lado, dado que TcRBP19 presenta una expresión diferencial durante el ciclo de vida expresándose en el estadio intracelular del parásito, podría estar regulando procesos relacionados con el desarrollo del ciclo de vida de *T. cruzi*. Este hecho, junto con la observación de que TcRBP19 se expresa únicamente en tripanosomátidos, hacen que esta proteína pueda ser considerada además, como un blanco para diseño racional de drogas. Finalmente, el hecho de que en *T. cruzi*, la regulación de la expresión génica opera principalmente a nivel *post*-transcripcional, confiere especial interés a las proteínas de unión al ARN y demás moléculas que modulan el destino de los ARNm. Por lo antes expuesto, nos propusimos el estudio de la funcionalidad de esta proteína de unión a ARN para comprender los eventos de regulación génica en estos parásitos.

Para acercarnos a conocer la función de TcRBP19, analizamos el ciclo de vida de *T. cruzi* usando parásitos que sobrepresan la proteína TcRBP19. La expresión ectópica de TcRBP19 afecta el desarrollo del ciclo de vida de *T. cruzi*. Parásitos epimastigotas expresando ectópicamente la proteína TcRBP19 tienen una capacidad disminuida de desarrollar el proceso de metacicloogénesis *in vitro*. Por otro lado, los metacíclicos sobrepresando esta proteína, tienen una capacidad de infección disminuida comparado con parásitos control. Este hecho, sugiere la **participación de TcRBP19 en la regulación temprana y específica de mecanismos de respuesta a cambios ambientales, que desencadenan el proceso de metacicloogénesis y vinculados con la invasión de célula hospedera**. El estudio de la infectividad disminuida de estos parásitos transfectantes en organismos modelo vivos, es un desafío que nos proponemos abordar en futuros trabajos.

Se adjudicó una localización citoplasmática para TcRBP19. Mediante fraccionamiento subcelular en epimastigotas sobrepresando TcRBP19, se observa además una co-sedimentación de la proteína TcRBP19 con los polisomas. Este hallazgo sugiere que **TcRBP19 podría estar involucrada en mecanismos de localización de ARNm al pool de ARNs traduccionalmente activos, o en la modulación del propio proceso de traducción**. El efecto de la proteína en ensayos de traducción *in vitro* usando parásitos sobrepresando TcRBP19 podría ayudar a esclarecer esta hipótesis.

La sobrepresión de TcRBP19 afecta los niveles de ciertos ARNs traduccionalmente activos en estado estacionario de estadios epimastigota y amastigota. Los transcriptos afectados identificados en epimastigotas son diferentes a

los afectados en amastigotas. No se pudo definir ningún agrupamiento entre los genes afectados referente a función, localización o expresión a lo largo del ciclo de vida. De cualquier manera, estos resultados sugieren que **TcRBP19 estaría participando en cascadas regulatorias a través de diferentes mecanismos que involucrarían factores auxiliares estadio específicos. En este contexto TcRBP19 podría unirse a los ARNm movilizándolos selectivamente a los polisomas o podría regular indirectamente la abundancia de los ARNm afectados mediante asociación con factores específicos capaces de alterar la tasa de degradación de dichos ARNm.** Sería interesante entonces, analizar también mediante el uso de la misma tecnología usada o de técnicas de secuenciación masiva, el cambio en la abundancia de los ARNs totales como resultado de la sobreexpresión de TcRBP19.

Se identificaron por espectrometría de masas diferentes proteínas candidatas a interactuar directa o indirectamente con TcRBP19. Se abordaron diferentes estrategias donde se analizó por un lado, la interacción de TcRBP19 *in vitro* con proteínas provenientes de extractos proteicos de epimastigotas salvajes. Por otro lado, se estudió la interacción *in vivo* de TcRBP19 con proteínas de epimastigotas sobreexpresando TcRBP19. **Las proteínas identificadas como compañeras de acción de TcRBP19 incluyen proteínas de choque térmico, proteínas del metabolismo, proteínas involucradas en mecanismos redox de detoxificación, proteínas estructurales, histonas y factores de elongación de la traducción. Los resultados de espectrometría de masas indican que TcRBP19 podría estar sujeta a algún tipo de modificación *post*-traduccional.** Por las características de las proteínas de interacción identificadas, surgen dos hipótesis. En primer lugar, se podría plantear la interacción de TcRBP19 con proteínas relacionadas con el proceso de invasión del parásito a la célula hospedera. La segunda hipótesis propone un rol en la traducción mediante la interacción de TcRBP19 en los polisomas con factores de elongación de la traducción. Queda pendiente para futuros proyectos analizar la modificación a la que está sujeta la proteína TcRBP19 y estudiar si ambas isoformas son efectivamente activas en epimastigotas, y si cumplen la misma función. Como perspectiva resta la confirmación de las interacciones con las proteínas identificadas mediante otras metodologías alternativas. Sería además interesante, realizar estos experimentos con proteínas de amastigotas para identificar los eventuales compañeros de acción específicos de estadio.

Aproximaciones ribonómicas con ARN de epimastigotas y de amastigotas permitieron identificar diferentes transcritos capaces de interactuar *in vitro* con TcRBP19. Estos se caracterizan por poseer regiones ricas en U en sus 3'UTR. En particular, los transcritos seleccionados a partir de ARN de amastigotas pueden clasificarse en pequeños grupos con un patrón de expresión común a lo largo del ciclo de vida lo que sugiere que existiría una co-regulación de los mismos. **Los datos obtenidos indican que TcRBP19 es capaz de unirse a su propio ARNm sugiriendo la existencia de un posible mecanismo de auto-regulación. TcRBP19 constituye el primer ejemplo en tripanosomátidos de una RBP capaz de interactuar con el ARN que la codifica.** Se identificaron además, otros

tres transcritos que también son capturados por TcRBP19 en experimentos con ARN de epimastigotas y de amastigotas. Todos ellos codifican para proteínas hipotéticas conservadas cuyo perfil de transcripción a lo largo del ciclo de vida es semejante entre sí. Por otro lado, se confirmó además usando otras metodologías, la interacción *in vitro* de TcRBP19 con otros tres ARN para los cuales existen datos asignados por homología: un ARN que codifica para una subunidad del complejo ARP2/3, una proteína con motivo dedo de Zinc (TcDph3) y una subunidad SDH11 del complejo mitocondrial II. En base a los resultados anteriores, resultaría importante para conocer la función de TcRBP19, estudiar si estos ARNm blanco están siendo movilizados por TcRBP19 para ser traducidos en los polisomas o para ser degradados. Queda pendiente además, la confirmación del resto de los ARNm seleccionados así como también el análisis del perfil de expresión de los mismos en condiciones de sobreexpresión de TcRBP19.

La proteína TcRBP19 recombinante es capaz de interactuar *in vitro* con las regiones 3'UTR de al menos tres de los transcritos seleccionados en el GST-pull down con ARN de amastigotas (*tcrbp19*, *arp2/3* y *sdh11*) y con algunas ribosondas sintéticas ricas en U. La proteína TcRBP19 expresada ectópicamente en epimastigotas, es también capaz de interactuar con la región 3'UTR del ARNm que la codifica. Como perspectiva a futuro nos planteamos delimitar los elementos estructurales o de secuencia presentes en la región 3'UTR de *tcrbp19* y de los otros ARN blanco responsables de la interacción. Se pretende también analizar si existe interacción de TcRBP19 con las regiones 5'UTR y regiones codificantes.

Mediante el uso de un gen reportero, se pudo inferir que **la región 3'UTR de *tcrbp19* confiere regulación diferencial a lo largo del ciclo de vida.** Se observó que la presencia de esta región provoca un aumento de la abundancia de transcrito en estado estacionario en amastigotas y una disminución en epimastigotas.

El análisis del nivel de estado estacionario de algunos transcritos blanco, en condiciones de sobreexpresión de TcRBP19, sugiere que esta proteína podría tener una función de regulación negativa en epimastigotas. Ensayos de estabilidad permitieron concluir que **la expresión ectópica de TcRBP19 afecta negativamente la estabilidad de los ARNm blanco testados en epimastigotas.** Sería interesante estudiar la estabilidad de los ARNm blanco de TcRBP19 en amastigotas y ver si existe un fenómeno asociado a este estadio. Por otro lado, resta analizar la variación en la estabilidad de los demás ARNm seleccionados como consecuencia de la expresión forzada de TcRBP19. En este aspecto, no se descarta la realización de estudios de estabilidad a gran escala usando ARN total en lugar de ARN polisomal.

Basándonos en estos hallazgos, podemos plantear **un modelo para la función de TcRBP19 en epimastigotas de *T. cruzi* (FIGURA 6.1).** TcRBP19 interactúa con el ARNm que la codifica, más precisamente con su región 3'UTR. Esta interacción provoca una disminución de los niveles de este ARNm. Sin embargo, no hay evidencia de que

TcRBP19 tenga por sí misma capacidad degradativa ni pudo comprobarse la interacción directa de TcRBP19 con la maquinaria de degradación. Podríamos estar entonces frente a una interacción transitoria, ó que alguna de las proteínas identificadas como compañera de acción actúe como proteína *moonlighting*, actuando como nexo y/o convocando maquinaria de degradación. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos con reporteros a nivel proteico, en este modelo se incluye una posible actividad reguladora de la traducción dirigida por elementos presentes la región 3'UTR (**FIGURA 6.2**). En este contexto, es tentador proponer una función dual de TcRBP19 en epimastigotas que incluya, además del rol en la regulación de la abundancia de mensajero, la inhibición de la traducción directa o indirectamente, al unirse a la región 3'UTR de ciertos ARNm en los polisomas. Esta propuesta se basa en dos hallazgos, en primer lugar está el hecho que TcRBP19 se asocie a polisomas en epimastigotas y por otro lado se identificaron factores de elongación de la traducción como proteínas de interacción con TcRBP19. Estos dos mecanismos aunados serían responsables de mantener un estricto control de la cantidad de proteína TcRBP19 en epimastigotas que debe mantenerse en niveles sumamente bajos.

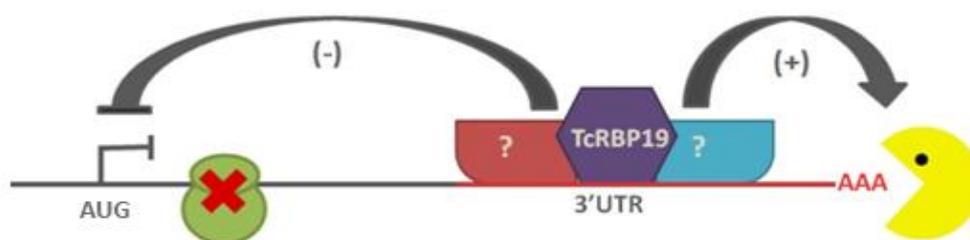


FIGURA 6.1 Modelo propuesto para la función de TcRBP19 en epimastigotas. La proteína TcRBP19 unida a la región 3'UTR promueve la degradación del ARNm *tcrbp19* en epimastigotas reclutando directa o indirectamente la maquinaria de degradación de ARN. Por otro lado, esta región 3'UTR podría regular de alguna forma la eficiencia traduccional, proceso que podría estar mediado por la proteína TcRBP19.

Son varios los mecanismos regulatorios que afectan la traducción [529]. Se ha postulado también que los ribosomas no serían simples máquinas de traducción, sino que constituyen elementos regulatorios que pueden influenciar selectivamente la traducción de varios ARNm, y en algunos casos los ribosomas pueden disparar el decaimiento de los ARNm a los cuales están unidos [530]. Por tanto, la presencia de TcRBP19 en la fracción polisomal, podría deberse a la interacción con la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19* que está siendo traducido en los polisomas. Esta interacción podría darse en etapas tempranas, cuando TcRBP19 es recién sintetizada, y no necesariamente involucra una asociación directa de TcRBP19 con la maquinaria traduccional (**FIGURA 6.2**). Sustentando esta hipótesis, existe evidencia a través de datos de RNA-Seq de análisis de perfil de ribosomas, que el ARNm *tcrbp19* se encuentra en los polisomas traduccionalmente activos existiendo huellas de ribosomas en

epimastigotas, y que además, existen pausas en la traducción hacia el extremo 3' del ARNm *tcrbp19* (Smircich, comunicación personal). Estas pausas en la traducción podrían ser causa o consecuencia, directa o indirecta, de la interacción con TcRBP19. Las mismas contribuirían a un enlentecimiento de la traducción que permitiría que la proteína TcRBP19 recientemente traducida, se una a la región 3'UTR del ARNm *tcrbp19* reclutando la maquinaria de degradación del ARNm y eventualmente reclutando maquinaria de degradación de la proteína y afectando la traducción.

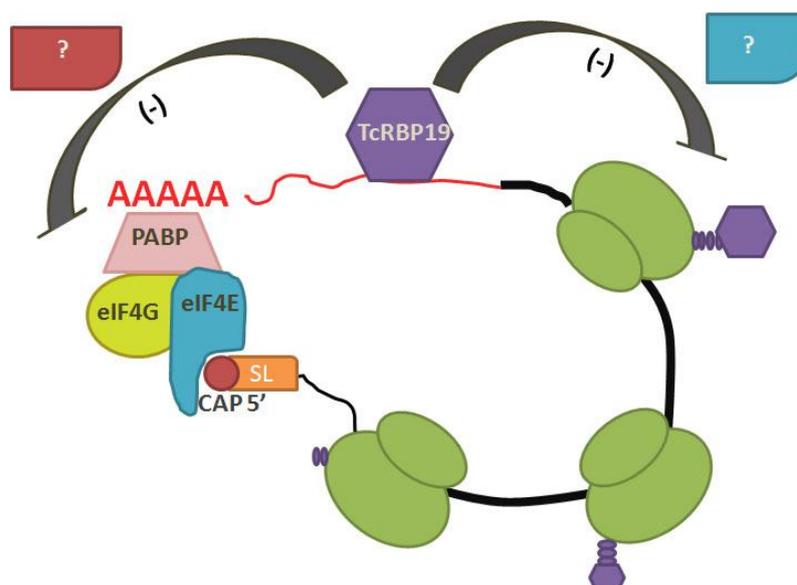


FIGURA 6.2 Modelo propuesto de auto-regulación negativa. Este modelo explicaría la presencia de TcRBP19 en la fracción polisomal y su posible rol en la regulación de la traducción y degradación de su propio ARNm en epimastigotas. La proteína TcRBP19 recientemente sintetizada se uniría a la región 3'UTR del ARNm que la codifica. Desde allí, interaccionaría de manera directa o indirecta con el ensamblaje de la maquinaria traduccional inhibiendo la traducción. Por otro lado, mediante la interacción de TcRBP19 con factores de elongación de la traducción y/o con otros factores aún desconocidos, no se puede descartar que se promuevan pausas en la traducción, que podrían inducir alguna señal que convoque la maquinaria de degradación de proteína, y/o de degradación del ARNm.

En este trabajo se identificó un mecanismo post-transcripcional de regulación, hasta ahora no descrito en tripanosomátidos. La auto-regulación negativa, puede proveer un estricto control particularmente relevante en un organismo donde está ampliamente aceptado que la regulación de la expresión génica se da a nivel de mecanismos post-transcripcionales. Mediante este mecanismo los niveles de TcRBP19 pueden ser mantenidos en niveles no detectables en epimastigotas.

1. Chagas C (1909) Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 159-219.
2. De Souza W (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des 8: 269-285.
3. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB (2012) Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis 54: 845-852.
4. Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, et al. (2012) Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Non-Endemic Areas: Evaluation of a Screening Program in a Tertiary Care Hospital in Barcelona, Spain. Am J Trop Med Hyg.
5. Alarcon de Noya B, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, et al. (2010) Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis 201: 1308-1315.
6. Buscaglia CA, Di Noia JM (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. Microbes Infect 5: 419-427.
7. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 1051-1054.
8. Teixeira SM, de Paiva RM, Kangussu-Marcolino MM, Darocha WD (2012) Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. Genet Mol Biol 35: 1-17.
9. Anon (1998) Uruguay declared free of Chagas disease transmission. TDR News: 6.
10. Salvatella R, Schofield CJ (2006) Enfermedad de Chagas: Iniciativas para su control en Latinoamérica. 1: 36-46.
11. Cantey PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, et al. (2012) The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. Transfusion 52: 1922-1930.
12. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP (2011) *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. Clin Microbiol Rev 24: 655-681.
13. Moloney A (2009) Trial renews interest in Chagas' disease. Lancet 374: 1490.
14. Coura JR, Vinas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 465: S6-S7.
15. Yoshida N (2008) *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitol Int 57: 105-109.
16. De Souza W (2008) Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: 313-325.
17. Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V (1987) Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol 64: 474-484.

18. Dvorak JA, Hyde TP (1973) *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol* 34: 268-283.
19. Meyer H, Xavier De Oliveira M (1948) Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures; a 4-year study. *Parasitology* 39: 91-94.
20. Costales J, Rowland EC (2007) A role for protease activity and host-cell permeability during the process of *Trypanosoma cruzi* egress from infected cells. *J Parasitol* 93: 1350-1359.
21. Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ (1999) *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol* 92: 263-274.
22. Behbehani K (1973) Developmental cycles of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909) in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Parasitology* 66: 343-353.
23. Nogueira N, Cohn Z (1976) *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med* 143: 1402-1420.
24. Pan SC (1978) *Trypanosoma cruzi*: in vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells. *Exp Parasitol* 45: 274-286.
25. Carvalho RM, Meirelles MN, de Souza W, Leon W (1981) Isolation of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with mouse macrophages in vitro. *Infect Immun* 33: 546-554.
26. McCabe RE, Remington JS, Araujo FG (1984) Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 46: 372-376.
27. Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med* 168: 649-659.
28. Mortara RA (1991) *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol* 73: 1-14.
29. Burleigh BA, Andrews NW (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49: 175-200.
30. Scharfstein J, Morrot A (1999) A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 51-63.
31. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S (1985) In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 16: 315-327.
32. Hernandez R, Cevallos AM, Nepomuceno-Mejia T, Lopez-Villasenor I (2012) Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitol Res* 111: 509-514.
33. Goldenberg S, Avila AR (2011) Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. *Adv Parasitol* 75: 285-305.
34. Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, et al. (2002) Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1213-1220.

35. Navarro MC, De Lima AR, Askue J, Contreras VT (2003) Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 83-91.
36. Caradonna KL, Burleigh BA (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 76: 33-61.
37. Alves MJ, Mortara RA (2009) A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 76-88.
38. Alves MJ, Colli W (2008) Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem* 47: 58-69.
39. De Pablos LM, Osuna A (2012) Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun* 80: 2258-2264.
40. Alves MJ, Colli W (2007) *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life* 59: 274-279.
41. Giorgi ME, de Lederkremer RM (2011) Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydr Res* 346: 1389-1393.
42. Alves MJ, Abuin G, Kuwajima VY, Colli W (1986) Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 21: 75-82.
43. De Souza W (2009) Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 89-100.
44. Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MN, Pereira MC (2004) *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol* 107: 20-30.
45. Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJ (1994) An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 65: 85-94.
46. Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, et al. (1999) Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem* 274: 3461-3468.
47. Ouaisi MA, Afchain D, Capron A, Grimaud JA (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308: 380-382.
48. Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJ, Colli W (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem* 277: 20756-20762.
49. Yoshida N (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78: 87-111.

50. Ramirez MI, Ruiz Rde C, Araya JE, Da Silveira JF, Yoshida N (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun* 61: 3636-3641.
51. Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* 4: 229-236.
52. Dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, et al. (2012) The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1779.
53. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
54. Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, et al. (1992) Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 52: 175-184.
55. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Cazzulo JJ, Goni F (2003) Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 130: 23-29.
56. De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010.
57. Horn D (2004) The molecular control of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Curr Mol Med* 4: 563-576.
58. Voss TS, Healer J, Marty AJ, Duffy MF, Thompson JK, et al. (2006) A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 439: 1004-1008.
59. Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leao AC, daRocha WD, Pais FS, et al. (2009) Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 37: 3407-3417.
60. Pereira ME, Zhang K, Gong Y, Herrera EM, Ming M (1996) Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect Immun* 64: 3884-3892.
61. Weston D, Patel B, Van Voorhis WC (1999) Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Mol Biochem Parasitol* 98: 105-116.
62. Dzikowski R, Deitsch KW (2009) Genetics of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Curr Genet* 55: 103-110.
63. Morrison WI (2009) Progress towards understanding the immunobiology of *Theileria* parasites. *Parasitology* 136: 1415-1426.
64. Ropolo AS, Touz MC (2010) A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *Scientific World Journal* 10: 2019-2031.
65. Burleigh BA, Andrews NW (1998) Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol* 1: 461-465.

66. Yoshida N (2002) *Trypanosoma cruzi* cell invasion mechanisms.; Tyler KMaM, M.A., editor: Kluwer Academic Publishers.
67. Yoshida N, Cortez M (2008) *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem* 47: 82-91.
68. Kahn SJ, Wleklinski M, Ezekowitz RA, Coder D, Aruffo A, et al. (1996) The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infect Immun* 64: 2649-2656.
69. Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, et al. (2005) Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc* 77: 77-94.
70. da Silva CV, Luquetti AO, Rassi A, Mortara RA (2006) Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microbes Infect* 8: 2120-2129.
71. da Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz MC, et al. (2009) Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes Infect* 11: 563-570.
72. Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, et al. (2008) Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem* 47: 101-109.
73. Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, et al. (2007) Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol* 37: 1431-1441.
74. Bambino-Medeiros R, Oliveira FO, Calvet CM, Vicente D, Toma L, et al. (2011) Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 138: 593-601.
75. Osorio L, Rios I, Gutierrez B, Gonzalez J (2012) Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect*.
76. Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R (2009) Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol* 12: 415-421.
77. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, et al. (2008) Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J* 410: 359-368.
78. Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, et al. (2009) Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int J Parasitol* 39: 1455-1464.
79. Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM (2002) *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13453-13458.
80. Mateo H, Marin C, Perez-Cordon G, Sanchez-Moreno M (2008) Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 271-276.

81. Tambourgi DV, Kipnis TL, da Silva WD, Joiner KA, Sher A, et al. (1993) A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect Immun* 61: 3656-3663.
82. Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M (1991) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol* 147: 2240-2247.
83. Valck C, Ramirez G, Lopez N, Ribeiro CH, Maldonado I, et al. (2010) Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Mol Immunol* 47: 1516-1521.
84. Cestari Idos S, Krarup A, Sim RB, Inal JM, Ramirez MI (2009) Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol* 47: 426-437.
85. Ouaisi MA, Dubremetz JF, Schoneck R, Fernandez-Gomez R, Gomez-Corvera R, et al. (1995) *Trypanosoma cruzi*: a 52-kDa protein sharing sequence homology with glutathione S-transferase is localized in parasite organelles morphologically resembling reservosomes. *Exp Parasitol* 81: 453-461.
86. Allaoui A, Francois C, Zemzoumi K, Guilvard E, Ouaisi A (1999) Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. *Mol Microbiol* 32: 1273-1286.
87. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, et al. (2002) The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168: 6366-6374.
88. Fernandez-Gomez R, Esteban S, Gomez-Corvera R, Zoulika K, Ouaisi A (1998) *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J Immunol* 160: 3471-3479.
89. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI (2012) *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol* 188: 1942-1952.
90. Martinez-Palomo A, DeSouza W, Gonzalez-Robles A (1976) Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biol* 69: 507-513.
91. De Souza W (2007) Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. *Parasitol Int* 56: 161-170.
92. De Souza W, Martinez-Palomo A, Gonzalez-Robles A (1978) The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze-fracture. *J Cell Sci* 33: 285-299.
93. Soares TC, de Souza W (1977) Fixation of trypanosomatids for electron microscopy with the glutaraldehyde-tannic acid method. *Z Parasitenkd* 53: 149-154.
94. Bastin P, Pullen TJ, Moreira-Leite FF, Gull K (2000) Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect* 2: 1865-1874.

95. Beard CA, Saborio JL, Tewari D, Krieglstein KG, Henschen AH, et al. (1992) Evidence for two distinct major protein components, PAR 1 and PAR 2, in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. Complete nucleotide sequence of PAR. *J Biol Chem* 267: 21656-21662.
96. Bastin P, Gull K (1999) Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of trypanosomes. *Protist* 150: 113-123.
97. Sant'Anna C, Campanati L, Gadelha C, Lourenco D, Labati-Terra L, et al. (2005) Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). *Histochem Cell Biol* 124: 87-95.
98. De Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL (2009) Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Prog Histochem Cytochem* 44: 67-124.
99. Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, et al. (2006) Reservosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res* 99: 325-327.
100. Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenco D, de Souza W, et al. (2009) Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 9: 1782-1794.
101. Araripe JR, Cunha e Silva NL, Leal ST, de Souza W, Rondinelli E (2004) *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 397-402.
102. Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN (2005) Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3: 251-261.
103. Linder JC, Staehelin LA (1977) Plasma membrane specializations in a trypanosomatid flagellate. *J Ultrastruct Res* 60: 246-262.
104. Ulrich PN, Jimenez V, Park M, Martins VP, Atwood J, 3rd, et al. (2011) Identification of contractile vacuole proteins in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6: e18013.
105. Opperdoes FR, Borst P (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 80: 360-364.
106. Souto-Padron T, de Souza W, Heuser JE (1984) Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. *J Cell Sci* 69: 167-178.
107. Ogbadoyi EO, Robinson DR, Gull K (2003) A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell* 14: 1769-1779.
108. Shapiro TA, Englund PT (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49: 117-143.
109. Schenkman S, Pascoalino Bdos S, Nardelli SC (2011) Nuclear structure of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 75: 251-283.
110. 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.

111. Elias MC, Marques-Porto R, Freymuller E, Schenkman S (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol* 112: 79-90.
112. Atwood JA, 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, et al. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309: 473-476.
113. Solari AJ (1995) Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell* 19: 65-84.
114. Daniels JP, Gull K, Wickstead B (2010) Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 552-569.
115. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-422.
116. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.
117. Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL (2009) Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* 10: 255.
118. Franzen O, Ochaya S, Sherwood E, Lewis MD, Llewellyn MS, et al. (2011) Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e984.
119. Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodriguez MA (2010) Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010: 726045.
120. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, et al. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409.
121. Padilla-Mejia NE, Florencio-Martinez LE, Figueroa-Angulo EE, Manning-Cela RG, Hernandez-Rivas R, et al. (2009) Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics* 10: 232.
122. Cordingley JS (1985) Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 17: 321-330.
123. Hernandez-Rivas R, Martinez-Calvillo S, Romero M, Hernandez R (1992) *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett* 71: 63-67.
124. Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, et al. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11: 1291-1299.
125. Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ (2004) Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3: 506-517.
126. Monnerat S, Martinez-Calvillo S, Worthey E, Myler PJ, Stuart KD, et al. (2004) Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 134: 233-243.

127. Dubessay P, Ravel C, Bastien P, Crobu L, Dedet JP, et al. (2002) The switch region on *Leishmania* major chromosome 1 is not required for mitotic stability or gene expression, but appears to be essential. *Nucleic Acids Res* 30: 3692-3697.
128. Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, et al. (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 23: 1063-1076.
129. Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirde P, et al. (2008) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res* 7: 2357-2367.
130. Nakayasu ES, Yashunsky DV, Nohara LL, Torrecilhas AC, Nikolaev AV, et al. (2009) GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Syst Biol* 5: 261.
131. Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, Teixeira AR, et al. (2004) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. *J Proteome Res* 3: 517-524.
132. Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, et al. (2004) Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* 4: 1052-1059.
133. Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, Pineyro MD, et al. (2004) Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 34: 881-886.
134. Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, et al. (2007) Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom* 42: 1422-1432.
135. Sodre CL, Chapeaurouge AD, Kalume DE, de Mendonca Lima L, Perales J, et al. (2009) Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Arch Microbiol* 191: 177-184.
136. De Godoy LM, Marchini FK, Pavoni DP, Rampazzo Rde C, Probst CM, et al. (2012) Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics* 12: 2694-2703.
137. Atwood JA, 3rd, Minning T, Ludolf F, Nuccio A, Weatherly DB, et al. (2006) Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. *J Proteome Res* 5: 3376-3384.
138. Cordero EM, Nakayasu ES, Gentil LG, Yoshida N, Almeida IC, et al. (2009) Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteome Res* 8: 3642-3652.
139. De Diego JL, Katz JM, Marshall P, Gutierrez B, Manning JE, et al. (2001) The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 40: 1053-1062.
140. Brennand A, Gualdrón-Lopez M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, et al. (2011) Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol* 177: 83-99.
141. Pham VP, Qi CC, Gottesdiener KM (1996) A detailed mutational analysis of the VSG gene expression site promoter. *Mol Biochem Parasitol* 75: 241-254.

142. Berberof M, Vanhamme L, Alexandre S, Lips S, Tebabi P, et al. (2000) A single-stranded DNA-binding protein shared by telomeric repeats, the variant surface glycoprotein transcription promoter and the procyclin transcription terminator of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 28: 597-604.
143. Laufer G, Gunzl A (2001) In-vitro competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 113: 55-65.
144. Brown SD, Van der Ploeg LH (1994) Single-stranded DNA-protein binding in the procyclic acidic repetitive protein (PARP) promoter of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 65: 109-122.
145. Günzl A, Bruderer T, Laufer G, Schimanski B, Tu L, et al. (2003) RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* 2: 542-551.
146. Dietrich P, Soares MB, Affonso MH, Floeter-Winter LM (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 125: 103-107.
147. Martinez-Calvillo S, Hernandez R (1994) *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142: 243-247.
148. Gay LS, Wilson ME, Donelson JE (1996) The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 77: 193-200.
149. Mburu PW, Beebee TJ (1993) Preliminary characterisation and partial purification of ribosomal gene promoter-binding proteins from *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* 1172: 5-11.
150. Janz L, Hug M, Clayton C (1994) Factors that bind to RNA polymerase I promoter sequences of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 65: 99-108.
151. Bell SD, Barry JD (1995) Trypanosome nuclear factors which bind to internal promoter elements of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 23: 3103-3110.
152. Tschudi C, Ullut E (2002) Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids. *Gene Expr* 10: 3-16.
153. Lee MG (1996) An RNA polymerase II promoter in the hsp70 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 16: 1220-1230.
154. Ben Amar MF, Jefferies D, Pays A, Bakalara N, Kendall G, et al. (1991) The actin gene promoter of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 19: 5857-5862.
155. Teixeira SM (1998) Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res* 31: 1503-1516.
156. Tyler KM, Miles MA (2003) *American trypanosomiasis*. Boston: Kluwer Academic Publishers. 166 p. p.
157. Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* 21: 1881-1888.
158. Campbell DA, Sturm NR, Yu MC (2000) Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol Today* 16: 78-82.

159. Luo H, Gilinger G, Mukherjee D, Bellofatto V (1999) Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that includes an initiator element. *J Biol Chem* 274: 31947-31954.
160. Schimanski B, Nguyen TN, Gunzl A (2005) Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 25: 7303-7313.
161. Das A, Zhang Q, Palenchar JB, Chatterjee B, Cross GA, et al. (2005) Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Mol Cell Biol* 25: 7314-7322.
162. Gilinger G, Bellofatto V (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* 29: 1556-1564.
163. Kolev NG, Franklin JB, Carmi S, Shi H, Michaeli S, et al. (2010) The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. *PLoS Pathog* 6: e1001090.
164. Ruan JP, Arhin GK, Ullu E, Tschudi C (2004) Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol Cell Biol* 24: 9610-9618.
165. Schimanski B, Brandenburg J, Nguyen TN, Caimano MJ, Gunzl A (2006) A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 34: 1676-1684.
166. Palenchar JB, Liu W, Palenchar PM, Bellofatto V (2006) A divergent transcription factor TFIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryot Cell* 5: 293-300.
167. Cribb P, Esteban L, Trochine A, Girardini J, Serra E (2010) *Trypanosoma cruzi* TBP shows preference for C/G-rich DNA sequences in vitro. *Exp Parasitol* 124: 346-349.
168. Cribb P, Serra E (2009) One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex. *Int J Parasitol* 39: 525-532.
169. Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010: 525241.
170. Respuela P, Ferella M, Rada-Iglesias A, Aslund L (2008) Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283: 15884-15892.
171. Wright JR, Siegel TN, Cross GA (2010) Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 172: 141-144.
172. Villanova GV, Nardelli SC, Cribb P, Magdaleno A, Silber AM, et al. (2009) *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. *Int J Parasitol* 39: 665-673.
173. Croken MM, Nardelli SC, Kim K (2012) Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends Parasitol* 28: 202-213.

174. Ekanayake D, Sabatini R (2011) Epigenetic regulation of polymerase II transcription initiation in *Trypanosoma cruzi*: modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by O-linked thymine DNA glucosylation. *Eukaryot Cell* 10: 1465-1472.
175. Tiengwe C, Marcello L, Farr H, Dickens N, Kelly S, et al. (2012) Genome-wide Analysis Reveals Extensive Functional Interaction between DNA Replication Initiation and Transcription in the Genome of *Trypanosoma brucei*. *Cell Rep* 2: 185-197.
176. Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2: 830-840.
177. Michaeli S (2011) Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol* 6: 459-474.
178. Pays E, Vanhamme L, Berberof M (1994) Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 48: 25-52.
179. Parsons M, Nelson RG, Watkins KP, Agabian N (1984) Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* 38: 309-316.
180. LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7: 996-1007.
181. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8: 491-501.
182. Agabian N (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.
183. Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC (1992) Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 267: 9805-9815.
184. Siegel TN, Tan KS, Cross GA (2005) Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 25: 9586-9594.
185. Hummel HS, Gillespie RD, Swindle J (2000) Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem* 275: 35522-35531.
186. Ullu E, Matthews KR, Tschudi C (1993) Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* 13: 720-725.
187. Jager AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D'Orso I, Frasch AC (2007) mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2035-2042.
188. Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, et al. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6: 163-169.
189. Siegel TN, Hekstra DR, Wang X, Dewell S, Cross GA (2010) Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res* 38: 4946-4957.

190. Tan TH, Pach R, Crausaz A, Ivens A, Schneider A (2002) tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Mol Cell Biol* 22: 3707-3717.
191. Shaw JM, Feagin JE, 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.
192. Eisenberg E, Nemzer S, Kinar Y, Sorek R, Rechavi G, et al. (2005) Is abundant A-to-I RNA editing primate-specific? *Trends Genet* 21: 77-81.
193. Goringer HU (2012) 'Gestalt,' Composition and Function of the *Trypanosoma brucei* Editosome. *Annu Rev Microbiol* 66: 65-82.
194. Moshiri H, Salavati R (2010) A fluorescence-based reporter substrate for monitoring RNA editing in trypanosomatid pathogens. *Nucleic Acids Res* 38: e138.
195. Panigrahi AK, Ernst NL, Domingo GJ, Fleck M, Salavati R, et al. (2006) Compositionally and functionally distinct editosomes in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 12: 1038-1049.
196. Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R (2003) Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *Rna* 9: 265-276.
197. Kelly S, Kramer S, Schwede A, Maini PK, Gull K, et al. (2012) Genome organization is a major component of gene expression control in response to stress and during the cell division cycle in trypanosomes. *Open Biol* 2: 120033.
198. Ouellette M, Papadopoulou B (2009) Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *J Biol* 8: 100.
199. Mata J, Marguerat S, Bahler J (2005) Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* 30: 506-514.
200. Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G (2008) RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* 582: 1977-1986.
201. Keene JD (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8: 533-543.
202. Kramer S (2012) Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol* 181: 61-72.
203. Hieronymus H, Silver PA (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18: 2845-2860.
204. Schullery DS, Ostrowski J, Denisenko ON, Stempka L, Shnyreva M, et al. (1999) Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. *J Biol Chem* 274: 15101-15109.
205. Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, et al. (2007) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25: 543-557.

206. Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, et al. (2005) p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* 20: 891-903.
207. Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Suarez Y, Sinha S, et al. (2003) Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J Biol Chem* 278: 33039-33048.
208. Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Sun Y, Huynh Y, et al. (2003) Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1. *J Biol Chem* 278: 33029-33038.
209. Yu MC, Bachand F, McBride AE, Komili S, Casolari JM, et al. (2004) Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev* 18: 2024-2035.
210. Li H, Park S, Kilburn B, Jelinek MA, Henschen-Edman A, et al. (2002) Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem* 277: 44623-44630.
211. Vassileva MT, Matunis MJ (2004) SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Mol Cell Biol* 24: 3623-3632.
212. Anderson P, Kedersha N (2002) Stressful initiations. *J Cell Sci* 115: 3227-3234.
213. Anderson P, Kedersha N (2002) Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7: 213-221.
214. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, et al. (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107: 451-464.
215. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-884.
216. He L, Weber A, Levens D (2000) Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor. *Nucleic Acids Res* 28: 4558-4565.
217. Keene JD (1999) Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5-7.
218. Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ (1999) Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 284: 499-502.
219. Kohler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 761-773.
220. Tutucci E, Stutz F (2011) Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 377-384.
221. Serpeloni M, Moraes CB, Muniz JR, Motta MC, Ramos AS, et al. (2011) An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. *PLoS One* 6: e20730.

222. D'Orso I, De Gaudenzi JG, Frasch AC (2003) RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol* 19: 151-155.
223. Haile S, Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10: 569-577.
224. Chen CY, Shyu AB (2010) Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2: 167-183.
225. Parker R, Song H (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11: 121-127.
226. Balagopal V, Parker R (2009) Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 21: 403-408.
227. Franks TM, Lykke-Andersen J (2008) The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* 32: 605-615.
228. Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635-646.
229. Schwede A, Ellis L, Luther J, Carrington M, Stoecklin G, et al. (2008) A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. *Nucleic Acids Res* 36: 3374-3388.
230. Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Krieger MA, et al. (2007) Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 1062-1067.
231. Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Webb H, Hoheisel JD, et al. (2008) Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. *J Cell Sci* 121: 3002-3014.
232. Li CH, Irmer H, Gudjonsdottir-Planck D, Freese S, Salm H, et al. (2006) Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA* 12: 2171-2186.
233. Collier JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7: 1717-1727.
234. Milone J, Wilusz J, Bellofatto V (2004) Characterization of deadenylation in trypanosome extracts and its inhibition by poly(A)-binding protein Pab1p. *RNA* 10: 448-457.
235. Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Hoheisel JD, Clayton C, et al. (2010) The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *J Cell Sci* 123: 699-711.
236. Collier J, Parker R (2004) Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* 73: 861-890.
237. Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Seraphin B (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* 14: 15-22.

238. Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, et al. (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* 16: 56-62.
239. Haile S, Estevez AM, Clayton C (2003) A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. *RNA* 9: 1491-1501.
240. Schoenberg DR, Maquat LE (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13: 246-259.
241. Delhi P, Queiroz R, Inchaustegui D, Carrington M, Clayton C (2011) Is there a classical nonsense-mediated decay pathway in trypanosomes? *PLoS One* 6: e25112.
242. Clayton C, Schwede A, Stewart M, Robles A, Benz C, et al. (2008) Control of mRNA degradation in trypanosomes. *Biochem Soc Trans* 36: 520-521.
243. St Johnston D (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 363-375.
244. Czaplinski K, Singer RH (2006) Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem Sci* 31: 687-693.
245. Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T, Gerber AP (2008) Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cell Mol Life Sci* 65: 798-813.
246. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 9-22.
247. Brengues M, Teixeira D, Parker R (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486-489.
248. Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* 136: 761-773.
249. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 513-521.
250. Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, et al. (1985) Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett* 180: 265-270.
251. Avila AR, Dallagiovanna B, Yamada-Ogatta SF, Monteiro-Goes V, Fragoso SP, et al. (2003) Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res* 2: 159-168.
252. Cassola A (2011) RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case. *Curr Chem Biol* 5: 108-117.
253. Horn D (2008) Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics* 9: 2.

254. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* 7: 1534-1550.
255. Raghavan A, Bohjanen PR (2004) Microarray-based analyses of mRNA decay in the regulation of mammalian gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3: 112-124.
256. Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* 6: e255.
257. da Silva RA, Bartholomeu DC, Teixeira SM (2006) Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 36: 87-96.
258. Furger A, Schurch N, Kurath U, Roditi I (1997) Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol* 17: 4372-4380.
259. McNicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, et al. (2005) Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 280: 35238-35246.
260. Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309: 1514-1518.
261. Pullmann R, Jr., Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, et al. (2007) Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol Cell Biol* 27: 6265-6278.
262. Derrigo M, Cestelli A, Savettieri G, Di Liegro I (2000) RNA-protein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA (review). *Int J Mol Med* 5: 111-123.
263. Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28: 182-188.
264. Dember LM, Kim ND, Liu KQ, Anderson P (1996) Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J Biol Chem* 271: 2783-2788.
265. Kong J, Ji X, Liebhaber SA (2003) The KH-domain protein alpha CP has a direct role in mRNA stabilization independent of its cognate binding site. *Mol Cell Biol* 23: 1125-1134.
266. Lin S, Wang W, Wilson GM, Yang X, Brewer G, et al. (2000) Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 20: 7903-7913.
267. Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M (2004) Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2987-2992.
268. Lopez de Silanes I, Galban S, Martindale JL, Yang X, Mazan-Mamczarz K, et al. (2005) Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* 25: 9520-9531.
269. Yeap BB, Voon DC, Vivian JP, McCulloch RK, Thomson AM, et al. (2002) Novel binding of HuR and poly(C)-binding protein to a conserved UC-rich motif within the 3'-untranslated region of the androgen receptor messenger RNA. *J Biol Chem* 277: 27183-27192.

270. Zhu H, Zhou HL, Hasman RA, Lou H (2007) Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J Biol Chem* 282: 2203-2210.
271. Bayer-Santos E, Gentil LG, Cordero EM, Correa PR, da Silveira JF (2012) Regulatory elements in the 3' untranslated region of the GP82 glycoprotein are responsible for its stage-specific expression in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Acta Trop* 123: 230-233.
272. Di Noia JM, D'Orso I, Sanchez DO, Frasch AC (2000) AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem* 275: 10218-10227.
273. D'Orso I, Frasch AC (2001) Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J Biol Chem* 276: 15783-15793.
274. Coughlin BC, Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE (2000) Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *J Biol Chem* 275: 12051-12060.
275. Rodrigues DC, Silva R, Rondinelli E, Urmenyi TP (2010) *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Exp Parasitol* 126: 245-253.
276. Gibson WC, Swinkels BW, Borst P (1988) Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* 201: 315-325.
277. Clayton C, Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156: 93-101.
278. Colasante C, Robles A, Li CH, Schwede A, Benz C, et al. (2007) Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 151: 193-204.
279. Li ZH, De Gaudenzi JG, Alvarez VE, Mendiondo N, Wang H, et al. (2012) A 43-nucleotide U-rich element in 3'-untranslated region of large number of *Trypanosoma cruzi* transcripts is important for mRNA abundance in intracellular amastigotes. *J Biol Chem* 287: 19058-19069.
280. Vlasova-St Louis I, Bohjanen PR (2011) Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Curr Opin Genet Dev* 21: 444-451.
281. Dasgupta T, Ladd AN (2012) The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3: 104-121.
282. Barreau C, Paillard L, Osborne HB (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33: 7138-7150.
283. von Roretz C, Di Marco S, Mazroui R, Gallouzi IE (2011) Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2: 336-347.
284. Chen CY, Shyu AB (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20: 465-470.

285. Shyu AB, Wilkinson MF (2000) The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* 102: 135-138.
286. Xu N, Chen CY, Shyu AB (1997) Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol* 17: 4611-4621.
287. D'Orso I, Frasch AC (2001) TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. *J Biol Chem* 276: 34801-34809.
288. Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL (2007) Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 6: 65-69.
289. Gerber AP, Herschlag D, Brown PO (2004) Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2: E79.
290. Archer SK, Luu VD, de Queiroz RA, Brems S, Clayton C (2009) *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS Pathog* 5: e1000565.
291. Estevez AM (2008) The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 36: 4573-4586.
292. Walrad PB, Capewell P, Fenn K, Matthews KR (2011) The post-transcriptional trans-acting regulator, TbZFP3, co-ordinates transmission-stage enriched mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 40: 2869-2883.
293. Kabani S, Fenn K, Ross A, Ivens A, Smith TK, et al. (2009) Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10: 427.
294. Jensen BC, Sivam D, Kifer CT, Myler PJ, Parsons M (2009) Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10: 482.
295. Queiroz R, Benz C, Fellenberg K, Hoheisel JD, Clayton C (2009) Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. *BMC Genomics* 10: 495.
296. Das A, Morales R, Banday M, Garcia S, Hao L, et al. (2012) The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in *Trypanosoma brucei* energy metabolism. *RNA*.
297. Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L (2002) Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res* 30: 1427-1464.
298. Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265: 615-621.
299. Oubridge C, Ito N, Evans PR, Teo CH, Nagai K (1994) Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* 372: 432-438.
300. Lewis HA, Musunuru K, Jensen KB, Edo C, Chen H, et al. (2000) Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell* 100: 323-332.

301. Beuth B, Pennell S, Arnvig KB, Martin SR, Taylor IA (2005) Structure of a Mycobacterium tuberculosis NusA-RNA complex. *EMBO J* 24: 3576-3587.
302. Ramos A, Grunert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, et al. (2000) RNA recognition by a Staufien double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J* 19: 997-1009.
303. Lu D, Searles MA, Klug A (2003) Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature* 426: 96-100.
304. Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE (2004) Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nat Struct Mol Biol* 11: 257-264.
305. Frazao C, McVey CE, Amblar M, Barbas A, Vonrhein C, et al. (2006) Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature* 443: 110-114.
306. Liu Q, Greimann JC, Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127: 1223-1237.
307. Ma JB, Ye K, Patel DJ (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429: 318-322.
308. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305: 1434-1437.
309. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, et al. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: 195-198.
310. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, et al. (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature* 434: 666-670.
311. Antson AA, Dodson EJ, Dodson G, Greaves RB, Chen X, et al. (1999) Structure of the trp RNA-binding attenuation protein, TRAP, bound to RNA. *Nature* 401: 235-242.
312. Wang X, McLachlan J, Zamore PD, Hall TM (2002) Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110: 501-512.
313. Oberstrass FC, Lee A, Stefl R, Janis M, Chanfreau G, et al. (2006) Shape-specific recognition in the structure of the Vts1p SAM domain with RNA. *Nat Struct Mol Biol* 13: 160-167.
314. Lunde BM, Moore C, Varani G (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 479-490.
315. Mittal N, Roy N, Babu MM, Janga SC (2009) Dissecting the expression dynamics of RNA-binding proteins in posttranscriptional regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20300-20305.
316. Dreyfuss G, Swanson MS, Pinol-Roma S (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem Sci* 13: 86-91.
317. Kenan DJ, Query CC, Keene JD (1991) RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 16: 214-220.

318. Bandziulis RJ, Swanson MS, Dreyfuss G (1989) RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev* 3: 431-437.
319. Maris C, Dominguez C, Allain FH (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* 272: 2118-2131.
320. Clery A, Blatter M, Allain FH (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18: 290-298.
321. Ding J, Hayashi MK, Zhang Y, Manche L, Krainer AR, et al. (1999) Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev* 13: 1102-1115.
322. Fan XC, Steitz JA (1998) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15293-15298.
323. Zhang T, Delestienne N, Huez G, Kruijs V, Gueydan C (2005) Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J Cell Sci* 118: 5453-5463.
324. Cassola A, Frasch AC (2009) An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J Biol Chem* 284: 35015-35028.
325. Kramer S, Carrington M (2011) Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitol* 27: 23-30.
326. Araujo PR, Teixeira SM (2011) Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 257-266.
327. Caro F, Bercovich N, Atorrasagasti C, Levin MJ, Vazquez MP (2005) Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: implications for their functions. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1017-1025.
328. Morking PA, Dallagiovanna BM, Foti L, Garat B, Picchi GF, et al. (2004) TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 169-177.
329. Morking PA, Rampazzo Rde C, Walrad P, Probst CM, Soares MJ, et al. (2012) The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 790-799.
330. Wharton RP, Aggarwal AK (2006) mRNA regulation by Puf domain proteins. *Sci STKE* 2006: pe37.
331. Caro F, Bercovich N, Atorrasagasti C, Levin MJ, Vazquez MP (2006) *Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. *Exp Parasitol* 113: 112-124.
332. Dallagiovanna B, Perez L, Sotelo-Silveira J, Smircich P, Duhagon MA, et al. (2005) *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. *Exp Parasitol* 109: 260-264.

333. Dallagiovanna B, Correa A, Probst CM, Holetz F, Smircich P, et al. (2008) Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283: 8266-8273.
334. De Gaudenzi J, Frasch AC, Clayton C (2005) RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis. *Eukaryot Cell* 4: 2106-2114.
335. Guerra-Slompo EP, Probst CM, Pavoni DP, Goldenberg S, Krieger MA, et al. (2012) Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 302-307.
336. Noe G, De Gaudenzi JG, Frasch AC (2008) Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol* 9: 107.
337. D'Orso I, Frasch AC (2002) TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *J Biol Chem* 277: 50520-50528.
338. Cassola A, De Gaudenzi JG, Frasch AC (2007) Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol* 65: 655-670.
339. Pérez L (2003) Caracterización de una proteína de unión al ARN en *Trypanosoma cruzi*. [Trabajo Especial II]. Montevideo: Universidad de la República.
340. Pérez L (2005) Caracterización de una nueva proteína de unión al ARN en *Trypanosoma cruzi* [Tesis de Maestría]. Montevideo: Universidad de la República.
341. De Gaudenzi JG, D'Orso I, Frasch AC (2003) RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *J Biol Chem* 278: 18884-18894.
342. Perez-Diaz L, Duhagon MA, Smircich P, Sotelo-Silveira J, Robello C, et al. (2007) *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of an RNA binding protein differentially expressed in the parasite life cycle. *Exp Parasitol* 117: 99-105.
343. Bullock WO, J. M. Fernandez, and J. M. Short. (1987) XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* Strain with β -Galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-378.
344. Grodberg J, Dunn JJ (1988) *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170: 1245-1253.
345. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, et al. (1988) Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 123-133.
346. Simizu B, Rhim JS, Wiebenga NH (1967) Characterization of the Tacaribe group of arboviruses. I. Propagation and plaque assay of Tacaribe virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 119-123.

347. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710.
348. Shuman S (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10104-10108.
349. Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 20: 3963-3969.
350. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, et al. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17: 1030-1032.
351. Ausubel FM (2001) *Current protocols in molecular biology*; School); David D. Moore (Baylor College of Medicine); J.G. Seidman (Harvard Medical School); John A. Smith (University of Alabama at Birmingham); Kevin Struhl (Harvard Medical School) FMAMGHaHMSRBFHCRCREKMGHaHM, editor. New York: J. Wiley.
352. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
353. Morales J, Mogi T, Mineki S, Takashima E, Mineki R, et al. (2009) Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. *J Biol Chem* 284: 7255-7263.
354. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
355. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
356. Gradia DF, Rau K, Umaki AC, de Souza FS, Probst CM, et al. (2009) Characterization of a novel Obg-like ATPase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 39: 49-58.
357. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402-408.
358. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-5121.
359. Duhagon MA, Dallagiovanna B, Ciganda M, Ruyechan W, Williams N, et al. (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 183-188.
360. Thomson AM, Rogers JT, Walker CE, Staton JM, Leedman PJ (1999) Optimized RNA gel-shift and UV cross-linking assays for characterization of cytoplasmic RNA-protein interactions. *Biotechniques* 27: 1032-1039, 1042.
361. Hertz-Fowler C, Peacock CS, Wood V, Aslett M, Kerhornou A, et al. (2004) GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res* 32: D339-343.

-
362. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2004) GenBank: update. *Nucl Acids Res* 32: D23-26.
363. Kanz C, Aldebert P, Althorpe N, Baker W, Baldwin A, et al. (2005) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* 33: D29-33.
364. Luchtan M, Warade C, Weatherly DB, Degraeve WM, Tarleton RL, et al. (2004) TcruziDB: an integrated *Trypanosoma cruzi* genome resource. *Nucleic Acids Res* 32: D344-346.
365. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, et al. (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 38: D457-462.
366. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
367. Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217.
368. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415.
369. Hofacker IL, Stadler PF (2006) Memory efficient folding algorithms for circular RNA secondary structures. *Bioinformatics* 22: 1172-1176.
370. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubock R, Hofacker IL (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 36: W70-74.
371. Bailey TL, Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2: 28-36.
372. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, et al. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
373. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, et al. (2006) TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 411: 134-193.
374. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
375. Cooper R, de Jesus AR, Cross GA (1993) Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J Cell Biol* 122: 149-156.
376. Ajioka J, Swindle J (1996) The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. *Mol Biochem Parasitol* 78: 217-225.
377. Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA (1998) Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 17: 4975-4986.

378. Annoura T, Nara T, Makiuchi T, Hashimoto T, Aoki T (2005) The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. *J Mol Evol* 60: 113-127.
379. Barrio AB, Van Voorhis WC, Basombrio MA (2007) *Trypanosoma cruzi*: attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. *Exp Parasitol* 117: 382-389.
380. Conte I, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ (2003) The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14: 3529-3540.
381. MacRae JI, Obado SO, Turnock DC, Roper JR, Kierans M, et al. (2006) The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. *Mol Biochem Parasitol* 147: 126-136.
382. Manning-Cela R, Cortes A, Gonzalez-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J, et al. (2001) LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 69: 3916-3923.
383. Gluenz E, Taylor MC, Kelly JM (2007) The *Trypanosoma cruzi* metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements. *Int J Parasitol* 37: 617-625.
384. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5022-5027.
385. Clayton CE (1999) Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today* 15: 372-378.
386. Xu D, Brandan CP, Basombrio MA, Tarleton RL (2009) Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol* 9: 90.
387. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
388. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
389. Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
390. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
391. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20: 6877-6888.
392. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, et al. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
393. Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14687-14692.

394. Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K (2000) Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci* 113 (Pt 18): 3321-3328.
395. LaCount DJ, Bruse S, Hill KL, Donelson JE (2000) Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol Biochem Parasitol* 111: 67-76.
396. Shi H, Djikeng A, Mark T, Wirtz E, Tschudi C, et al. (2000) Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *Rna* 6: 1069-1076.
397. Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT (2000) Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem* 275: 40174-40179.
398. Tschudi C, Djikeng A, Shi H, Ullu E (2003) In vivo analysis of the RNA interference mechanism in *Trypanosoma brucei*. *Methods* 30: 304-312.
399. Zhang WW, Matlashewski G (2000) Analysis of antisense and double stranded RNA downregulation of A2 protein expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 107: 315-319.
400. Robinson KA, Beverley SM (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 128: 217-228.
401. DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 133: 175-186.
402. Atayde VD, Tschudi C, Ullu E (2011) The emerging world of small silencing RNAs in protozoan parasites. *Trends Parasitol* 27: 321-327.
403. Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6: 509-519.
404. Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 22-32.
405. Garcia Silva MR, Tosar JP, Frugier M, Pantano S, Bonilla B, et al. (2010) Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene*.
406. Wurst M, Robles A, Po J, Luu VD, Brems S, et al. (2009) An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 163: 61-65.
407. Clayton C (2009) gene comments on Tb927.7.1180.
408. Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, 3rd, Orlando R, Tarleton RL (2009) The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 10: 370.
409. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-1730.

410. Washburn MP, Koller A, Oshiro G, Ulaszek RR, Plouffe D, et al. (2003) Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3107-3112.
411. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29.
412. Belmont AS (2006) Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol* 18: 632-638.
413. Hirano T (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* 15: R265-275.
414. Deeks MJ, Hussey PJ (2005) Arp2/3 and SCAR: plants move to the fore. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 954-964.
415. Soderling SH (2009) Grab your partner with both hands: cytoskeletal remodeling by Arp2/3 signaling. *Sci Signal* 2: pe5.
416. Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385: 265-269.
417. Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol* 138: 375-384.
418. Yoo Y, Wu X, Guan JL (2007) A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *J Biol Chem* 282: 7616-7623.
419. Garcia-Rodriguez LJ, Gay AC, Pon LA (2007) Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol* 176: 197-207.
420. Cabrera R, Sha Z, Vadakkan TJ, Otero J, Kriegenburg F, et al. (2010) Proteasome Mobility Mediated by Arc3 Can Influence Efficient DNA Damage Repair and Mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*.
421. To C, Shilton BH, Di Guglielmo GM (2010) Synthetic triterpenoids target the ARP2/3 complex and inhibit branched actin polymerization. *J Biol Chem*.
422. Goley ED, Welch MD (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 713-726.
423. Greene W, Gao SJ (2009) Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathog* 5: e1000512.
424. Galletta BJ, Cooper JA (2009) Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol* 21: 20-27.
425. Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV (2009) The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct* 4: 9.
426. Gruenberg J, van der Goot FG (2006) Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 495-504.

427. Duhagon MA, Pastro L, Sotelo-Silveira JR, Perez-Diaz L, Maugeri D, et al. (2009) The Trypanosoma cruzi nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle. *BMC Microbiol* 9: 34.
428. Walgraffe D, Devaux S, Lecordier L, Dierick JF, Dieu M, et al. (2005) Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* 139: 249-260.
429. Ouna BA, Stewart M, Helbig C, Clayton C (2012) The Trypanosoma brucei CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13. *Mol Biochem Parasitol* 183: 184-188.
430. Schimanski B, Nguyen TN, Gunzl A (2005) Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* 4: 1942-1950.
431. Estevez AM, Kempf T, Clayton C (2001) The exosome of Trypanosoma brucei. *Embo J* 20: 3831-3839.
432. Jensen BC, Kifer CT, Brekken DL, Randall AC, Wang Q, et al. (2007) Characterization of protein kinase CK2 from Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* 151: 28-40.
433. Palfi Z, Schimanski B, Gunzl A, Lucke S, Bindereif A (2005) U1 small nuclear RNP from Trypanosoma brucei: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. *Nucleic Acids Res* 33: 2493-2503.
434. Patton WF (1999) Proteome analysis. II. Protein subcellular redistribution: linking physiology to genomics via the proteome and separation technologies involved. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722: 203-223.
435. Yan JX, Sanchez JC, Binz PA, Williams KL, Hochstrasser DF (1999) Method for identification and quantitative analysis of protein lysine methylation using matrix-assisted laser desorption/ionization--time-of-flight mass spectrometry and amino acid analysis. *Electrophoresis* 20: 749-754.
436. Newsholme SJ, Maleeff BF, Steiner S, Anderson NL, Schwartz LW (2000) Two-dimensional electrophoresis of liver proteins: characterization of a drug-induced hepatomegaly in rats. *Electrophoresis* 21: 2122-2128.
437. Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
438. Rondinelli E (1994) Conservation of heat-shock proteins in Trypanosoma cruzi. *Parasitol Today* 10: 172-176.
439. Vonlaufen N, Kanzok SM, Wek RC, Sullivan WJ, Jr. (2008) Stress response pathways in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 10: 2387-2399.
440. Maldonado RA, Fairlamb AH (2001) Cloning of a pyruvate phosphate dikinase from Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol* 112: 183-191.
441. Acosta H, Dubourdieu M, Quinones W, Caceres A, Bringaud F, et al. (2004) Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138: 347-356.
442. Bringaud F, Baltz D, Baltz T (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7963-7968.

443. Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA (2006) Trypanosoma cruzi: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp Parasitol* 114: 341-344.
444. Miranda MR, Bouvier LA, Canepa GE, Pereira CA (2009) Subcellular localization of Trypanosoma cruzi arginine kinase. *Parasitology* 136: 1201-1207.
445. Salmon D, Bachmaier S, Krumbholz C, Kador M, Gossmann JA, et al. (2012) Cytokinesis of Trypanosoma brucei bloodstream forms depends on expression of adenylyl cyclases of the ESAG4 or ESAG4-like subfamily. *Mol Microbiol* 84: 225-242.
446. Seebeck T, Schaub R, Johner A (2004) cAMP signalling in the kinetoplastid protozoa. *Curr Mol Med* 4: 585-599.
447. Fernandes AB, Neira I, Ferreira AT, Mortara RA (2006) Cell invasion by Trypanosoma cruzi amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol Res* 100: 59-68.
448. Diaz ML, Solari A, Gonzalez CI (2011) Differential expression of Trypanosoma cruzi I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *J Proteomics* 74: 1673-1682.
449. Rego JV, Murta SM, Nirde P, Nogueira FB, de Andrade HM, et al. (2008) Trypanosoma cruzi: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benznidazole-resistant and susceptible populations. *Exp Parasitol* 118: 111-117.
450. Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzumi S, et al. (2002) A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi. *J Exp Med* 196: 1241-1251.
451. Oury B, Tarrieu F, Monte-Alegre A, Ouaiissi A (2005) Trypanosoma cruzi: sequence polymorphism of the gene encoding the Tc52 immunoregulatory-released factor in relation to the phylogenetic diversity of the species. *Exp Parasitol* 111: 198-206.
452. Dea-Ayuela MA, Ordonez-Gutierrez L, Bolas-Fernandez F (2009) Changes in the proteome and infectivity of Leishmania infantum induced by in vitro exposure to a nitric oxide donor. *Int J Med Microbiol* 299: 221-232.
453. Pineyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M (2011) Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 507: 287-295.
454. Peloso Ede F, Vitor SC, Ribeiro LH, Pineyro MD, Robello C, et al. (2011) Role of Trypanosoma cruzi peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr* 43: 419-424.
455. Pineyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C (2008) Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408: 45-50.
456. Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ (2012) The peptidases of Trypanosoma cruzi: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1824: 195-206.

457. Hill KL (2010) Parasites in motion: flagellum-driven cell motility in African trypanosomes. *Curr Opin Microbiol* 13: 459-465.
458. Carvalho TM, Ferreira AG, Coimbra ES, Rosestolato CT, De Souza W (1999) Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31: 325-333.
459. Haglund CM, Welch MD (2011) Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J Cell Biol* 195: 7-17.
460. Luah YH, Chaal BK, Ong EZ, Bozdech Z (2010) A moonlighting function of *Plasmodium falciparum* histone 3, mono-methylated at lysine 9? *PLoS One* 5: e10252.
461. Jeffery CJ (2009) Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst* 5: 345-350.
462. Collingridge PW, Brown RW, Ginger ML (2010) Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology* 137: 1467-1475.
463. Tsvetanova NG, Klass DM, Salzman J, Brown PO (2010) Proteome-wide search reveals unexpected RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5.
464. Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, et al. (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA* 16: 926-941.
465. Berggard T, Linse S, James P (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7: 2833-2842.
466. Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, et al. (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431: 99-104.
467. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, et al. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298: 799-804.
468. Ihmels J, Bergmann S, Gerami-Nejad M, Yanai I, McClellan M, et al. (2005) Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science* 309: 938-940.
469. Ihmels J, Friedlander G, Bergmann S, Sarig O, Ziv Y, et al. (2002) Revealing modular organization in the yeast transcriptional network. *Nat Genet* 31: 370-377.
470. Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, et al. (2003) Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genet* 34: 166-176.
471. Tenenbaum SA, Carson CC, Lager PJ, Keene JD (2000) Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14085-14090.
472. Keene JD, Tenenbaum SA (2002) Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9: 1161-1167.

473. Gerber AP, Luschnig S, Krasnow MA, Brown PO, Herschlag D (2006) Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4487-4492.
474. Wickens M, Bernstein DS, Kimble J, Parker R (2002) A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* 18: 150-157.
475. Duttagupta R, Tian B, Wilusz CJ, Khounh DT, Soteropoulos P, et al. (2005) Global analysis of Pub1p targets reveals a coordinate control of gene expression through modulation of binding and stability. *Mol Cell Biol* 25: 5499-5513.
476. Shepard KA, Gerber AP, Jambhekar A, Takizawa PA, Brown PO, et al. (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11429-11434.
477. Takizawa PA, DeRisi JL, Wilhelm JE, Vale RD (2000) Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290: 341-344.
478. Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, et al. (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107: 477-487.
479. Hieronymus H, Silver PA (2003) Genome-wide analysis of RNA-protein interactions illustrates specificity of the mRNA export machinery. *Nat Genet* 33: 155-161.
480. Li AM, Watson A, Fridovich-Keil JL (2003) Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res* 31: 1830-1837.
481. Inada M, Guthrie C (2004) Identification of Lhp1p-associated RNAs by microarray analysis in *Saccharomyces cerevisiae* reveals association with coding and noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 434-439.
482. Puig S, Askeland E, Thiele DJ (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* 120: 99-110.
483. Kim Guisbert K, Duncan K, Li H, Guthrie C (2005) Functional specificity of shuttling hnRNPs revealed by genome-wide analysis of their RNA binding profiles. *RNA* 11: 383-393.
484. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G (2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4: 76-84.
485. Easow G, Teleman AA, Cohen SM (2007) Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA* 13: 1198-1204.
486. Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, et al. (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13: 1338-1351.
487. Liu W, Seto J, Sibille E, Toth M (2003) The RNA binding domain of Jerky consists of tandemly arranged helix-turn-helix/homeodomain-like motifs and binds specific sets of mRNAs. *Mol Cell Biol* 23: 4083-4093.

488. Waggoner SA, Liebhaber SA (2003) Identification of mRNAs associated with alphaCP2-containing RNP complexes. *Mol Cell Biol* 23: 7055-7067.
489. Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, Mele A, Ule A, et al. (2003) CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* 302: 1212-1215.
490. Reynolds N, Collier B, Maratou K, Bingham V, Speed RM, et al. (2005) Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. *Hum Mol Genet* 14: 3899-3909.
491. Tanaka TS, Lopez de Silanes I, Sharova LV, Akutsu H, Yoshikawa T, et al. (2006) Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. *Dev Growth Differ* 48: 381-390.
492. Townley-Tilson WH, Pendergrass SA, Marzluff WF, Whitfield ML (2006) Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *RNA* 12: 1853-1867.
493. Gama-Carvalho M, Barbosa-Morais NL, Brodsky AS, Silver PA, Carmo-Fonseca M (2006) Genome-wide identification of functionally distinct subsets of cellular mRNAs associated with two nucleocytoplasmic shuttling mammalian splicing factors. *Genome Biol* 7: R113.
494. Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17: 2791-2804.
495. Holetz FB, Alves LR, Probst CM, Dallagiovanna B, Marchini FK, et al. (2010) Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J* 277: 3415-3426.
496. Campos PC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Cerqueira GC, Teixeira SM (2008) Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 38: 1383-1389.
497. Weston D, La Flamme AC, Van Voorhis WC (1999) Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions. *Mol Biochem Parasitol* 102: 53-66.
498. Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW (2004) Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13: 91-100.
499. Hase ME, Yalamanchili P, Visa N (2006) The *Drosophila* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. *J Biol Chem* 281: 39135-39141.
500. Bell LR, Horabin JI, Schedl P, Cline TW (1991) Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell* 65: 229-239.
501. Stoilov P, Daoud R, Nayler O, Stamm S (2004) Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Hum Mol Genet* 13: 509-524.
502. Hollas H, Aukrust I, Grimmer S, Strand E, Flatmark T, et al. (2006) Annexin A2 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1325-1334.

503. Tchen CR, Brook M, Saklatvala J, Clark AR (2004) The stability of tristetraprolin mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraprolin itself. *J Biol Chem* 279: 32393-32400.
504. Wilson GM, Sun Y, Sellers J, Lu H, Penkar N, et al. (1999) Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* 19: 4056-4064.
505. Banihashemi L, Wilson GM, Das N, Brewer G (2006) Upf1/Upf2 regulation of 3' untranslated region splice variants of AUF1 links nonsense-mediated and A+U-rich element-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 26: 8743-8754.
506. Cazzulo JJ (1994) Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr* 26: 157-165.
507. Besteiro S, Barrett MP, Riviere L, Bringaud F (2005) Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol* 21: 185-191.
508. Roos MH, Tielens AG (1994) Differential expression of two succinate dehydrogenase subunit-B genes and a transition in energy metabolism during the development of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 66: 273-281.
509. Saruta F, Kuramochi T, Nakamura K, Takamiya S, Yu Y, et al. (1995) Stage-specific isoforms of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in mitochondria from the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 270: 928-932.
510. Inoue M, Isomura M, Ikegawa S, Fujiwara T, Shin S, et al. (1996) Isolation and characterization of a human cDNA clone (GCN5L1) homologous to GCN5, a yeast transcription activator. *Cytogenet Cell Genet* 73: 134-136.
511. Sun J, Zhang J, Wu F, Xu C, Li S, et al. (2005) Solution structure of Kti11p from *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel zinc-binding module. *Biochemistry* 44: 8801-8809.
512. Dunlop PC, Bodley JW (1983) Biosynthetic labeling of diphthamide in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 258: 4754-4758.
513. Liu S, Milne GT, Kuremsky JG, Fink GR, Leppla SH (2004) Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Mol Cell Biol* 24: 9487-9497.
514. Fichtner L, Schaffrath R (2002) KTI11 and KTI13, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Microbiol* 44: 865-875.
515. Liu S, Wiggins JF, Sreenath T, Kulkarni AB, Ward JM, et al. (2006) Dph3, a small protein required for diphthamide biosynthesis, is essential in mouse development. *Mol Cell Biol* 26: 3835-3841.
516. Bar C, Zabel R, Liu S, Stark MJ, Schaffrath R (2008) A versatile partner of eukaryotic protein complexes that is involved in multiple biological processes: Kti11/Dph3. *Mol Microbiol* 69: 1221-1233.
517. Fernandez-Moya SM, Estevez AM (2010) Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1: 34-46.

518. Espel E (2005) The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Semin Cell Dev Biol* 16: 59-67.
519. Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W, Khabar KS (2001) ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res* 29: 246-254.
520. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolin A (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 195: 356-372.
521. Raghavan A, Dhalla M, Bakheet T, Ogilvie RL, Vlasova IA, et al. (2004) Patterns of coordinate down-regulation of ARE-containing transcripts following immune cell activation. *Genomics* 84: 1002-1013.
522. Lai WS, Parker JS, Grissom SF, Stumpo DJ, Blackshear PJ (2006) Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol* 26: 9196-9208.
523. Quijada L, Guerra-Giraldez C, Drozd M, Hartmann C, Irmer H, et al. (2002) Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 30: 4414-4424.
524. Hartmann C, Benz C, Brems S, Ellis L, Luu VD, et al. (2007) Small trypanosome RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2 influence expression of F-box protein mRNAs in bloodstream trypanosomes. *Eukaryot Cell* 6: 1964-1978.
525. Sun S, Zhang Z, Sinha R, Karni R, Krainer AR (2010) SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nat Struct Mol Biol* 17: 306-312.
526. Sobell HM (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5328-5331.
527. Wang Y, Liu CL, Storey JD, Tibshirani RJ, Herschlag D, et al. (2002) Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5860-5865.
528. Grigull J, Mnaimneh S, Pootoolal J, Robinson MD, Hughes TR (2004) Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* 24: 5534-5547.
529. Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 827-835.
530. Deana A, Belasco JG (2005) Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev* 19: 2526-2533.

CEBADORES UTILIZADOS

Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron diseñados usando el programa *OligoPerfect™ Designer* (Invitrogen) disponible en (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) y se sintetizaron en IDT Integrated DNA Technologies, Eurofins MWG Operon o la compañía Macrogen. Las secuencias de los mismos se detallan en la **TABLA A.1.**

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
<i>lpgapdh1</i>	5'-cgacaacgagtggggatact-3'	qRT-PCR
<i>lpgapdh2</i>	5'-ctacaaccttgccgaacgat-3'	qRT-PCR
<i>lpcat1</i>	5'-gCGtggttacggtgaaaacct-3'	qRT-PCR
<i>lpcat2</i>	5'-ggattggctgagacgaaaaa-3'	qRT-PCR
<i>5'UTRfw</i>	5'-ggtgacggttggtgcttctggc-3'	qRT-PCR
<i>5'UTRrev</i>	5'-gcaccgatttgccggttcttg-3'	qRT-PCR
<i>Tc19fw</i>	5'-aggcattcagcgttacaagaac-3'	qRT-PCR
<i>Tc19rev</i>	5'-cgatttgccaagaagtttg-3'	qRT-PCR
<i>ARP2/3-11Fw</i>	5'-ccgcctatttgcccttactacg-3'	qRT-PCR
<i>ARP2/3-11rev</i>	5'-gctccacggtacatgaaggat-3'	qRT-PCR
<i>GCN5-12Fw</i>	5'-ccaccggttggtgtctccatc-3'	qRT-PCR
<i>GCN5-12rev</i>	5'-gatcaaaccttccagcactga-3'	qRT-PCR
<i>ZincFinger-6Fw</i>	5'-tttactacgaggaggtgcag-3'	qRT-PCR
<i>ZincFinger-6rev</i>	5'-ccgaaagctcgaatagatcg-3'	qRT-PCR
<i>1-84Fw</i>	5'-gcaggttcgccactttacttc-3'	qRT-PCR
<i>1-84rev</i>	5'-cggtaaaataaccgtgcattcc-3'	qRT-PCR
<i>SDH11fw</i>	5'- ggattgactgcgggattttc -3'	Clonado de 3'UTR <i>sdh11</i>
<i>ARP2/3fw</i>	5'- cacgaggaagtagaaacaatgc -3'	Clonado de 3'UTR <i>arp2/3</i>
<i>TcRBP19fw (LP1)</i>	5'- tgaggactatcgagcgccatac -3'	Clonado de 3'UTR <i>tcrbp19</i>
<i>Miniexón</i>	5'- cgctattattgatacagtttctg -3'	Clonado de 5'UTR <i>tcrbpq9</i>
<i>TcRBP19rev</i>	5'- cgatttgccaagaagtttg -3'	Clonado de 5'UTR <i>tcrbp19</i>
<i>tc19-1REV_Xho</i>	5'- ctcgag ctgccgcacccaacatttcaccg-3'	Clonado de 3'UTR <i>tcrbp19</i> para reportero CAT
<i>tc19-2REV_Xho</i>	5'- ctcgag caactgtccttctcattccg-3'	Clonado de 3'UTR <i>tcrbp19</i> para reportero CAT
<i>tc19-1FW_Hind</i>	5'- caagctt aaaggaaatgcggttgctgc-3'	Clonado de 3'UTR <i>tcrbp19</i> para reportero CAT
<i>tc19-2FW_Hind</i>	5'- caagctt aaatgaaatgcggttgctgc-3'	Clonado de 3'UTR <i>tcrbp19</i> para reportero CAT

TABLA A1 Cebadores utilizados en este trabajo

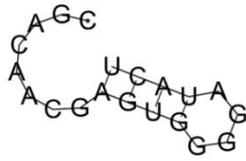
ANÁLISIS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS EN qPCR

La secuencia de los cebadores fue chequeada con diferentes programas disponibles, constatándose la ausencia de dímeros de cebador o estructuras secundarias termodinámicamente estables que puedan formarse. Para ello se utilizó el servidor web de la compañía IDT (<http://www.idtdna.com/site>) y el programa Genamics Expression (Copyright (C) 2000-Version 1.100, Genamics Software, Inc).

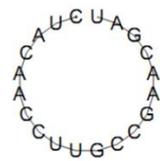
Para el modelado de estructura secundaria, se usó además la aplicación *DNA folding form* en el servidor *The mfold Web Server* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/mfold-references>) usando los parámetros por defecto. Solo se representan las estructuras con valores de energía libre negativa. Ninguno de los cebadores forma estructuras secundarias con valores de energía libre significativamente bajo a 37°C (**FIGURA A1**).

PÁGINA SIGUIENTE:

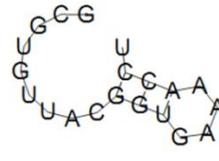
FIGURA A1 Estructuras secundarias predichas para los cebadores utilizados en este trabajo. Se indica junto al nombre de cada cebador el valor de energía libre de Gibbs.



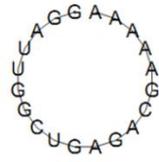
lpgapdh1 ΔG: -1.33 kcal/mol



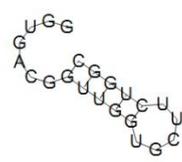
lpgapdh2 ΔG: -0.09 kcal/mol



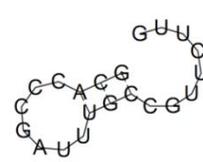
lpcat1 ΔG: -4.38 kcal/mol



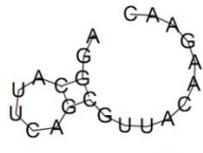
lpcat2 ΔG: -0.51 kcal/mol



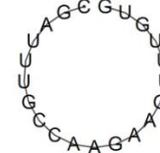
5'UTRfw ΔG: -2.25 kcal/mol



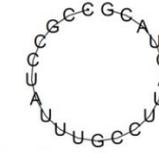
5'UTRrev ΔG: -1.01 kcal/mol



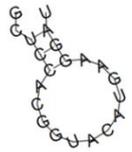
Tc19fw ΔG: -1.29 kcal/mol



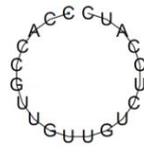
Tc19rev ΔG: -1.29 kcal/mol



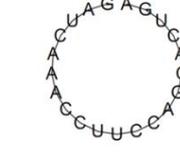
Arp2/3-11fw ΔG: -0.41 kcal/mol



Arp2/3-11rev ΔG: -1.25 kcal/mol



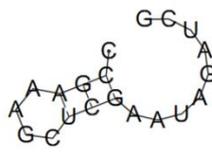
GCN5-12Fw ΔG: -0.11 kcal/mol



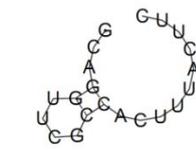
GCN5-12rev ΔG: -0.28 kcal/mol



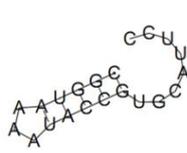
Zcfinger-6fw ΔG: -1.99 kcal/mol



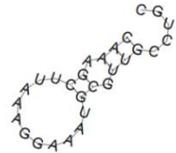
Zcfinger-6rev ΔG: -1.56 kcal/mol



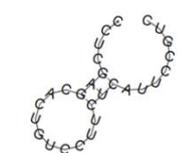
1-84fw ΔG: -1.94 kcal/mol



1-84rev ΔG: -4.09 kcal/mol



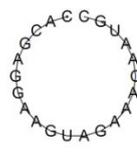
1fwH ΔG: -2.03 kcal/mol



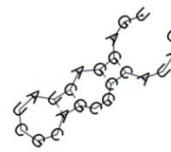
2revX ΔG: -0.86 kcal/mol



SDH11fw ΔG: -0.25 kcal/mol



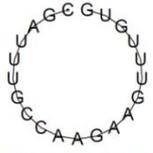
Arp2/3fw ΔG: -0.44 kcal/mol



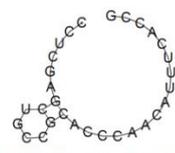
TcRBP19fw (LP1) ΔG: -1.18 kcal/mol



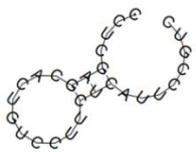
Miniexón ΔG: -0.34 kcal/mol



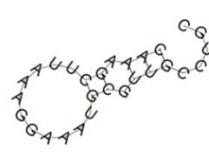
TcRBP19rev ΔG: -0.53 kcal/mol



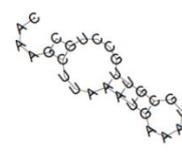
tc19-1REV_Xho ΔG: -1.35 kcal/mol



tc19-2REV_Xho ΔG: -0.86 kcal/mol



tc19-1FW_Hind ΔG: -2.03 kcal/mol



tc19-2FW_Hind ΔG: -2.08 kcal/mol

Se realizó un análisis de BLAST con los cebadores utilizados en la base de datos del TriTrypDB y en el NCBI constatándose que los mismos no hibridan con otras secuencias en el genoma de *T. cruzi*.

Para aplicar el método $\Delta\Delta CT$, las eficiencias de amplificación del gen blanco y el gen de referencia utilizados deben ser muy similares. Se analizó entonces la eficiencia de reacción de amplificación para cada par de cebadores usados en el qPCR. La eficiencia fue calculada a partir de la pendiente del gráfico CT vs log [] donde la eficiencia $Ef = \left(10^{-\left(\frac{1}{pendiente}\right)} \right) - 1$. Para los cebadores analizados se muestran en la **TABLA A2** los valores obtenidos a partir de los gráficos CT vs log[] donde []= 40, 20, 10 y 5 ng de ADN total de *T. cruzi* por reacción.

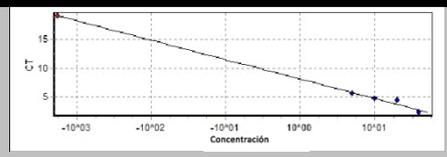
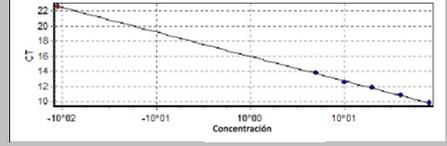
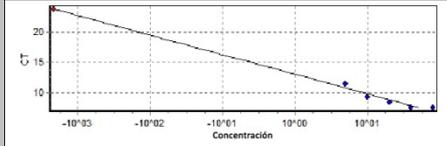
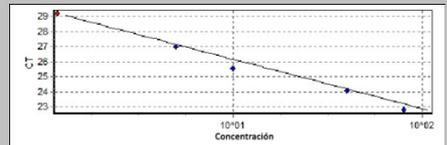
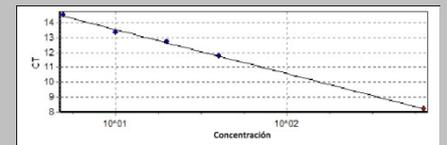
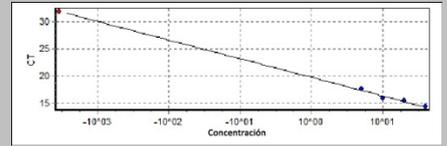
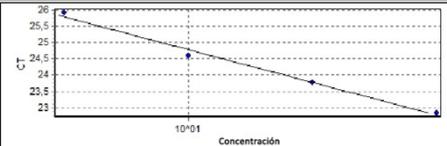
Par de cebadores	Eficiencia (%)	Curva
<i>lpgapdh1</i> y <i>lpgapdh1</i>	97	
<i>lpcat1</i> y <i>lpcat2</i>	103	
5'UTRfw y 5'UTRrev	101	
<i>Tc19fw</i> y <i>Tc19rev</i>	102	
<i>ARP2/3-11Fw</i> y <i>ARP2/3-11rev</i>	108	
<i>GCN5-12Fw</i> y <i>GCN5-12rev</i>	ND	ND
<i>ZincFinger-6Fw</i> y <i>ZincFinger-6rev</i>	96	
<i>1-84Fw</i> y <i>1-84rev</i>	107	

TABLA A2 Eficiencia de los pares de cebadores utilizados. Se muestra los valores de eficiencia para los pares de cebadores indicados. A la izquierda se muestra la curva estándar a partir de cuya pendiente se desprende el valor de eficiencia. ND: no determinado

Para analizar si dos amplicones tienen la misma eficiencia, se estudió la variación ΔCT con la dilución del molde. Se graficó la variación ΔCT (CT gen blanco-CT gen de referencia) para diferentes diluciones seriadas de ADN total de *T. cruzi* en concentraciones menores a 40 ng. Si el valor absoluto de la pendiente es cercano a cero, las eficiencias de los genes blanco y de referencia son similares y puede usarse el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los cebadores testados utilizados para qPCR son adecuados para el análisis pues sus pendientes son cercanas a 0 (**FIGURA A2**), de hecho todas las pendientes obtenidas resultaron menores a 0,03 lo cual es un valor aceptable según Livak y cols. [357]. Para simplificar los estudios, se escogió el mismo gen de referencia (*gapdh*) para todos los ensayos realizados y se usaron los oligonucleótidos cebadores *lpgapdh1* y *lpgapdh2* para amplificar una región de dicho gen.

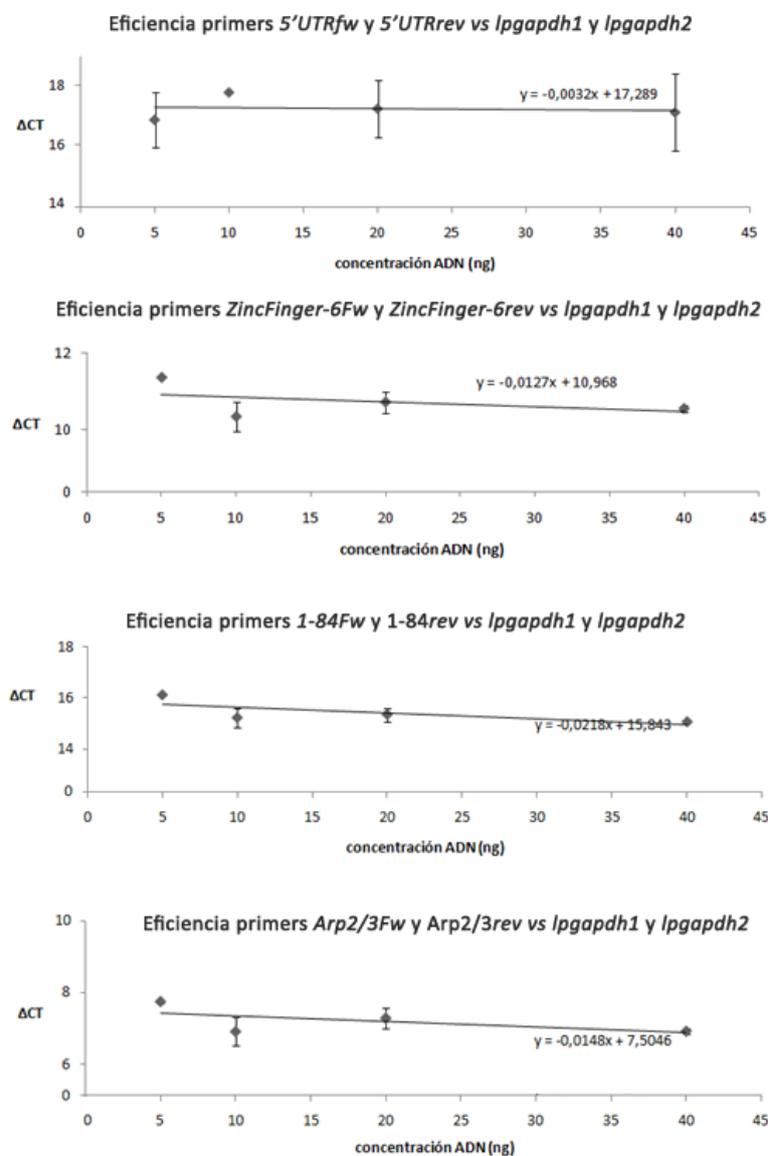


FIGURA A2 Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para algunos cebadores utilizados en qPCR. Se muestra el gráfico de la comparación de la amplificación de diferentes genes de interés con los cebadores indicados con el gen de

expresión constitutiva *gapdh* utilizado como control interno a partir de diferentes concentraciones de ADN genómico de *T. cruzi*. En el eje de las y se representa el valor de ΔCT (CT gen de interés-CT gen de referencia *gapdh*).

ABREVIATURAS

1D	1 dimensión
2D	2 dimensiones
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNss	ADN simple hebra
AEBSF	4-(2-Aminoetil) bencenosulfonil fluoride hydrochloride
APS	Persulfato de amonio
ARE	Elemento rico en AU
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNnp	ARN nucleares pequeños
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín tri-fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CBP	Proteína de unión a calmodulina
cm	Centímetro
cpm	Cuentas por min
CTP	Citidín tri-fosfato
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGC	<i>cluster</i> génico divergente (<i>divergent gene cluster</i>)
DGF-1	Familia dispersa génica-1 (<i>Dispersed gene family-1</i>)
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dsRBD	Dominio de unión al ARN doble hebra
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenbis(oxyetilenitrilo)tetracético
Ef	Eficiencia
EGTA	Ácido etilen glicol tetracético
EMSA	Ensayo de retardo en gel (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
G	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GRE	Elemento rico en GU
GST	Glutación S transferasa
GTP	Guanosín tri-fosfato
h	Hora
Ipp	Inmunoprecipitación
IPTG	Isopropil tio galactósido
K-ADN	ADN del kinetoplasto
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
L	Litro
LIT	Medio líquido de infusión hepática y triptosa
M	Molar
mA	Miliamperios
MASP	Proteína asociada a Mucina
máx.	Máximo
μCi	Micro Curie
MCS	Sitio de clonado múltiple
MES	Ácido morfolino etanosulfónico
μg	Microgramo
mg	Miligramos
μg	Microgramos
min	Minutos
mM	Milimolar
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micras
μM	Micromolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
nm	Nanómetro
NMD	Decaimiento mediado por ARN sin sentido (<i>Nonsense Mediated Decay</i>)
nmol	Nanomoles
NP-40	Nonidet P-40
NRE	Elemento de respuesta a la proteína Nanos (<i>Nanos Response Element</i>)
NTC	Control sin molde (<i>NonTemplate Control</i>)
nts	Nucleótidos
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PARP	Proteína <i>Procylic acidic repetitive</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pend	Pendiente
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFR	Bastón paraflagelar (<i>ParaFlagellar Road</i>)
PGC	<i>Cluster</i> de genes policistrónicos
qPCR	PCR cuantitativo
RBP	Proteína de unión al ARN (<i>RNA Binding Protein</i>)
RNP	Ribonucleopartícula
rpm	Revoluciones por min
RRM	Motivo de reconocimiento al ARN (<i>RNA Recognition Motif</i>)
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio

seg	Segundo
siARN	ARN pequeño interferencia
SL	<i>Spliced leader</i> ó Miniexón
SSC	Citrato de sodio salino
SSR	Región de cambio de hebra (<i>Strand Switch Region</i>)
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAP	Purificación en <i>tandem</i> de afinidad
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
Trityps	Tripanosomátidos representativos (<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania major</i>)
TS	<i>Trans</i> -sialidasa
U	Unidades de enzima
UTP	Uridín tri-fosfato
UTR	Región transcrita no traducida
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
VSG	Glicoproteína variable de superficie
w/v	Peso sobre volumen
ZFP	Proteína con motivo dedo de Zinc
ZnF	Motivo dedo de Zinc