



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

TESIS DE MAESTRÍA

**Interacciones moleculares de TcPUF6, una proteína
Pumilio de *Trypanosoma cruzi***

Licenciado Pablo Smircich

**Laboratorio de Interacciones Moleculares
Facultad de Ciencias-Universidad de la República**

Orientador: Dr. Beatriz Garat

Co-orientador: Dr. Bruno Dallagiovanna

Tribunal:

Dr. Cecilia Fernández

Dr. Estela Castillo

Dr. Esteban Serra



PEDECIBA

Índice Temático

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.1.1 Enfermedad de Chagas y ciclo de vida.....	8
1.1.2 Aspectos de biología molecular.....	10
1.1.3 Regulación post transcripcional.....	12
1.2 Familia de proteínas PUF.....	16
1.2.1 Estructura.....	18
1.2.2 Mecanismo de acción.....	22
1.2.3 Funciones fisiológicas.....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo general.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Líneas celulares.....	29
3.1.1 Cepas bacterianas.....	29
3.1.2 Cepas de <i>T.cruzi</i>	29
3.1.3 Cepas de levadura.....	29
3.2 Medios de cultivo.....	29
3.3 Oligonucleótidos sintéticos.....	30
3.4 Manejo de bacterias.....	30
3.4.1 Cultivo de bacterias.....	30
3.4.2 Preparación y transformación de células competentes.....	31
3.4.3 Obtención de ADN plasmídico.....	31
3.5 Manejo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.5.1 Cultivo de epimastigotas.....	32
3.5.2 Transfección de epimastigotas.....	32
3.5.3 Extracción de ADN total.....	32
3.6 Manejo de levaduras.....	33
3.6.1 Cultivo.....	33
3.6.2 Transfección.....	33
3.6.3 Ensayo de actividad β -galactosidasa.....	33
3.7 Manipulación y análisis de ADN.....	34

3.7.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
3.7.2	Electroforesis en gel de agarosa.....	35
3.7.3	Digestión con enzimas de restricción	35
3.7.4	Purificación de fragmentos de geles de agarosa	35
3.7.5	Precipitación	35
3.7.6	Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico	36
3.7.7	Medida de la concentración	36
3.7.8	Ligación de fragmentos.....	36
3.7.9	Ensayo de recombinación (Sistema Gateway)	37
3.7.10	Análisis de plásmidos recombinantes.....	38
3.7.11	Análisis de Secuencias	38
3.8	Manipulación y análisis de proteínas.....	39
3.8.1	Obtención de extractos de proteínas del parásito.....	39
3.8.2	Obtención de complejos mediante TAP- <i>tag</i>	39
3.8.3	Electroforesis en geles de acrilamda.....	40
3.8.4	Transferencia a membranas y <i>western blot</i>	41
3.8.5	Dosificación por Método de Biuret	41
3.9	Manejo informático de secuencias.....	42
3.9.1	Obtención de secuencias	42
3.9.2	Búsqueda en bases de datos	42
3.9.3	Búsqueda de dominios conservados.....	42
3.9.4	Visualización y edición de secuencias	43
3.9.5	Alineamientos de secuencias	43
3.9.6	Visualización de los alineamientos	43
3.9.7	Análisis filogenéticos	43
3.9.8	Análisis de estructura secundaria	44
3.10	Tratamiento estadístico de datos	44
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1	Caracterización Molecular de TcPuf6, una proteína Pumilio, de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.2	Análisis de la familia PUF en tripanosomátidos.....	52
4.3	Caracterización Genómico Funcional de los ARNm asociados a TcPUF6, una proteína Pumilio de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
4.4	Búsqueda de compañeros proteicos.....	70
4.4.1	Purificación de complejos proteicos mediante TAP- <i>tag</i>	70
4.4.2	Identificación de interacciones por Y2H.....	77
4.4.3	Expresión de TcPop2 recombinante en <i>E. coli</i>	93

5	CONCLUSIONES	95
6	BIBLIOGRAFÍA.....	99
	Agradecimientos	108

Abreviaturas

3AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
5-FOA	Ácido 5-Fluoroorótico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEBSF	fluoruro 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo
ARE	Elementos ricos en AU (<i>AU rich elements</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BrEt	Bromuro de etidio
CAP	Caperuza en 5`
DAB	Diaminobencidina
DMF	Dimetil formamida
dNTP	Deoxi (A, T, G o C) trifosfato
ddNTP	Dideoxi (A, T, G o C) TP
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacetico
EMSA	Ensayo de retardo en gel (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>)
E64	L-trans-epoxi succinil amido(4-guanidino)butano
GRE	elementos ricos en G (<i>G rich elements</i>)
GST	Glutación S transferasa
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-ácido-2-etansulfónico
IG	intergénica
IPTG	Isopropil-tiogalactopiranósido
kb	Kilo pares de bases
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
LIT	Medio de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> de infusión hepática y triptosa
min	Minutos
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIPES	Ácido piperacin N,N'-bis (2-etansulfónico)
PUF	Familia de proteínas Pumilio-FBF
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN (<i>RNA recognition motif</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
seg	segundos
SL	<i>Splice leader (miniexón)</i>
TAE	<i>Buffer</i> Tris-acetato
TBE	<i>Buffer</i> Tris-borato

TAP	Purificación por afinidad en tandem (<i>Tandem affinity purification</i>)
TE	<i>Buffer</i> Tris-EDTA
TEV	Proteasa del virus Tobacco Etch
TEMED	N,N,N',N'-Di-(dimetilamino)etano
TLCK	N-alfa-tosil-L-lisina clorometilcetona
Tris	Trihidroximetil aminometano
URE	Elementos ricos en U (<i>U rich instability elements</i>)
UTR	Región transcrita no traducida (<i>Un-Translated Region</i>)
VSG	Glicoproteínas variables de superficie (<i>variant surface glycoprotein</i>)
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido
Y2H	Doble híbrido en levadura (<i>yeast two hybrid</i>)

Resumen

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* que afecta a cerca de 18 millones de personas. El parásito presenta características biológicas excepcionales entre las que se destacan las que tienen que ver con la expresión génica. Particularmente, aunque los genes se expresan de forma policistronica las proteínas individuales muestran diferentes patrones de expresión, evidenciando el hecho de que la regulación en los tripanosomátidos opera principalmente a nivel post transcripcional. Las distintas familias de proteínas de unión al ARN serían las responsables de la funcionalidad de mensajeros particulares coordinando estos procesos a través de complejas redes de interacciones proteína-proteína y proteína-ARN.

Las proteínas de la familia PUF (Pumilio-FBF) participan en la regulación génica de diversos organismos, generalmente inhibiendo la traducción de mensajeros específicos. El mecanismo molecular de acción involucra generalmente el reclutamiento del complejo deadenilasa Ccr4p-Pop2p-Not que a su vez sería capaz de interactuar con otras maquinarias como ser las proteínas de *decapping* Dhh1p y Dcp1p asociadas a estructuras de tipo *P bodies*.

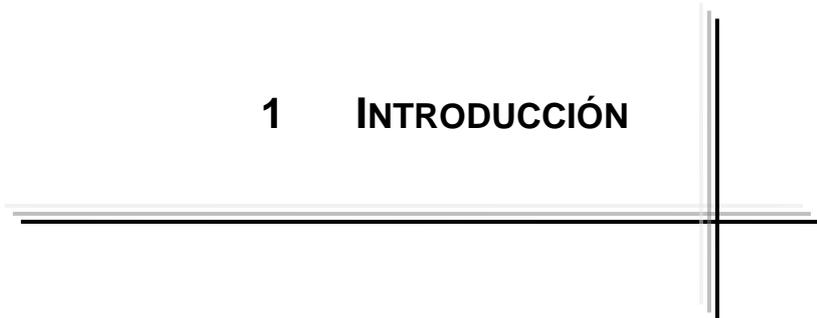
En este trabajo nos proponemos ahondar en los mecanismos regulatorios de *T. cruzi* centrándonos en un miembro de la familia de proteínas PUF.

Durante el desarrollo del trabajo se clonó y caracterizó TcPUF6. Se comprobó que las características de secuencia de esta proteína así como de las otras proteínas PUF de *T. cruzi* coinciden con las reportadas para las proteínas PUF de otros organismos.

La sobre expresión de esta proteína como fusión a un *tag* de afinidad permitió la purificación tanto de ARNs como de complejos proteicos asociados a esta proteína *in vivo*. Los ARNm identificados como blancos específicos de TcPUF6 tienen que ver con procesos diversos y se encuentran inhibidos en los parásitos que sobre expresan TcPUF6. Por otro lado, se encontró la asociación de TcPUF6 a TcDhh1. Ensayos de doble híbrido en levadura permitieron comprobar la asociación directa de TcPUF6 a TcPop2, proteína clave para el reclutamiento de los otros miembros del complejo en otros organismos.



1 INTRODUCCIÓN



1.1 *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Enfermedad de Chagas y ciclo de vida

La **enfermedad de Chagas** es una parasitosis causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida por diversas especies de insectos de la familia Reduviidae (Chagas 1909). Esta enfermedad afecta a cerca de 18 millones de personas en 21 países de América Central y del Sur, estando varios millones de personas en riesgo de contagio (WHO 1998; WHO 2002).

La enfermedad de Chagas presenta dos fases en su evolución clínica. Una fase aguda que comprende entre los dos y seis primeros meses de infección y se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables y por altas parasitemias. La mayor parte de las veces pasa desapercibida y en algunos casos los síntomas van desde estado febril e inflamación en la zona de la ingreso del parásito (Chagoma en la piel y "signo de Romanha" en la membrana ocular) hasta la muerte del hospedero. Los síntomas desaparecen a los pocos meses y la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica con parasitemia baja y asintomática. Alrededor de un 30-40% de los pacientes en esta última fase desarrolla síndrome chagásico, que toma varias formas dependiendo del sitio en el que los amastigotas se desarrollen. Las consecuencias más serias de la infección son la insuficiencia cardíaca (miocardiopatía) y la pérdida de control nervioso sobre el tracto digestivo debido a la presencia de parásitos en el sistema nervioso.

T. cruzi pertenece a la Clase *Zoomastigophora*, Orden *Kinetoplastidiae*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*. El **ciclo de vida** de *T. cruzi* transcurre entre dos hospederos: uno invertebrado, el insecto triatomineo o vinchuca (*Triatoma infestans* y *Triatoma rubrovaria* en nuestro país), y otro vertebrado, el hospedero mamífero. El parásito presenta cuatro estadios principales relacionados con sus distintos entornos: la forma epimastigota replicativa (en la luz del intestino del insecto), la forma tripomastigota metacíclica, no replicativa (en la ampolla rectal del insecto), la forma amastigota replicativa (en las células del hospedero mamífero) que se diferencia nuevamente en formas tripomastigotas celulares que lisan la célula y son liberadas al torrente sanguíneo pudiendo infectar otras células o cerrar el

ciclo al ser ingeridas por un insecto vector (Figura 1.1.1) (Tyler *et al.* 2001).

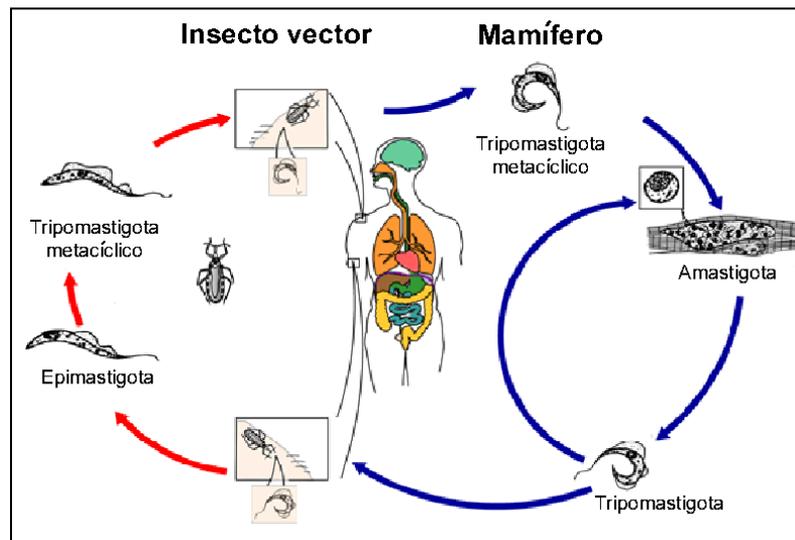


Figura 1.1.1 - Esquema mostrando el ciclo de vida de *T. cruzi*. Extraída y modificada del sitio web del "Centers for Disease Control and Prevention" (USA, www.cdc.gov).

Los tripomastigotas metacíclicos tienen el núcleo cercano a la parte posterior de su cuerpo. Tienen además, un flagelo libre anclado a una membrana ondulante en el cuerpo y el kinetoplasto tiene una ubicación posterior al núcleo y forma de canasto abierto (Tyler *et al.* 2001).

Los tripomastigotas sanguíneos, están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del hospedero, incluyendo anticuerpos específicos. A diferencia de los tripanosomátidos africanos, los tripomastigotas de *T. cruzi* no poseen el mecanismo de variación antigénica, sino que expresan en su superficie múltiples miembros de una gran familia de moléculas, siendo las más caracterizadas las mucinas y las trans-sialidasas (Frasch 2000). Si bien los tripomastigotas metacíclicos y los sanguíneos son casi indistinguibles morfológicamente, existen diferencias a nivel de su biología molecular.

Los amastigotas, son intracelulares, de forma oval o redondeada y no tienen flagelo protuberante. Estudios realizados con amastigotas obtenidos de diferentes fuentes han mostrado que también son infectivos para las células de vertebrados (de Carvalho *et al.* 1986).

Los epimastigotas tienen un flagelo anclado cerca del centro del cuerpo del parásito. El kinetoplasto se ubica anterior al núcleo y tiene forma de disco.

1.1.2 Aspectos de biología molecular

Debido probablemente a la distancia filogenética respecto a otros eucariotas (los flagelados aparecieron hace aproximadamente 1500 millones de años), los tripanosomátidos presentan **características biológicas excepcionales** (Smith *et al.* 1996). Entre estas propiedades se encuentra la presencia de una única gran mitocondria que contiene hasta el 25% del ADN celular total. Por otro lado la envoltura nuclear es conservada durante la división celular y el huso mitótico se forma en el núcleo. Además, la cromatina no se condensa hasta cromosomas (De Souza 2002).

Entre las particularidades de estos organismos, se destacan las que tienen que ver con la **expresión génica**. La expresión de los genes nucleares que codifican proteínas ocurre por transcripción policistrónica que da lugar a ARNs transcritos primarios que incluyen varios genes en una misma molécula precursora. Estos ARNs policistrónicos son procesados por un mecanismo intermolecular llamado *trans-splicing* que fue descrito por primera vez en los tripanosomátidos (Liang *et al.* 2003). Este mecanismo involucra la adición de un miniexón (SL *spliced leader*) de 39 pares de bases (pb) con estructura de CAP (caperuza) a las regiones 5' de los diferentes ARNm. 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 (LeBowitz *et al.* 1993; Matthews *et al.* 1994). La secuencia del miniexón proviene del extremo 5' de un ARN nuclear pequeño de 120 nt (snRNA), el ARN SL codificado por 200 genes repetidos (Agabian 1990; Tschudi *et al.* 2002). Otra característica sobresaliente de los kinetoplastideos, es la ausencia de intrones en sus genes. Existe una excepción que son los genes de la poliA polimerasa (PAP) de *T. cruzi* y *T. brucei* los cuales si están interrumpidos. Con esta observación se pudo establecer que el mecanismo de *cis-splicing* está también presente en estos protozoarios (Mair *et al.* 2000). Otra peculiaridad consiste en que los transcritos mitocondriales requieren una maduración que involucra la adición (o, menos frecuentemente, la delección) de residuos de ribonucleótidos (particularmente uridinas) en un proceso denominado *editing* (Shaw *et al.* 1988; Stuart *et al.* 2005).

Tampoco las polimerasas de los tripanosomátidos parecen ajustarse a

los paradigmas descritos para la mayoría de los eucariotas. La **ARN polimerasa I** en *T. brucei*, además de su función en la síntesis de los ARN ribosomales, es capaz de transcribir los ARN mensajeros de las proteínas prociclinas y VSG (*variant surface glycoprotein*) (Lee *et al.* 1997; Gunzl *et al.* 2003). La estructura de sus promotores se parece mucho a la de los promotores de ARN ribosomales de eucariotas superiores (Laufer *et al.* 2001; Tschudi *et al.* 2002; Walgraffe *et al.* 2005). Por su parte la **ARN polimerasa II** es responsable de la transcripción de los ARN pequeños nucleares, del gen *ARN SL* además de los genes que van a dar lugar a proteínas. Hasta la fecha, el único promotor identificado como tal para esta polimerasa, en tripanosomátidos, es el promotor del gen *ARN SL* (Gilinger *et al.* 2001). En *T. brucei*, estos promotores consisten en tres elementos cortos poco espaciados que se localizan corriente arriba y próximos al sitio de inicio de la transcripción. Estudios genéticos y bioquímicos de los elementos del promotor del gen *ARN SL* en *Leptomonas seymouri* han llevado al aislamiento del primer factor de transcripción (PBP-1) en tripanosomátidos (Das *et al.* 2003). PBP-1 interacciona con el elemento del promotor localizado entre 60 y 80pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. En *T. brucei* se caracterizó el factor de transcripción relacionado a TBP (TRF4)(Ruan *et al.* 2004) siendo reclutado por el gen *ARN SL* transcrito por la ARN polimerasa II, así como también por unidades transcripcionales de la ARN polimerasa I y III. Este factor se une a regiones 3' de ciertos genes codificantes para proteínas, evidenciando un aspecto único de la transcripción por la ARN polimerasa II en estos organismos. En *T. cruzi*, se caracterizó la proteína PPB1 (*PSE promoter-binding protein*) de 45kDa, que reconoce el promotor del minixón lo que indica que sería entonces un posible factor de transcripción (Wen *et al.* 2000).

Si bien se han descrito algunas regiones como promotores de genes que codifican proteínas, su capacidad para incrementar el inicio de la transcripción no es muy clara. Varias regiones intergénicas resultan capaces de promover la transcripción. Llamativamente, si bien estas regiones intergénicas son indispensables para el correcto procesamiento del mensaje, no se ha encontrado ningún elemento promotor clásico en ellas (Clayton 2002). Asimismo, la secuenciación de los genomas completos ha permitido corroborar que los genes que codifican proteínas están organizados en unidades de

transcripción policistrónicas con estricta polaridad de hebra (Andersson 1998; Myler *et al.* 1999; El-Sayed *et al.* 2005). Este hecho podría apoyar la existencia de un promotor para la ARN polimerasa II delante de cada unidad de transcripción. En el cromosoma 1 de *Leishmania*, donde la región de cambio de hebra se propuso como un promotor potencial, estudios de *run-on* sugieren que la transcripción se iniciaba bidireccionalmente hacia los telómeros en una región <100pb en la zona del cambio de hebra entre los dos clusters. Sin embargo, esta región no es requerida para la expresión de los genes de esas unidades de transcripción (Myler *et al.* 1999; Dubessay *et al.* 2002; Martínez-Calvillo *et al.* 2003). En forma alternativa, y en función que hasta el momento no se han podido identificar promotores para genes que codifican proteínas, se mantiene la hipótesis de que la transcripción se iniciaría en puntos al azar en el genoma mediado por secuencias que facilitarían la formación de complejo abierto de transcripción. Se presume entonces que la mayoría de los genes son transcritos constitutivamente (Andersson 1998; Worthey *et al.* 2003). Consecuentemente con esta idea, los análisis del genoma de los tripanosomátidos revelaron muy pocos posibles factores transcripcionales reguladores (Palenchar *et al.* 2006).

Sin embargo, a pesar de su transcripción primaria común, los genes individuales que pertenecen a la misma unidad de transcripción policistrónica muestran diferentes patrones de expresión, evidenciando el hecho de que la regulación en los tripanosomátidos opera principalmente a nivel post transcripcional (Clayton 2002). Las regiones no traducidas que flanquean los genes constituyen sitios claves en la modulación de la abundancia de los ARNm (Vanhamme *et al.* 1995).

1.1.3 Regulación post transcripcional

El ARNm es uno de los principales blancos de regulación en el parásito. Su estabilización o degradación modula la vida media de la molécula en los diferentes estadios del parásito (Furger *et al.* 1997).

Existen numerosos **elementos en cis** que se ha visto que afectan la vida media de los ARNm maduros, de los cuales la mayor parte se localizan en la región 3' no traducidas (3' UTR) (Hotz *et al.* 1997; Teixeira 1998; Coughlin *et al.* 2000; Clayton *et al.* 2007; Haile *et al.* 2007) aunque se han encontrado

también en otras regiones (Mahmood *et al.* 1999; Mahmood *et al.* 2001; Clayton 2002). Las señales a nivel del ARN son secuencias cortas y de baja conservación de secuencia siendo en muchas ocasiones importante la estructura secundaria que adopten (Furger *et al.* 1997; D'Orso *et al.* 2001).

Entre los elementos reguladores más caracterizados figuran los UREs (*U rich instability elements*) los cuales han sido encontrados en varios ARN afectando su estabilidad o traducibilidad (Haile *et al.* 2007). Los UREs parecen tener estructura y función similares a las secuencias AREs (*AU rich elements*) presentes en los mensajeros de otros organismos. En particular en *T. cruzi* se han encontrado elementos ricos en AU regulando integrantes de la familia de proteínas mucinas de estos organismos (Di Noia *et al.* 2000). También se han descrito elementos ricos en G (GREs) en las regiones 3'UTR de los genes SMUG que confieren estabilidad del ARNm en el ciclo de vida (D'Orso *et al.* 2001). En *T. brucei* se han estudiado transcritos con regiones 3'UTR reguladoras; tal es el caso de los mensajeros EP1, EP2, EP3 y GPEET que codifican para las proteínas de superficie de formas procíclicas (Drozd *et al.* 1999). La región 3'UTR de los ARNm de EP/GPEET contiene secuencias específicas que contribuyen a la estabilidad diferencial de cada ARNm a medida que el parásito migra a través del tracto digestivo del insecto vector (Vassella *et al.* 2000). Otros elementos regulatorios en *cis* denominados SIDER 1 y 2 fueron encontrados únicamente en el genoma de *Leishmania*. Estos elementos son retrotransposones dispersos que se ubican preferentemente en las regiones 3'UTR de los genes del parásito. SIDER 1 se cree que tiene que ver con la regulación de mensajeros estadio específicos, fundamentalmente mensajeros presentes en la etapa amastigota (Wu *et al.* 2000; Boucher *et al.* 2002; Rochette *et al.* 2005). SIDER 2 sin embargo parece ser un elemento general de desestabilización (Bringaud *et al.* 2007).

El número de señales que tienen que ver con este tipo de regulación sigue en aumento y en trabajos recientes se continúan encontrando mensajeros que están siendo regulados por diferentes tipos de señales (Brooks *et al.* 2001; Engstler *et al.* 2004; Webb *et al.* 2005; Webb *et al.* 2005; Mayho *et al.* 2006; Colasante *et al.* 2007; Robles *et al.* 2008).

En la siguiente tabla (Figura 1.1.2) extraída de una revisión reciente (Haile *et al.* 2007) podemos ver una lista actualizada de los elementos

reguladores en *cis* ubicados en las regiones 3' UTR de los tripanosomátidos.

3'UTR elements	mRNA	Organism
UREs		
U-rich element (26 mer) ^a	EP1 procyclin ^b	<i>T. brucei</i>
U-rich (similar to the EP1 26 mer)	Phosphoglycerate kinase PGKB ^b	<i>T. brucei</i>
U-rich (similar to the EP1 26 mer)	Pyruvate phosphate dikinase ^b	<i>T. brucei</i>
U-rich 26 mer	Cytochrome oxidase subunits	<i>T. brucei</i>
AU-rich element	Small mucin SMUG	<i>T. cruzi</i>
U-rich element	Amastin ^c	<i>Leishmania</i>
SIDERS		
SIDER2 ^{d,e}	Hypothetical protein	<i>Leishmania</i>
SIDER2 ^{d,e}	Aminomethyltransferase	<i>Leishmania</i>
SIDER1 ^d (450 nt) ^f	Amastin	<i>Leishmania</i>
Individual cis-elements		
16 mer stem loop	EP1 procyclin	<i>T. brucei</i>
124 nt (cold-shock responsive element)	EP1 procyclin	<i>T. brucei</i>
300 nt	Amastin	<i>Leishmania</i>
418 nt (more than 2 elements)	Glycosomal PGKC	<i>T. brucei</i>
200 nt	Amastin	<i>T. cruzi</i>
10 nt	Paraxiflagellar rod PFR2G	<i>Leishmania</i>
270 nt	HSP83	<i>Leishmania</i>
117 nt	HSP70	<i>Leishmania</i>
202 nt	GP63 major surface protease (MSPL)	<i>Leishmania</i>
250 nt	A600-4	<i>Leishmania</i>
500 nt	A600-4	<i>Leishmania</i>

Figura 1.1.2 - Resumen de los elementos regulatorios descritos en los 3' UTR de mensajeros de tripanosomátidos. Extraído de (Haile *et al.* 2007)

Recientemente ha sido publicado el análisis de la secuencia genómica de los tres tripanosomátidos modelo *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major* definiéndose el término de TriTryps para referirse al conjunto de los tres organismos. Consistentemente con la existencia de un gran número de señales diferentes, el análisis del genoma de los TriTryps ha revelado la existencia de un gran número de proteínas de unión al ARN reguladoras además de factores de unión al ADN (El-Sayed *et al.* 2005). Sin embargo, sólo unas pocas de ellas han sido caracterizadas hasta el momento (Clayton 2002; D'Orso *et al.* 2003).

Con respecto a los **factores de unión al ADN**, se han identificado proteínas del aparato de transcripción (Wen *et al.* 2000; Espinosa *et al.* 2003;

Schimanski *et al.* 2003; Ruan *et al.* 2004; Devaux *et al.* 2006), además de proteínas que intervienen en el *trans-splicing* y *editing* (Liu *et al.* 2005; Lukes *et al.* 2005; Stuart *et al.* 2005).

En cuanto a **proteínas de unión al ARNm** se han descrito fundamentalmente integrantes de las familias de proteínas con dominios RRM (Manger *et al.* 1998; D'Orso *et al.* 2001; D'Orso *et al.* 2002; Hartmann *et al.* 2007; Perez-Diaz *et al.* 2007; Hartmann *et al.* 2008) y con dominios de tipo dedos de zinc (Hendriks *et al.* 2001; Morking *et al.* 2004; Hendriks *et al.* 2005; Paterou *et al.* 2006). Estas proteínas están vinculadas a la regulación de la expresión génica a nivel de mensajeros interviniendo en los procesos de maduración (Matthews *et al.* 1994; Xu *et al.* 2001; Portal *et al.* 2003; Portal *et al.* 2003; Vazquez *et al.* 2003), *editing* (Madison-Antenucci *et al.* 2002), recambio o traducibilidad (D'Orso *et al.* 2003; Haile *et al.* 2003; Haile *et al.* 2007). Dentro de las familias de proteínas regulatorias de unión al ARN encontramos miembros de las proteínas PUF en las cuales nos centraremos en este trabajo y comentaremos en detalle más adelante (Dallagiovanna *et al.* 2005; Dallagiovanna *et al.* 2007) (Ver sección 4 "Resultados y Discusión").

Por otro lado se ha encontrado un exosoma similar a los conocidos de otros eucariotas que interviene en el inicio de la degradación de ARNm muy inestables.

Se ha sugerido para tripanosomátidos otro posible mecanismo regulatorio que podría dar cuenta de los casos en los que la concentración del ARNm no se ve modificada (Saas *et al.* 2000). Este mecanismo consistiría en la movilización diferencial de determinados mensajeros hacia la fracción polisomal. Existen evidencias experimentales de este fenómeno en al menos dos casos reportados. Uno de ellos es sobre una familia de proteínas de unión a quitinas (Dallagiovanna *et al.* 2001) y el otro en un gen específico del proceso de metaciclogénesis (Avila *et al.* 2001). La regulación de este proceso estaría dada a nivel de la formación del complejo de iniciación de la traducción y del paso subsiguiente de elongación (McCarthy 1998). Este mecanismo de regulación coexiste con los antes mencionados ya que paralelamente algunos genes están siendo regulados a través de la estabilización de los mensajeros (Avila *et al.* 2001).

1.2 Familia de proteínas PUF

La regulación de la expresión génica en organismos eucariotas ha sido generalmente estudiada a nivel de la transcripción de mensajeros particulares. Sin embargo, recientemente la importancia de la regulación post transcripcional ha sido re-evaluada a la luz de nuevas técnicas que permiten el estudio dinámico de la producción, recambio y traducibilidad de los ARNm celulares. A diferencia de los estudios clásicos que evaluaban los niveles de estado estacionario de los ARNm estas metodologías han permitido revelar la importancia de la regulación a nivel de los mensajeros en la determinación del proteoma celular. Las distintas familias de proteínas de unión al ARN serían las responsables de la coordinación de estos procesos a través de complejas redes de interacciones proteína-proteína y proteína-ARN (Abaza *et al.* 2008). De esta forma se plantea la existencia de operones post transcripcionales los cuales consistirían en la coordinación de mensajeros diferentes pero de función relacionada llevada a cabo por los complejos proteicos que se unen a ellos. Dado que el destino particular de un determinado ARNm depende de su asociación con complejos multi-proteicos, mensajeros relacionados podrían ser co-regulados si fueran capaces de interactuar con los mismos factores reguladores (Keene 2007).

Como vemos, las proteínas de unión al ARN, que van a ser las encargadas de reconocer las distintas subpoblaciones de mensajeros, juegan un rol de fundamental importancia en estos procesos. En eucariotas encontramos una gran variedad de estas proteínas las cuales tienen diferentes características en cuanto a las señales que reconocen en sus blancos, los mecanismos de acción por los cuales actúan y el destino final de los mensajeros que regulan (Lunde *et al.* 2007). Aunque la población de ARNs es muy diversa, las proteínas de unión a este ácido nucleico son modulares y se pueden agrupar en un número acotado de familias cuyos integrantes comparten características comunes. La diversidad de unión está dada en general por la presencia de más de un dominio de interacción, presentados en varios tipos de arreglos estructurales en las proteínas de reconocimiento específicas (Tabla 1.2.1).

Dominio	Topología	Estructuras representativas
RRM	$\alpha\beta$	U1A N-terminal RRM18
KH	$\alpha\beta$	Nova-1 KH3 (tipo I), NusA (tipo II)
dsRBD	$\alpha\beta$	dsRBD3 de Staufen
ZnF-CCHH	$\alpha\beta$	Dedos 4–6 de TFIIIA
ZnF-CCCH	---	Dedos 1 y 2 de TIS11d
S1	β	Ribonucleasa II, Exosoma
PAZ	$\alpha\beta$	PAZ, Argonauta, Dicer
PIWI	$\alpha\beta$	PIWI, Argonauta
TRAP	β	TRAP
SAM	α	Vts1
Pumilio	α	Pumilio

Tabla 1.2.1 - Dominios comunes de interacción con el ARN. Modificado de (Lunde *et al.* 2007)

Las proteínas de la familia PUF participan en la regulación génica de diversos organismos, generalmente inhibiendo la traducción de mensajeros específicos a través de una interacción directa con los mismos (Parisi *et al.* 2000; Wickens *et al.* 2002). Los primeros miembros en ser analizados en detalle fueron la proteína Pumilio de *Drosophila melanogaster* y la FBF (fem-3 binding factor) de *Caenorhabditis elegans* y de ahí el nombre de proteínas PUF con el que se refiere a las proteínas de esta familia.

Miembros de la familia PUF pueden ser encontrados a través de toda la escala evolutiva de los eucariotas aunque el número de miembros y las funciones específicas que cumplen puede variar enormemente. Por ejemplo, en *C. elegans* encontramos 11 miembros (Nolde *et al.* 2007), en *Saccharomyces cerevisiae* encontramos al menos 6 miembros (Gu *et al.* 2004; Matsushima *et al.* 2007; Thomson *et al.* 2007), en humanos encontramos 2 miembros, mientras que en *D. melanogaster* existe un único representante (Parisi *et al.* 2000). La lista de proteínas descritas continua en aumento a medida que se estudian otros organismos (Koziol *et al.* 2008; Lee *et al.* 2008).

Análisis filogenéticos de la familia PUF en diversos organismos ha revelado la presencia de más de un subtipo de proteína (Figura 1.2.1). Las proteínas de la subfamilia PUM presentan alta homología con Pumilio de *Drosophila*, tienen representantes en *C. elegans*, *Dyctiostelium* y son

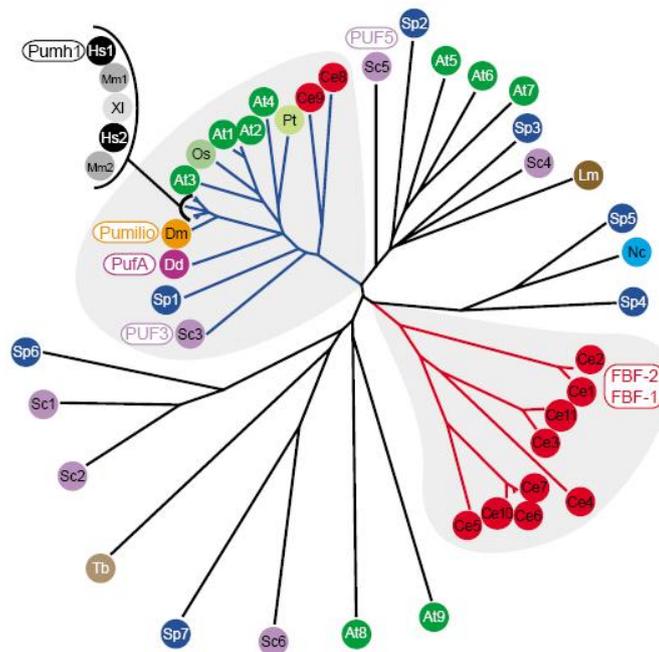


Figura 1.2.1 - Reconstrucción filogenética de diferentes miembros de la familia PUF de eucariotas. Las zonas en gris muestran las sub familias Pumilio y FBF discutidas en el texto. Las proteínas están coloreadas según la especie a la cual pertenecen. Azul a púrpura - hongos (*Saccharomyces cerevisiae*, Sc; *Schizosaccharomyces pombe*, Sp; *Neurospora crassa*, Nc; *Dictyostelium discoideum*, Dd). Gris a negro - vertebrados (*Homo sapiens*, Hs; *Mus musculus*, Mm; *Xenopus laevis*, XI). Verde - plantas (*Arabidopsis thaliana*, At; *Oryza sativa*, Os; *Populus tremula*, Pt). Marron - trypanosomas (*Leishmania major*, Lm; *Trypanosoma brucei*, Tb). Rojo - *Caenorhabditis elegans*, Ce. Naranja - *Drosophila melanogaster*, Dm. Extraído de (Wickens *et al.* 2002)

características de los vertebrados. La otra sub familia que se destaca está representada por la proteína FBF. Dentro de este *cluster* de secuencias encontramos la mayor parte de las proteínas PUF de *C. elegans*, mostrando que la familia parece haberse expandido en este organismo (Wickens *et al.* 2002; Spassov *et al.* 2003).

1.2.1 Estructura

Estas proteínas comparten un dominio conservado evolutivamente denominado PUM-HD (de Pumilio *homology domain*) ubicado generalmente en la región C-terminal. Este dominio a su vez consiste en ocho secuencias consenso repetidas denominadas cada una de ellas “repetidos Puf” flanqueadas usualmente por dos secuencias relacionadas denominadas Csp1 y 2. Cada uno de los repetidos consta de unos 40 aminoácidos, reconociéndose en cada uno de ellos una secuencia *core* que consiste

fundamentalmente en aminoácidos básicos y aromáticos (Zamore *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1997). La determinación de la estructura tridimensional de la proteína Pumilio de *D. melanogaster* y un homólogo humano revela que cada repetido se pliega en un dominio de tres α -hélices consecutivas. Los ocho dominios a su vez se ordenan para formar una estructura curvada (Figura 1.2.2). Las hélices equivalentes de los diferentes repetidos se alinean de forma

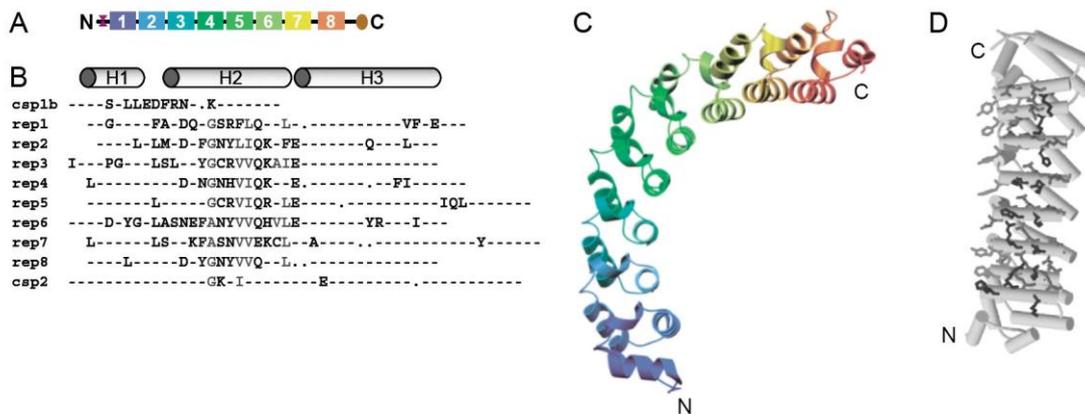


Figura 1.2.2 - Características generales de las proteínas PUF. **A** Estructura del PUM-HD. Los ocho repetidos se encuentran coloreados. La cruz y el ovalo flanqueantes corresponden a los repetidos Csp 1 y 2 respectivamente. **B** Arriba se muestra un esquema de la estructura en 3 α -hélices adoptada por cada repetido. Abajo se muestra un alineamiento y secuencia conservada entre los 8 repetidos PUM y las secuencias Csp. **C** Estructura terciaria del PUM-HD de la proteína Pumilio de *D. melanogaster*. **D** Giro de 90° de la estructura de **C**. Los aminoácidos conservados se encuentran coloreados como en **B** y están orientados hacia el lector. Extraído y modificado de (Wickens *et al.* 2002)

paralela una con otra formando entonces 3 caras en la estructura global del arco. La estructura misma de la molécula da una clara idea de la forma en la cual el PUM-HD interacciona con el ARN. El análisis de las características fisicoquímicas y el grado de conservación de los aminoácidos en la cara cóncava del repetido permite deducir que posiblemente ésta era el dominio responsable de unir al ARN, mientras que la cara convexa podría tener que ver con la interacción con otras proteínas. Por otro lado análisis de mutagénesis establecieron que los cambios que impedían la unión con la molécula de ARN se encontraban en la cara cóncava. Esta región formada por la segunda α -hélice corresponde a los aminoácidos más conservados (secuencias *core*) en la estructura primaria de los repetidos (Edwards *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001).

Las proteínas PUF, como otras familias de proteínas de unión al ARN, reconocen sus blancos por interacción con secuencias específicas en la región 3' no traducida de las mismas (Zamore *et al.* 1997; de Moor *et al.* 2005; Abaza

et al. 2008), habiéndose descrito recientemente una excepción a esta regla en la que el sitio de unión se encuentra dentro de la región codificante del mensajero (Muraro *et al.* 2008). La especificidad de unión de varias proteínas PUF ha sido estudiada en detalle. A diferencia de otras familias de proteínas de unión al ARN en las cuales las características estructurales de las regiones blanco son importantes, estas proteínas reconocen secuencias lineales particulares (Lunde *et al.* 2007). La primera secuencia descrita fue el elemento de respuesta a nanos (NRE) presente en el 3'UTR del mensajero del gen *hunchback* de *D. melanogaster*. En el NRE se reconocieron dos secuencias cortas contiguas que se creyeron importantes para la interacción, una de las cuales contenía un triplete UGU. El análisis de otras interacciones estableció que este triplete generalmente seguido de una purina es importante para el reconocimiento en casi todas las proteínas PUF estudiadas (Spasov *et al.* 2003; Gerber *et al.* 2006). Sin embargo, cada proteína es altamente selectiva lo cual indica que las secuencias que lo flanquean son también importantes para el reconocimiento (Zamore *et al.* 1997; Jackson *et al.* 2004; Opperman *et al.* 2005).

La co-cristalización de la proteína Pumilio1 humana con un ARN blanco de alta afinidad, permitió dilucidar la manera en la cual los diferentes aminoácidos del PUM-HD interaccionan con la molécula de ARN (Wang *et al.* 2002). Los resultados muestran que la interacción se da a través de los aminoácidos presentes en la cara cóncava del dominio, como previamente se había sugerido. Sin embargo, la interacción se establece de forma mayoritaria directamente con las bases y minoritariamente con el esqueleto azúcar fosfato el cual queda excluido hacia el solvente. Esto resultó sorprendente dada la alta densidad de carga positiva de esta región. Cada uno de los 8 dominios interactúa a través de los aminoácidos conservados 12, 13 y 16 con una única base en el ARN, actuando entonces cada uno como un módulo que reconoce una base específica. Por lo tanto, la secuencia final de reconocimiento depende de la combinación de los aminoácidos presentes en cada repetido de manera independiente (Wang *et al.* 2002; Auweter *et al.* 2006). Este hecho ha permitido incluso en estudios *in vitro* modificar de manera predecible la secuencia de reconocimiento de dominios PUM a través de cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Wang *et al.* 2002; Opperman *et al.*

2005; Cheong *et al.* 2006). Sin embargo, como comentamos anteriormente, *in vivo* cada proteína Pumilio es capaz de interactuar con varios blancos que difieren bastante fuera del UGU central e incluso, en algunos casos, este triplete no está presente (Gerber *et al.* 2006). En otros casos, las proteínas reconocen secuencias de más de 8 nucleótidos de longitud (Opperman *et al.* 2005). Esta aparente contradicción fue analizada en detalle en publicaciones recientes de co-cristalización de las proteínas PUF con distintos blancos. En estos estudios se muestra que en realidad cada repetido es capaz de interactuar con más de un tipo de base y, por otra parte, en determinados casos una base dentro del sitio de reconocimiento puede ser extruida hacia el solvente o interactuar con otra base del ARN y de esta manera no interactuar directamente con la proteína (Figura 1.2.3). Estos resultados también se apoyan en que las posiciones en las que las bases son extruidas son las menos conservadas entre las secuencias consenso de los ARN blancos de las proteínas estudiadas, mientras que las bases que interactúan directamente con la proteína son las más conservadas en los ARN blanco (Gupta *et al.* 2008; Miller *et al.* 2008).

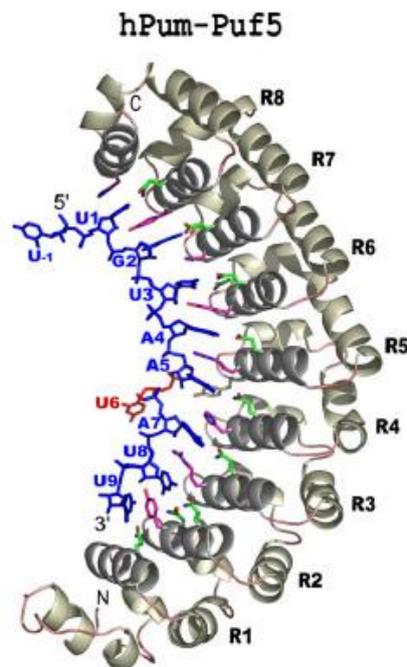


Figura 1.2.3 - Estructura del dominio PUM-HD de Pumilio de *D. melanogaster* en complejo con la región de reconocimiento de Puf5 de levadura. En rojo se indica la base extruida hacia el solvente. Extraído de (Gupta *et al.* 2008).

1.2.2 Mecanismo de acción

La especificidad y los efectos de las proteínas PUF viene dada por las proteínas con la cuales éstas interactúan. Desde la descripción de Pumilio de *D. melanogaster* se conoce que estas proteínas ejercen su función formando complejos con otras proteínas reguladoras. Como comentamos antes, Pumilio es capaz de reconocer al mensajero de *hunchback* y unir al regulador Nanos y Brain Tumor (Btat) (Barker *et al.* 1992; Sonoda *et al.* 1999; Sonoda *et al.* 2001). La interacción entre los otros reguladores y Pumilio depende de un *loop* que se ubica entre el séptimo y el octavo repetido PUM mostrando que el PUM-HD es el responsable tanto de la unión con el ARN como con los compañeros proteicos (Parisi *et al.* 2000). De hecho, en estudios de mutantes en proteínas PUF, la transfección sólo con la región del PUM-HD es capaz de recuperar casi todo el fenotipo salvaje (Wharton *et al.* 1998). Este complejo se sabe desde hace tiempo que sería capaz de deadenilar el ARN blanco y por lo tanto disminuir su estabilidad y traducibilidad (Wreden *et al.* 1997). Sin embargo, no se tenían evidencias del mecanismo por el cual Pumilio ejerce este efecto ni si era general a todos los miembros de la familia.

Trabajos recientes del grupo de Wickens sugieren un mecanismo general por el cual las proteínas PUF podrían ejercer su efecto. Estos autores demuestran que la proteína Mpt5 (Puf5) perteneciente a la familia PUF de levadura es capaz de deadenilar su ARN mensajero blanco a partir del reclutamiento del complejo Ccr4p-Pop2p-Not. La intervención de este complejo en la deadenilación mediada por proteínas de unión al ARN se había sugerido previamente, comentándose incluso la hipótesis de que Puf3 podría actuar a través del reclutamiento de estas proteínas (Tucker *et al.* 2002). Aunque la proteína Pop2 podría tener actividad de deadenilasa, en este mismo trabajo se define a Ccr4 como la subunidad catalítica principal del complejo. Wickens y colaboradores demuestran que Mpt5 une directamente la proteína Pop2 reclutando así el resto del complejo, confirmando que Ccr4 es la principal proteína con actividad deadenilasa y que Pop2 actuaría como puente reconociendo a la proteína PUF, siendo entonces ambas proteínas esenciales para la deadenilación del mensajero blanco (Goldstrohm *et al.* 2007).

Por otro lado, mutantes en Ccr4 son de todas formas capaces de reprimir la traducción de manera Mpt5 dependiente, mientras que mutantes en Pop2 no son capaces ni de deadenilar ni de reprimir la traducción de mensajeros blanco. Estos resultados sugieren que el reclutamiento de Pop2 podría servir para favorecer otras interacciones con proteínas reguladoras independientemente del reclutamiento de Ccr4. En este sentido el reclutamiento de las proteínas Dhh1p y Dcp1p vía su unión a Pop2 podría jugar un rol crucial, ya que estas proteínas median la remoción del CAP de los mensajeros y por lo tanto participan en su represión traduccional y degradación (Goldstrohm *et al.* 2006). Por último, los autores demuestran que proteínas PUF de *C. elegans* y humanas también interactúan con Pop2 con lo cual este mecanismo de acción de las proteínas PUF podría estar conservado evolutivamente (Figura 1.2.4). Es importante señalar que la universalidad de este mecanismo ha sido discutida por otros autores estudiando otros sistemas regulatorios, proponiendo alternativas para el reclutamiento del complejo deadenilasa (Kadyrova *et al.* 2007).

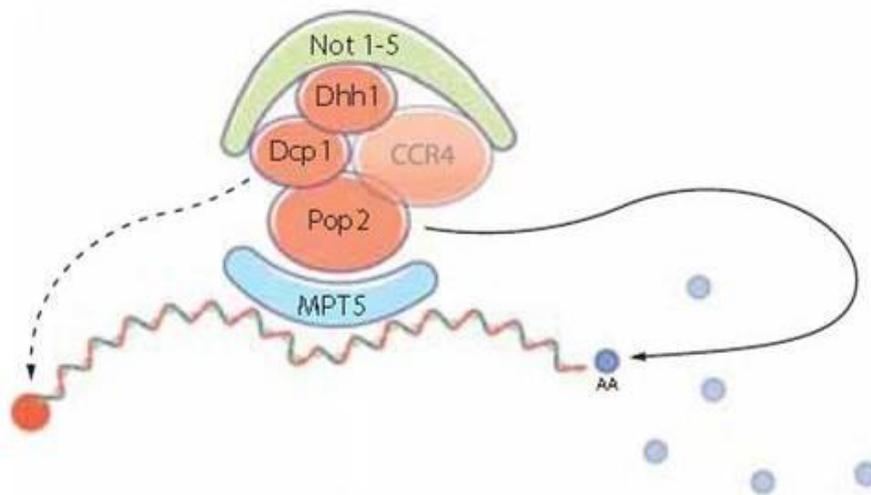


Figura 1.2.4 - Mecanismo general de acción de las proteínas PUF propuesto por Wickens y colaboradores. La línea punteada representa la remoción de la caperuza 5' mediada por Dhh1/Dcp1 mientras que la continua representa la deadenilación mediada por Ccr4. Extraído y modificado de (Wharton *et al.* 2006).

Por otra parte, la regulación de los blancos de las proteínas PUF podría estar bajo el control de varios de estos complejos simultáneamente. Por ejemplo la proteína Mpt5 es capaz de reconocer el mismo mensajero que otras proteínas PUF de levaduras cada una reconociendo sitios blancos contiguos (Hook *et al.* 2007; Ulbricht *et al.* 2008).

Esta maquinaria proteica junto con los ARN que están siendo procesados por la misma se encuentra localizada en regiones específicas en forma de focos discretos del citoplasma celular. Estos gránulos de ribonucleoproteínas denominados *P bodies* cuentan además con maquinaria de represión traduccional, de vigilancia de ARNm y de silenciamiento mediado por ARN. Por lo tanto se propone que constituyen estructuras donde se toma la decisión si un determinado ARNm será degradado, silenciado o enviado a la fracción polisomal para ser traducido (Eulalio *et al.* 2007).

1.2.3 Funciones fisiológicas

Las proteínas PUF influyen una diversidad de funciones fisiológicas en las células. En este sentido, la misma proteína puede estar involucrada en varios procesos celulares. Pumilio de *D. melanogaster* fue descrita como un regulador clave de la determinación del eje antero posterior regulando la acción del gen *hunchback* (Barker *et al.* 1992; Sonoda *et al.* 1999). Sin embargo, poco después quedó claro que esta proteína intervenía también en el desarrollo de las células germinales de este organismo (Kobayashi *et al.* 1996). Durante la embriogénesis, las proteínas Pumilio y Nanos se acumulan en las células polares, las cuales son progenitoras de las células de la línea germinal. En estas células, Pumilio influye en la correcta segregación a las gónadas así como en la coordinación de la división celular (Asaoka-Taguchi *et al.* 1999). En este caso, el complejo entre Nanos y Pumilio actuaría a través de la represión específica del mensajero que codifica la Ciclina B (Kadyrova *et al.* 2007). Más recientemente se relaciona a Pumilio en el desarrollo y función neuronal (Dubnau *et al.* 2003; Menon *et al.* 2004; Ye *et al.* 2004; Muraro *et al.* 2008).

La diversidad funcional de Pumilio queda clara con el análisis directo a nivel global de los blancos de esta proteína en *Drosophila*. En un trabajo reciente se analiza por ensayos de ribonómica la asociación con sus mensajeros blanco en el estadio adulto y en embriones. Los resultados muestran que en ambos estadios los mensajeros se unen a sets diferentes de ARNm. Aun más, estos mensajeros pueden ser agrupados en diferentes subpoblaciones cuyos miembros codifican para proteínas funcionalmente relacionadas (Gerber *et al.* 2006). Las claras diferencias en función de las proteínas sintetizadas por las subpoblaciones de mensajeros afectados,

muestran que Pumilio es capaz de regular diferentes procesos a nivel fisiológico.

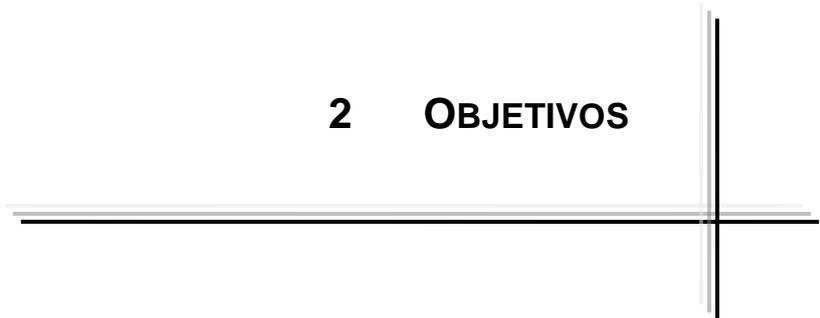
Por otra parte los diferentes integrantes de la familia en un mismo organismo pueden estar involucrados en distintos procesos. En un trabajo similar al anterior, se analiza por ensayos de ribonómica la unión de las distintas proteínas PUF de *S. cerevisiae* a sus mensajeros blanco. En éste, se demuestra que casi un 10 % de los mensajeros celulares son capaces de interaccionar con algún miembro de la familia, mostrando su posible rol preponderante en la regulación del proteoma del organismo en estudio. Además los autores observan que los diferentes integrantes de la familia unen subpoblaciones particulares de mensajeros evidenciando la diferenciación funcional entre las distintas proteínas PUF (Gerber *et al.* 2004).

Por último, entre los distintos organismos las proteínas PUF pueden afectar procesos distintos, como muestra la comparación entre los trabajos de ribonómica comentados con anterioridad. Los autores concluyen que los mensajeros que se encuentran regulados por las proteínas PUF difieren en gran medida y por lo tanto, los procesos que van a estar afectando estas proteínas en cada organismo serán también distintos (Gerber *et al.* 2006).

Aunque como vemos, las vías en las cuales las proteínas PUF actúan son extremadamente diversas, se ha sugerido que en todas las especies tendrían un rol común en el mantenimiento de células indiferenciadas. Por lo tanto, se especula que ésta puede haber sido su función ancestral evolucionando luego toda la serie de procesos en los que proteínas de esta familia participan (Wickens *et al.* 2002).



2 OBJETIVOS



Debido a la gran dependencia en la regulación post transcripcional, la identificación y caracterización funcional de nuevas proteínas de unión a ácidos nucleicos en el parásito *T. cruzi* es un punto fundamental para la comprensión de su biología molecular. Por otra parte, esto convierte a este organismo es un modelo ideal para el estudio de mecanismos post transcripcionales. Esto es de gran relevancia a la luz de que este tipo de regulación está siendo reconocida como de gran importancia en todos los eucariotas en general.

Las proteínas de la familia PUF, que se encuentran extendidas en todos los eucariotas estudiados, resultan muy interesantes para comprender los mecanismos regulatorios a nivel post transcripcional. En particular en *T. cruzi* los miembros de esta familia podrían jugar roles fundamentales en la biología del parásito.

2.1 Objetivo general

En este trabajo nos proponemos ahondar en los mecanismos regulatorios de la expresión génica en *T. cruzi* centrándonos en un miembro de la familia de proteínas PUF en este organismo.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar y caracterizar la proteína TcPUF6 de *T. cruzi*.
- Estudiar el contexto de la familia de proteínas PUF en tripanosomátidos
- Implementar metodologías que permitan estudiar los posibles blancos de esta proteína en *T. cruzi*.
- Implementar metodologías que permitan estudiar los compañeros moleculares de acción de TcPUF6



3 MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Líneas celulares

3.1.1 Cepas bacterianas

E. coli XL1 blue (*supE hsdR lac⁻ F' proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*)
E. coli DH5α (*F⁻, φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1*)

3.1.2 Cepas de *T.cruzi*

En este trabajo se utilizó la cepa Dm28c (Contreras *et al.* 1988).

3.1.3 Cepas de levadura

Se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MAV203 (*MATα, leu2-3,112, trp1-901, his3Δ200, ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3_{UAS} GAL1::HIS3@LYS2, can1^R, cyh2^R*)

3.2 Medios de cultivo

- Medio líquido LB: bacto triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L. Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5N y se autoclava.
- Medio LB agar: medio LB líquido más bacto agar al 1.5%.
- Medio LIT: NaCl 4g, KCl 0,4g, Na₂HPO₄·7H₂O 15g, glucosa 2g, infusión de hígado 3g, triptosa 5g, hemoglobina 2%, suero bovino fetal 10%, Streptomycin 30mg, Penicilina 50mg y agua hasta llegar a un litro.
- Medio líquido YPAD: extracto de levadura 10g/L, bacto peptona 20g/L, dextrosa 20g/L, adenina sulfato 0.1g/L
- Medio YPAD agar: medio YPAD líquido más bacto agar al 2%
- Medio SC: Base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos (Sigma, número de catalogo Y0626) 6.7g/L, aminoácidos generales 0.075g/L (alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, isoleucina, lisina, metionina, fnilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina), adenina 0.15g/L, glucosa 20g/L. Ajustar pH a 5.9. Según la auxotrofia a ser ensayada agregar por litro de medio SC 8mL de: leucina 100mM, triptófano 40mM, uracilo 20mM (SC -Leu-Trp-His), histidina-HCl 100mM (SC -Leu-Trp-Ura).
- Medio SC agar: medio SC líquido más bacto agar al 2%.

3.3 Oligonucleótidos sintéticos

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados y purificados por desalado estándar en *Integrated DNA Technologies, Inc.*(IDT). Sus secuencias son:

PumF: 5' CGTGGATCCATGCCATCGGATGAAGAAGC 3'

PumR: 5' CCGCTCGAGTCACCTATCCGTTTTTCTCTG 3'

PUF6r_Tap: 5' ATTAAGCTTTCACCTATCCGTTTTTCTCTG 3'

PUF6f_Y2H: 5' AAGGTACCATGCCATCGGATGAAGAA G 3'

PUF6r_Y2H: 5' CCCTCGAGTGCCTATCCGTTTTTCTCTG C 3'

Pop2f_Y2H: 5' AAGTCGACAATGTCAAACACATGGGAT 3'

Pop2r_Y2H: 5' TTGAATTCTTGTTGTGGCCCTTCAC CG 3'

ATTL-1: 5' CAACTTTGTACAAAAAAGCAGGC 3'

ATTL-2: 5' GTACAAGAAAGCTGGGTCTAG 3'

extATTL1: 5' TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC 3'

extATTL2: 5' CAGAGCTGCAGCTGGATGGC 3'

3.4 Manejo de bacterias

3.4.1 Cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias se hacen en medio LB a 37°C con agitación. En el caso de bacterias transformadas con plásmidos portadores de marcadores de resistencia a ampicilina, se agrega al medio el antibiótico a una concentración de 50µg/mL. En el caso de bacterias transformadas con plásmidos portadores de marcadores de resistencia a kanamicina, se agrega al medio el antibiótico a una concentración de 50µg/mL. Las bacterias también se cultivan en medio semisólido en placas de Petri con LB agar con ampicilina. Los stocks de bacterias se conservan a -80°C en medio LB suplementado con 15% de glicerol.

3.4.2 Preparación y transformación de células competentes

Para obtener células químicamente competentes, cultivos en fase exponencial de la cepa de *E. coli* XL1-Blue se lavan repetidas veces en solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60mM; PIPES 10mM, pH 7,0), manteniendo tanto las células como las soluciones en hielo. Luego las células son alicuotadas y congeladas a -80°C en la solución anterior (Ausubel 1987). Alternativamente, se utilizaron células de la cepa DH5 α .

Para realizar la transformación, se agrega el ADN a la suspensión de células competentes. Luego de un tiempo de incubación en hielo se realiza un shock térmico de 1.5 min a 42°C. Posteriormente, las células se cultivan en medio LB con agitación durante una hora y luego se colocan en una placa de cultivo sólido (LB agar) suplementado con el antibiótico adecuado.

Para obtener células electrocompetentes cultivos en fase exponencial de la cepa de *E. coli* XL1-Blue o DH5 α se lavan repetidas veces en agua estéril manteniendo tanto las células como las soluciones en hielo.

Para realizar la electroporación, se agrega el ADN a la suspensión de células competentes y se somete a la mezcla a un pulso de 18mV. Las células se recuperan incubándolas con agitación a 37°C durante una hora en 5 volúmenes de LB conteniendo 2% de glucosa. Luego se colocan en una placa de cultivo sólido (LB agar) suplementado con el antibiótico adecuado.

3.4.3 Obtención de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico en pequeñas cantidades se realiza por el método de lisis alcalina descrito anteriormente (Sambrook *et al.* 1989), a partir de 3mL de cultivos de la cepa XL1 de *E. coli* transformada con el plásmido correspondiente. Sintéticamente, se resuspenden cultivos en fase estacionaria en *buffer* SET (sacarosa 20%, Tris-HCl 50mM pH 7.6, EDTA 6.5mM) y se lisan con una solución Hidróxido de Sodio 0.2N, SDS 1%. La solución se neutraliza con acetato de sodio 3M pH 4.8, se deja 30 min en hielo y se centrifuga a 4°C y 12.000 durante 20 min. El sobrenadante se precipita con un volumen de isopropanol, lavándose posteriormente con etanol 70%. La resuspensión se realiza en un volumen adecuado de agua purificada por MiliQ (generalmente 30 μ L).

Preparaciones mayores de ADN, se efectúan usando columnas Quiagen-tip 500 (QIAGEN Inc.) que permiten obtener alrededor de 1mg ADN.

3.5 Manejo de *Trypanosoma cruzi*

3.5.1 Cultivo de epimastigotas

Se cultivan los epimastigotas a 28°C en medio líquido de infusión hepática y triptosa suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado por calor (denominado LIT) (Castellani *et al.* 1967).

El número de células se determina por fijación de los parásitos en formaldehído al 2% en PBS y conteo en cámara de Neubauer.

3.5.2 Transfección de epimastigotas

La transfección con los vectores recombinantes se realizó tomando como referencia protocolos descritos anteriormente (Robello *et al.* 1997). De manera sintética, los parásitos son crecidos hasta la fase exponencial, se centrifugan y resuspenden en *buffer* de electroporación (Hepes 21 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 7 mM, Glucosa 6mM) a una concentración de 5x10⁷ parásitos/mL. Se electroporan 400µL de los mismos, a 1300µF, 13Ω y 450 voltios, en presencia de 50-200µg de ADN plasmídico. Luego se cultivan en medio LIT durante 24hs a 28°C. Finalizado este período se suplementa el medio con G418 para lograr la selección de los transfectantes. Luego se realizan dos diluciones de los parásitos cada tres días. Finalmente los parásitos resistentes se observan a los 15-20 días de la última dilución.

3.5.3 Extracción de ADN total

Se extrae ADN total del parásito (genómico y plasmídico) según (Coderre *et al.* 1983). Los parásitos se crecen hasta fase estacionaria, se centrifugan y lavan dos veces en PBS (NaCl 0.14M, KCl 2.6mM, KH₂PO₄ 7mM, glucosa 6mM, pH 7.4). Las células se resuspenden en *buffer* A (Tris HCl 0.2M pH 8, EDTA 0.1M) y se lisan con SDS al 0.5% y proteinasa K (100µg/mL) incubándose 4 horas a 37°C. Posteriormente se realiza una extracción

fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). El fenol se encuentra saturado y equilibrado con Tris 0.1M pH 8.0 más hidroxiquinoleína al 0.1%. El ADN se precipita con dos volúmenes y medio de etanol absoluto y se lava con etanol 70%. El precipitado se resuspende en agua y se trata con ARNasaA (10 μ g/mL) una hora a 37°C. Finalmente el ADN se extrae nuevamente con fenol:cloroformo:isoamílico y se precipita con etanol.

3.6 Manejo de levaduras

3.6.1 Cultivo

Los cultivos líquidos de levaduras se hacen en el medio rico YPAD o en el medio mínimo SC con la adición de los aminoácidos apropiados para cada caso a 30°C con agitación. Las levaduras también se cultivan en medio semisólido en placas de Petri con los mismos medios conteniendo agar (bacto agar 2%). Los stocks se conservan a -80°C en medio suplementado con 15% de glicerol.

3.6.2 Transfección

Las levaduras se crecen ON en 50mL del medio líquido adecuado hasta alcanzar la fase exponencial y luego se lavan repetidas veces en agua estéril manteniendo tanto las células como las soluciones en hielo. Finalmente se resuspenden en 300 μ L de Sorbitol 1M. A 40 μ L de la suspensión de células se le agrega el ADN a transformar y la mezcla se electropora a 2.5Kv. Las células se recuperan en 1mL volumen de YPAD:Sorbitol 1:1 durante una hora a 30°C con agitación y se plaquean en el medio sólido adecuado.

3.6.3 Ensayo de actividad β -galactosidasa

Para realizar este ensayo, se realiza una réplica de la placa maestra directamente sobre una membrana de nitrocelulosa que ha sido colocada sobre medio YPAD. Esta placa se incuba ON a 30°C.

Se prepara una solución de X-gal disolviendo 10mg del mismo en 100 μ L de Dimetil formamida (DMF). 100 μ L de esta solución se mezclan con 60 μ L de 2-

mercaptoetanol y con 10mL de *buffer* Z (Na₂HPO₄•7H₂O 16.1g, NaH₂PO₄•H₂O 5.5g, KCl 0.75g, MgSO₄•7H₂O 0.246g, en 1 L de agua destilada y ajustado a pH 7.0).

En una placa separada de apoya un papel Whatman 541 el cual se satura con la solución anterior. La membrana con las colonias crecidas se retira de la placa de YPAD y se incuba 3 veces a -80 ° durante 30 seg para permeabilizar las levaduras. Luego se apoya sobre el papel Whatman con las colonias hacia arriba y se remueve el exceso de solución con X-gal. Esta placa se incuba a 37°C ON observándose la aparición de color azul luego de este período.

3.7 Manipulación y análisis de ADN

3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20µL conteniendo una mezcla de 0.5µM de los cebadores, 1x *buffer* STR 10x (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM pH 9, MgCl₂ 15mM, Triton®X-100 15 mM, 2mM de cada dNTP (PROMEGA Corp.), 0.5 U de enzima Taq polimerasa (Gibco BRL Life Technology Corp). Previo calentamiento de la muestra a 94°C durante 4 min, se realizaron 35 ciclos de amplificación, en los cuales la temperatura oscila a 94°C durante 30 seg (para desnaturalizar el ADN), luego durante 30 seg a una temperatura generalmente 5°C por debajo de la T_m de los cebadores (para permitir la hibridación específica de los cebadores) y a 72°C (temperatura adecuada para la polimerización de nucleótidos) y un tiempo relativo al tamaño de la sonda (en general 30 seg por kilobase). Luego se deja a 72°C durante 7 min lo que asegura una polimerización completa de todos los fragmentos. La temperatura óptima para la hibridación de los cebadores es generalmente determinada empíricamente.

En el caso de los PCR de colonia se pican las bacterias de la placa con un palillo estéril el cual se sumerge en el *mix* de PCR previamente preparado como se indica arriba con la diferencia que el volumen de reacción en este caso es de 50µL.

3.7.2 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN se analizan por electroforesis en gel de agarosa 0.7% o 1% dependiendo del rango de tamaño de los fragmentos a separar. El gel es preparado en *buffer* TAE (TAE 10x: Tris-HCl 0.4M, EDTA 50mM pH 8.0, ácido acético hasta pH 7.2), y este mismo *buffer* es utilizado como *buffer* de corrida. La separación se realiza a 5V/cm. La visualización se realiza en transiluminador UV previa tinción del gel con Bromuro de etidio 0.5µg/mL final.

3.7.3 Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizan a 37°C durante una hora en *buffer* adecuado para la enzima elegida, según las instrucciones del proveedor (New England Biolabs Inc., *NEB*). Se utiliza una unidad de enzima por micro gramo de ADN, por cada sitio blanco.

3.7.4 Purificación de fragmentos de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN que se separan por electroforesis en gel de agarosa son luego extraídos utilizando el kit comercial “*GFX PCR DNA and gel band purification kit*” (Amersham Biosciences UK Limited) según las instrucciones del proveedor.

3.7.5 Precipitación

El ADN en solución es precipitado por el agregado de 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incuba a -20°C durante 30 min y luego se centrifuga a 12.000g durante 30 min a 4°C. El *pellet* es lavado con etanol 70% y se realiza una nueva centrifugación a 12.000g por 5 min. El ADN es resuspendido en agua miliQ o un *buffer* adecuado.

Alternativamente, la precipitación es realizada con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4.8 y un volumen de isopropanol. En este caso se deja a temperatura ambiente durante 15 min y luego se centrifuga a 12.000g durante 30 min. Posteriormente se procede al lavado y resuspensión de manera análoga a la precipitación con etanol.

3.7.6 Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

Este procedimiento permite la separación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por su solubilidad diferencial en los solventes orgánicos –fenol y cloroformo- e inorgánicos –agua-. Se agrega al ADN a purificar, un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1. Se agita para mezclar las fases obtenidos y luego se centrifuga durante 30 seg a 12.000g. Se retira la fase acuosa conteniendo el ADN y se repiten los pasos anteriores hasta no observar interfase. Luego se agrega a la fase acuosa un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (proporción 24:1), se mezcla, se centrifuga 30 seg a 12.000g y se retira nuevamente la fase acuosa. Esta solución de ADN es luego precipitada con etanol o isopropanol.

3.7.7 Medida de la concentración

La concentración de ADN es calculada a partir de la medida de su absorbancia (A) a 260 nanómetros, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 μ g/mL de ADN doble hebra. Para estimar la pureza de la muestra se determina también la A_{280} (λ a la que absorben las proteínas fundamentalmente). El ADN puro da una relación de A_{260}/A_{280} de 1.7.

Si la cantidad de muestra es limitante, la concentración de ADN se estima de acuerdo a la fluorescencia producida por la muestra teñida con BrEt en geles de agarosa, comparando con estándares de concentración conocida.

3.7.8 Ligación de fragmentos

Los fragmentos de ADN se ligan usando la enzima T4 ligasa (NEB Inc) de *E. coli* por incubación a 16°C durante 16 horas, según las instrucciones del proveedor. Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 15 μ L con un exceso 10 veces molar de inserto con respecto al vector, y de manera de obtener una concentración de ADN final de 5ng/ μ L. Luego 10 μ L de la mezcla de ligación se transforman en bacterias competentes y se seleccionan los clones recombinantes.

3.7.9 Ensayo de recombinación (Sistema Gateway)

La tecnología Gateway provee de un sistema de clonado universal basado en la reacción de recombinación específica de sitio del fago lambda permitiendo el pasaje de un fragmento de interés entre varios vectores distintos de manera rápida. El ensayo consta de un primer clonado que puede ser realizado por métodos tradicionales en un vector de entrada que contiene los sitios de recombinación *attL*. Este vector es luego recombinado con un segundo vector de destino que posee sitios *attR* intercambiándose las secuencias flanqueadas por los sitios *att* (Figura 3.8.1).

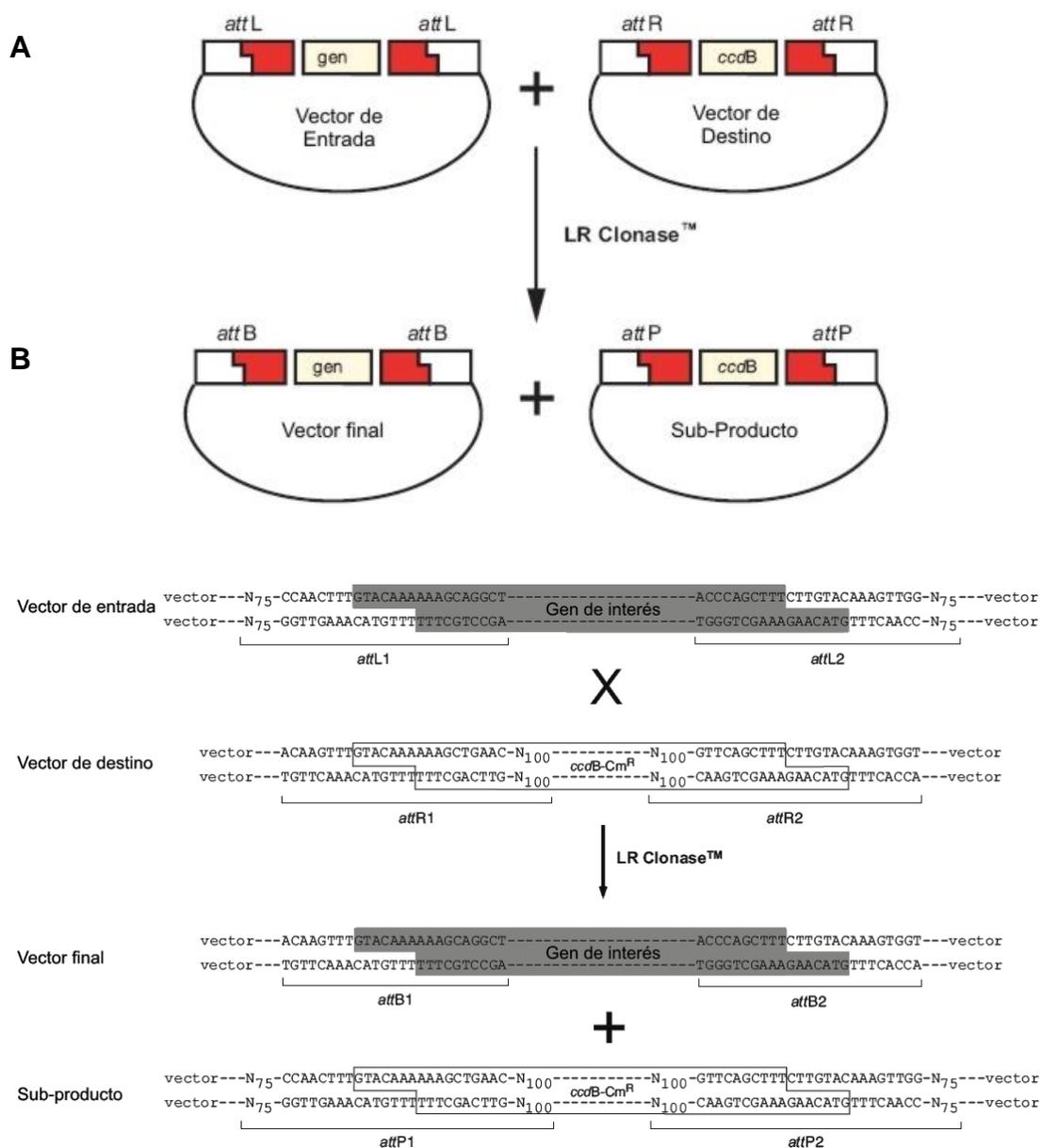


Figura 3.7.1 – Representación del sistema Gateway. **A** - Esquema de la reacción de recombinación específica mostrando reactivos y productos. **B** - Esquema detallado de la reacción a nivel de secuencia de las regiones involucradas. Extraído y modificado del manual de referencia Gateway Technology. Invitrogen.

Esta reacción está catalizada por enzimas del fago y de *E. coli* las cuales son distribuidas por el proveedor del sistema.

El vector de destino posee el gen *ccdB* que es letal en la cepa DH5 α y por lo tanto solamente serán capaces de crecer los clones que recombinaron este gen con el vector de entrada, el cual a su vez no será capaz de crecer ya que luego del intercambio poseerá el gen *ccdB*. Por otra parte, es recomendable que ambos vectores tengan diferentes resistencias a antibióticos lo cual permite seleccionar de la mezcla de recombinación únicamente los clones que incorporan el vector de destino. En el caso que ambos vectores posean el mismo marcador de resistencia a antibióticos, lo cual imposibilita la selección de las bacterias que incorporen el vector de entrada sin recombinar, se realiza una reacción de PCR utilizando como molde el vector de entrada para amplificar los sitios *attL* junto con el inserto y este producto es puesto a recombinar con el vector de destino.

En la reacción de recombinación se mezclan en un volumen final de 20 μ L de 100 a 300ng del ADN de entrada junto con 300ng del vector de destino en *buffer* de reacción 1X (Invitrogen) y *buffer* TE (EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0). A esta mezcla se agrega el mix Clonasa (Invitrogen) que posee las enzimas necesarias para catalizar la reacción la cual se incuba a 25°C durante una hora. La reacción se detiene por el agregado de proteinasa K e incubando a 37°C durante 10 min. Luego se transforma 1 μ L de esta reacción en células competentes por electroporación.

3.7.10 Análisis de plásmidos recombinantes

El análisis de los plásmidos recombinantes se realiza por métodos convencionales como corte con enzimas de restricción y electroforesis en gel.

3.7.11 Análisis de Secuencias

Los vectores construidos son secuenciados por el método de la terminación de cadena por didesoxinucleótidos en un secuenciador automático. Se usa el programa BioEdit (Hall 1999) para la comparación de las secuencias obtenidas.

3.8 Manipulación y análisis de proteínas

3.8.1 Obtención de extractos de proteínas del parásito

La preparación de proteínas solubles se realizó a partir de epimastigotas en fase exponencial de *T. cruzi*. Los parásitos se centrifugaron 15 min a 1500g y se lavaron 3 veces con PBS 1x frío. Se resuspendieron en *buffer* de lisis (Tris-HCl 10mM pH 7.5; EDTA 1mM; Ditioneitol (DTT) 5mM; CHAPS 1%; glicerol 10%; aprotinina 50µg; Fluoruro 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo (AEBSF) 25µL de concentración 100mM; pepstatina 25µg; TLCK 200µg; Leupeptina 50µg y E64 100µL de concentración 0.5mM) a una concentración de 5×10^8 parásitos/mL y se dejó agitando 30 min en hielo. Finalmente se centrifugó el lisado 1 hora a 4°C a 20000g y se guardó el SN conteniendo las proteínas solubles a -80°C.

Para el análisis de proteínas totales, se centrifugaron los parásitos a 1500g durante 15 min y se lavaron con PBS 1x. Luego se resuspendieron en PBS 1x e igual volumen de *buffer* de carga para SDS PAGE 2x (Tris-Cl 100mM pH 6.8, DTT 200mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% y glicerol 20%) hasta una concentración final de 1×10^6 parásitos/µL, luego se hirvieron durante 5 min para ser cargados en el gel de inmediato.

3.8.2 Obtención de complejos mediante TAP-tag

Los ensayos fueron realizados según (Rigaut *et al.* 1999)(ver sección 4.3 “Caracterización Genómico Funcional de los ARNm asociados a TcPuf6, una proteína Pumilio de *Trypanosoma cruzi*”). En síntesis, cultivos de los parásitos transfectados (1L) fueron crecidos a una densidad de entre 1 y 5×10^7 . Los parásitos fueron centrifugados y resuspendidos en *buffer* de lisis a una concentración de 10^9 final en presencia de inhibidores de proteasas. El extracto de proteínas fue incubado en *batch* con la columna de IgG durante 2 horas a 4°C. La columna se lavó y eluyó por incubación con la enzima TEV proteasa. Este eluido fue incubado con la columna de calmodulina en presencia de calcio. Luego de realizar lavados la columna fue eluída con EGTA obteniéndose los complejos proteicos. Se conservaron alícuotas de las diferentes fracciones de la purificación para analizar el proceso posteriormente.

3.8.3 Electroforesis en geles de acrilamida

La separación de proteínas de acuerdo a su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y SDS. El método se basa en la carga negativa que adquieren las proteínas al unirse al detergente SDS, por tanto, las proteínas migran de acuerdo a su tamaño sin importar su carga eléctrica original. La separación electroforética se realizó en geles discontinuos compuestos por un gel concentrador de composición constante y un gel separador con un porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida dependiente del tamaño de las proteínas a separar.

La composición del gel concentrador fue de Acrilamida 5%, Tris-HCl 125mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato amónico 0.04% y TEMED 0.1%. La composición del gel separador fue de Tris-HCl 375mM pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.04% y TEMED 0.05%, los porcentajes de acrilamida-bis acrilamida (29:1) fueron 10% y 12% según el caso.

Las muestras de proteínas se prepararon con un volumen de *buffer* de carga para SDS PAGE 2x y se desnaturizaron a 100°C durante 5 min antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó en *buffer* de corrida para SDS-PAGE 1x (5x: Tris base 15,1g, glicina 72g, SDS 5g, por litro). Se utilizó una cuba Mini-V 8.10 *Vertical Gel Electrophoresis System* (Gibco BRL), realizándose la electroforesis a un amperaje entre 40-45mA.

Tinción con Azul de Coomassie. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en etanol 15% y ácido acético 10% y teñidos con una solución de Azul de Coomassie (Azul de Coomassie R 0.2%, metanol 40% y ácido acético 10%) durante al menos 40 min. Posteriormente los geles se destiñeron en una solución de ácido acético 10%.

Tinción con Nitrato de Plata. 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, el gel fue reducido durante un minuto con tiosulfato de sodio (0.2g/L) y lavado dos veces con agua durante 20 seg cada lavado. Se incubó posteriormente durante 30 min en nitrato de plata (2.0g/L) y se lavó 20 seg con agua. A continuación se sumergió el gel en solución de revelado conteniendo carbonato de sodio (30g/L), formaldehído (1.4mL de solución 37%/L) y

tiosulfato de sodio (10mg/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%.

En el caso de los geles preparativos para espectrometría de masas (MS) se procedió de forma similar aunque se tuvo la precaución de trabajar en condiciones de evitar la introducción de proteínas en el procedimiento. Para esto se utilizaron guantes de látex libres de polvo, material exhaustivamente lavado y separado para este uso, soluciones nuevas filtradas de uso exclusivo, etc. Además los geles fueron realizados con acrilamida-bis acrilamida en proporción 30:0.8.

3.8.4 Transferencia a membranas y *western blot*

Se separaron las proteínas en geles SDS-PAGE tal como se comenta anteriormente y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL TM* (Amersham Biosciences) en una cuba Hoefer TE Series-Tank Transphor Unit (Amersham Biosciences) con *buffer* de transferencia para *western blot* (Tris base 20mM, glicina 150mM, metanol 20%) según protocolos establecidos. Se dejó transferir durante toda la noche a 20mA.

Se desarmó la transferencia y se puso a bloquear la membrana con leche descremada 5% en PBS-T (PBS 1X/Tween 20 0,1% v/v) durante 1 hora con agitación. Se lavó la membrana con PBS-T en exceso y se incubó una hora con el anticuerpo primario diluido 1/500 en PBS-T. El anticuerpo unido fue detectado usando un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa (Peroxidase AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch) diluido 1/7.500. El desarrollo de color se llevó a cabo usando 5mg de Diaminobencidina (DAB, Sigma) diluido en 10mL Tris 0.05M pH 7.6 y 10 μ L H₂O₂ 30%. La reacción fue detenida con agua.

3.8.5 Dosificación por Método de Biuret

Para la determinación de la concentración de extractos proteicos se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de albúmina

sérica bovina, y luego las muestras son interpoladas de dicha curva. La reacción se realiza por incubación de la muestra con 1mL de reactivo de Biuret durante 30 min (CuSO₄·5H₂O 1.5g, tartato de sodio y potasio 12.0g, NaOH 30g, H₂O hasta 1L), en un volumen final de 1.25mL. Luego se mide la absorbancia a 550nm.

3.9 Manejo informático de secuencias

Se utilizó el software *BioEdit* (Hall 1999) para el análisis de las secuencias, en cuanto a sitios de restricción, construcción de nuevas secuencias, alineamientos, etc.

3.9.1 Obtención de secuencias

Las secuencias de proteínas PUF excepto las correspondientes a *T. brucei* y *Leishmania major* fueron descargadas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Las restantes secuencias proteicas fueron descargadas de la base pública del TIGR (<http://www.tigr.org>) y del GeneDb (<http://www.genedb.org/>).

Las secuencias de nucleótidos fueron obtenidas del TIGR, del Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/>) y del GeneDb (<http://www.genedb.org/>).

3.9.2 Búsqueda en bases de datos

Las búsquedas en GenBank fueron realizadas por anotación y utilizando los programas *BLAST* y *PSI-BLAST* sobre la base de datos no redundante (nr database).

El programa *BLAST* fue también utilizado para buscar homólogos en la base del TIGR, del Sanger Institute y del GeneDb (<http://www.genedb.org/>).

3.9.3 Búsqueda de dominios conservados

Se utilizó la herramienta *ScanProsite* en el sitio ExPASy Proteomics Server (<http://au.expasy.org/tools/scanprosite/>) y herramienta Sequence Search en el sitio del PFam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

3.9.4 Visualización y edición de secuencias

Programa *BioEdit* (Hall 1999).

Paquete *EMBOSS* (Rice *et al.* 2000).

3.9.5 Alineamientos de secuencias

Los alineamientos de dos secuencias fueron realizados con una versión modificada del algoritmo de Smith y Waterman de alineamiento local (Programa *BioEdit*).

Los alineamientos múltiples se hicieron utilizando los siguientes programas según el caso: *ClustalW* (Thompson *et al.* 1994), *T_Coffee* (Notredame *et al.* 2000), *Dialign2* (Morgenstern 1999) (servidor <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dialign2-simple.html>).

3.9.6 Visualización de los alineamientos

Para visualizar y editar los alineamientos fueron utilizados los programas *GeneDoc* (Nicholas *et al.* 1997) y *BioEdit* (Hall 1999).

3.9.7 Análisis filogenéticos

Los análisis fueron realizados con el programa *MEGA4* (Kumar *et al.* 2004) por el método de Neighbor Joining (N-J).

Alternativamente, se utilizó el programa *MrBayes* (Ronquist *et al.* 2003). En el caso de análisis a partir de alineamientos de nucleótidos el mejor modelo fue estimado utilizando el programa *Findmodel* (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/findmodel/findmodel.html>).

Se utilizó el programa *Gblocks* para seleccionar las mejores regiones del alineamiento para analizar (Castresana 2000).

La visualización y edición de los árboles obtenidos fue realizada con los programas: *MEGA4* (Kumar *et al.* 2004), *TreeView* (Page 1996) y *TreeExplorer* (escrito por Koichiro Tamura y disponible en http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/TE_man.html).

3.9.8 Análisis de estructura secundaria

La estructura secundaria de las proteínas fue estimada utilizando el servidor de *PSI-PRED* (McGuffin *et al.* 2000)(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

3.10 Tratamiento estadístico de datos

Los gráficos y respectivos ajustes fueron realizados con el programa *Excel* de Microsoft Office y el programa *Origin* de OriginLab Corporation Versión 7.0.



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Caracterización Molecular de TcPuf6, una proteína Pumilio, de *Trypanosoma cruzi*

Dallagiovanna B, Pérez L, Sotelo-Silveira, J, **Smircich P.**,
Duhagon MA, Garat B.

Experimental Parasitology 109 (2005) 260-4

Cuando se comenzó a realizar este trabajo se contaba con la información de secuencia de la proteína TbPUF1 perteneciente a *Trypanosoma brucei*, siendo esta la única proteína de la familia PUF descrita en tripanosomátidos hasta ese momento (Hoek *et al.* 2002). Con esta información nos propusimos clonar y caracterizar la proteína homóloga en *T. cruzi*.

Por lo tanto, se buscó por homología de secuencia en las bases de datos de *T. cruzi*. En ese momento se encontraron tres secuencias con dominios Pumilio una de ellas contenía una secuencia codificante de alto porcentaje de similitud e identidad con TbPUF1. A partir de dicha secuencia se diseñaron cebadores específicos, con los cuales se logró amplificar la secuencia codificante homóloga a TbPUF1 en *T. cruzi*.

En el trabajo que se presenta a continuación se describe el clonado y caracterización de esta proteína.

Particularmente, en este artículo se presenta parte del análisis bioinformático de la región PUM-HD de dicha proteína que comentaremos en detalle más adelante (Ver sección 4.2 Análisis de la familia PUF en tripanosomátidos)

Durante el desarrollo de este trabajo, además de realizar el análisis bioinformático, colaboré en las diferentes etapas del clonado de la secuencia codificante, así como de su posterior expresión heteróloga en *E. coli*. La proteína recombinante resultó una herramienta utilizada no sólo en los estudios de interacciones con ácidos nucleicos por EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) sino también para generar anticuerpos específicos, que permitieron realizar los experimentos de localización subcelular y análisis de la expresión a lo largo del ciclo de vida.

Research brief

Trypanosoma cruzi: Molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein

Bruno Dallagiovanna^{a,b}, Leticia Pérez^a, José Sotelo-Silveira^{c,d}, Pablo Smircich^a,
María Ana Duhagon^a, Beatriz Garat^{a,*}

^a Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Instituto de Biología Molecular do Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil

^c Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Uruguay

^d Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda. Italia 3318 Montevideo, Uruguay

Received 9 November 2004; received in revised form 20 December 2004; accepted 4 January 2005

Abstract

In trypanosomes regulation of gene expression occurs mainly at the post-transcriptional level. Pumilio proteins are RNA-binding proteins that modulate gene expression in lower and higher eukaryotes. Here we present the characterization of TcPUF6, a member of the Pumilio family in *Trypanosoma cruzi*. TcPUF6 is expressed in the different life cycle forms of the parasite showing no clear stage specific regulation and it is localized to multiple discrete foci in the cytoplasm of epimastigotes. The recombinant TcPUF6 fusion protein specifically binds to the *Drosophila hunchback* NRE (*nanos* response element). TcPUF6 conserves functional properties that characterize the Pumilio family throughout evolution.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: GST, Glutathione-S-transferase; NRE, nanos response element; SL, spliced leader; UTR, untranslated region; WGS, whole genome shotgun

keywords: Kinetoplastida; *Trypanosoma cruzi*; Pumilio family; RNA-binding proteins; Post-transcriptional regulation

The kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of American trypanosomiasis or Chagas' disease (Chagas, 1909), which afflicts millions of people in Central and South America. During its life cycle, the parasite invades two different hosts (a reduviid insect and a mammal) displaying at least four distinct developmental stages: trypomastigotes, epimastigotes, metacyclic trypomastigotes, and intracellular amastigotes (Tyler and Engman, 2001). Gene expression in trypanosomes involves peculiar mechanisms such as polycistronic transcription, addition of a mini exon sequence by trans-splicing, and editing of mitochondrial transcripts. Unlike higher eukaryotic cells, regulation of gene expression is considered to occur mainly at post-transcriptional stages since individual genes belonging to a common polycistronic unit may show differential expression (Teixeira, 1998). Mechanisms regulating gene expression could involve mRNA modulation by differential processing of long polycistronic transcripts by trans-splicing and poly(A) tail addition, changes in mRNA stability (Clayton, 2002), and mRNA mobilization to poly-

somes (Avila et al., 2001). Sequence or structural elements present in the 3'UTR of some mRNAs have been shown to confer stage specificity (Nozaki and Cross, 1995) through the binding of protein factors (Coughlin et al., 2000; D'Orso et al., 2003).

Regulation at the level of mRNA translation is a major mechanism in the control of gene expression. Particularly, the products of *nanos* and *pumilio* genes in *Drosophila* are key components of translation repression of target mRNAs (Parisi and Lin, 2000). Pumilio was first described as a protein that represses translation of the *hunchback* transcript in a ternary complex with Nanos, contributing to the posterior patterning of the *Drosophila* embryo (Wharton and Struhl, 1991). In *Caenorhabditis elegans* the fem-3-binding factors (FBF) 1 and 2 regulate the sperm/oocyte switch and germ line stem cell maintenance (Zhang et al., 1997). Based on structural similarities, FBF and Pumilio were proposed as members of a family of sequence-specific RNA-binding proteins named Puf (for Pumilio and FBF) (Zamore et al., 1997). In *Drosophila*, Pumilio has an RNA-binding domain with eight imperfect repeats of ~36 amino acids (Edwards et al., 2001) that recognizes a pair of highly conserved 32 bp elements (5'-AUUAUUUUGUUGU CGAAAUGUUACAUAAGCC-3') known as the *nanos* response element (NRE) of the *hunchback* mRNA (Murata and Wharton,

* Corresponding author. Fax: +598 2 525 86 17.

E-mail address: bgarat@fcien.edu.uy (B. Garat).

1995; Wang et al., 2002). The Pumilio proteins modulate mRNA expression by enhancing turnover or repressing translation via interactions with other regulator proteins such as Nanos and Brain Tumor in *Drosophila* (Sonoda and Wharton, 1999), Nos3 in *C. elegans* (Kraemer et al., 1999) or DAZ-like proteins in human cells (Moore et al., 2003). The mechanism of action of these ternary complexes is not yet known.

In kinetoplastids a member of the Puf family, TbPUF1, has been described in *Trypanosoma brucei* being essential for cell viability. In addition, transfection assays suggest that its overexpression affects parasite virulence. TbPUF1 interacts with the ESAG8 putative regulatory protein and may control mRNA stability (Hoek et al., 2002).

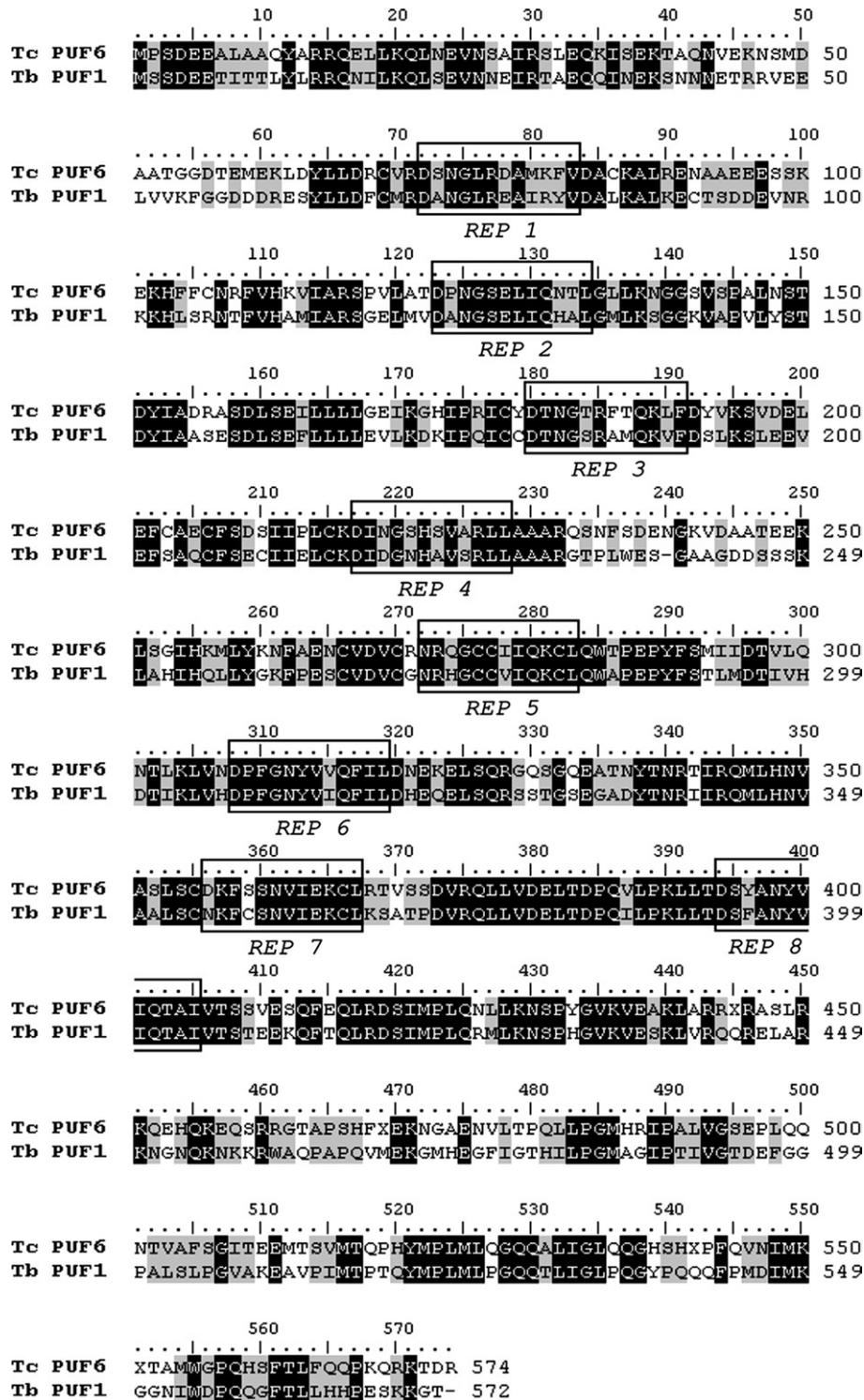


Fig. 1. Alignment of the Pumilio proteins from *T. cruzi* (TcPUF6) and the *T. brucei* orthologue (TbPUF1). Similarities (PAM250) are gray highlighted and identities are black shaded. Pumilio repeats are boxed.

The nucleotide sequence of the *tbpuf1* (Hoek et al., 2002) gene was used to screen the TIGR nucleotide database (WGS) of the *T. cruzi* genome project (www.tigr.org). An open reading frame of 1725 nucleotides coding for a 574 amino acid putative protein with an expected molecular mass of 64.5 kDa and a deduced isoelectric point of 6.52 was found. This protein has 53% identity and 68% similarity with TbPUF1 and was therefore identified as the *T. cruzi* homologue of the *T. brucei* protein (Fig. 1). Eight copies of the imperfect 36 amino acid Pumilio repeat are present in TcPUF6 (Fig. 1). The core Puf repeat consensus defined by Zhang et al. (1997) is based on 11 criteria involving the identity of eight amino acids and the presence of three delimited spacers (D-x-F/Y-G/A-x-x-V/I-V/I/L-Q-K-x-V/I/L). Three repeats conform to seven criteria (repeats 1, 3, and 4) while the other five conform to more than eight criteria (repeat 2, eight; repeats 5 and 7, nine; repeats 6 and 8, ten). The region upstream of the Puf domain is acidic (pI 4.5). Gln/Ala-rich and Ser-rich regions seen in most Puf proteins that are supposed to participate in the recognition of partners (White et al., 2001) were not detected. Alternative domains not yet identified could be responsible for such role. During the course of this work the nucleotide and amino acid sequences of this *T. cruzi* gene were deposited in the GenBank by Vázquez (see below) and identified as *tcpuf6* (GenBank Accession No. AAQ84135). TcPUF6 is a member of the Puf protein family of *T. cruzi*, which has at least nine members reported in the GenBank (Vazquez, M.P., Bercovich, N., Caro, F., Atorrasagasti, C., Levin, M., 2003, The Pumilio protein family in *Trypanosoma cruzi*. GenBank Accession Nos. AAQ84130–AAQ84138. Direct Submission; Andersson, B., Bontempi, E.J., 2001, GenBank Accession No. AAL82701. Direct Submission). The existence of several members of this protein family in *T. cruzi* suggests that they may have a broad range of action on gene expression regulation.

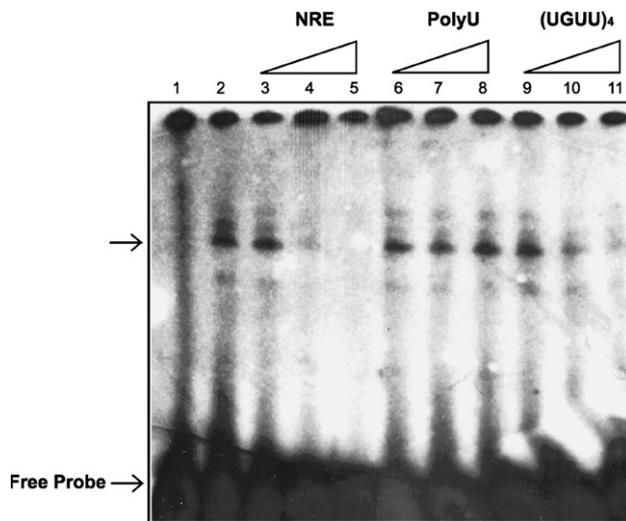


Fig. 2. Binding of the recombinant GST-TcPUF6 protein to the *hunchback* NRE. Binding reactions and EMSAs were performed as previously described (Duhagon et al., 2001) with 0.5 ng of the NRE (5'-AUUAAUUUUGUUGUCGAAAAUGUUACAUAAGCC-3') end-labeled with T4 polynucleotide kinase and [γ - 32 P]ATP (\approx 10,000 cpm), incubated at room temperature for 20 min and immediately loaded onto a 6% native polyacrylamide gel. (1) Binding reaction with 2 μ g of the recombinant GST protein was performed as a control. (2–11) Binding reaction with 2 μ g of the recombinant GST-TcPUF6. (3–5) The NRE; (6–8) poly(U)₁₅; (9–11) (UGUU)₄: (5'-UUGUUUGUUUGUUUGU-3') oligoribonucleotides were added to the binding reaction at room temperature for 10 min prior to the addition of the labeled probe in a 1-, 10- or 50-fold molar excess, respectively.

The coding region of TcPUF6 was amplified and cloned into two *Escherichia coli* expression vector: pQE30 and pGEX4T. Fusion proteins of 65 and 80 kDa, respectively, were observed after IPTG induction in bacterial protein extracts. The pQE30 derived protein (His-TcPUF6) completely partitioned to the insoluble fraction of the bacterial lysate. After treatment with 8 M urea, pH 8.0, and agarose–nickel chromatography, the protein was purified to near homogeneity and then used to produce a polyclonal antiserum (anti His-TcPUF6) in New Zealand White rabbits by three inoculations (200 μ g each time), at 2-week intervals. The serum was obtained 1 week after the last boost and purified onto DEAE Affi-Gel Blue Gel columns (Bio-Rad) following manufacturer's instructions. A small percentage of the pGEX4T derived protein (GST-TcPUF6) was recovered in the soluble fraction and was then used for electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

It has been reported that in vitro-binding activity of Puf proteins to the *Drosophila hunchback* NRE sequence is highly conserved among different species. Human, mouse, and *Xenopus* Pumilio proteins are able to recognize the *Drosophila hunchback* NRE (Nakahata et al., 2001; White et al., 2001; Zamore et al., 1997). In protozoans the *Plasmodium falciparum* PfPuf1 protein also binds the NRE both in vitro and in vivo (Cui et al., 2002). Mutational analysis of the *hunchback* NRE and analysis of the human Pumilio1 crystal structure showed that the UGU triplets present in the NRE core (UGUR) are essential for RNA binding of Pumilio proteins (Wang et al., 2002; Zamore et al., 1997). We wished to determine whether the TcPUF6 was also capable of forming specific complexes with the *Drosophila hunchback* NRE. EMSAs were done as previously reported (Duhagon et al., 2001) and showed that GST-TcPUF6 was able to form a complex with the NRE probe when 2 μ g of the protein was used. No mobility shift of the target probe was observed when GST alone was used as a control (Fig. 2). The specificity of this complex was tested with different competitors. While excess of the poly(U)₁₅ cold probe did not affect com-

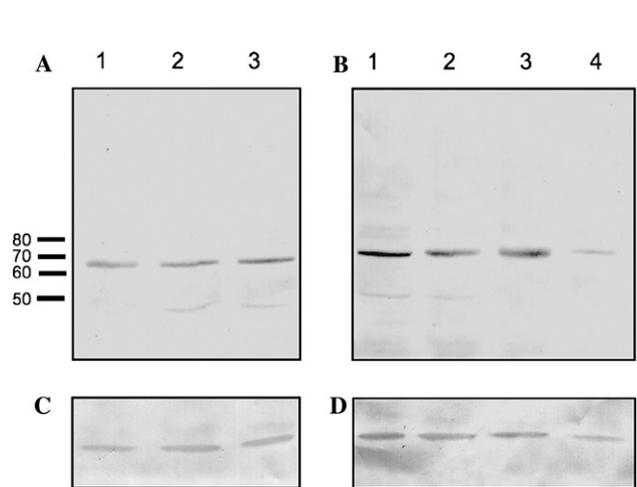


Fig. 3. Expression of the TcPUF6 protein during *T. cruzi* life cycle. Total protein extracts (40 μ g, \approx 10⁷ parasites) were separated by electrophoresis in 10% SDS–polyacrylamide gels and electro-transferred onto Hybond-C membranes (Amersham). Left panel—analysis of *T. cruzi* life cycle: 1, epimastigotes; 2, extracellular amastigotes; 3, metacyclic trypomastigotes. Right panel—analysis of *T. cruzi* metacyclogenesis: 1, epimastigotes; 2, nutritional stress epimastigotes; 3, 24 h adhered (differentiating) epimastigotes; 4, metacyclic trypomastigotes. (A and B) Western blot with anti His-TcPUF6 (1/500) obtained in New Zealand White rabbits after three consecutive immunization at 2-week intervals with 200 μ g of His-TcPUF6 and purified by DEAE Affi-Gel Blue Gel columns (Bio-Rad), (C and D) Western blot analysis using an anti-*T. cruzi* PEPCK antiserum (1/500) (Linss et al., 1993). The molecular weight marker (in kDa) is the Benchmark Protein Ladder (Gibco).

plex formation, the (UGUU)₄ probe was able to compete the binding though less efficiently than the cold NRE probe (Fig. 2). The probe conformation or additional elements flanking the UGUU sequence in the NRE probe may be responsible for this difference. Recently the presence of a conserved dinucleotide UA located downstream of the UGUR element has been recognized in the RNA targets for the

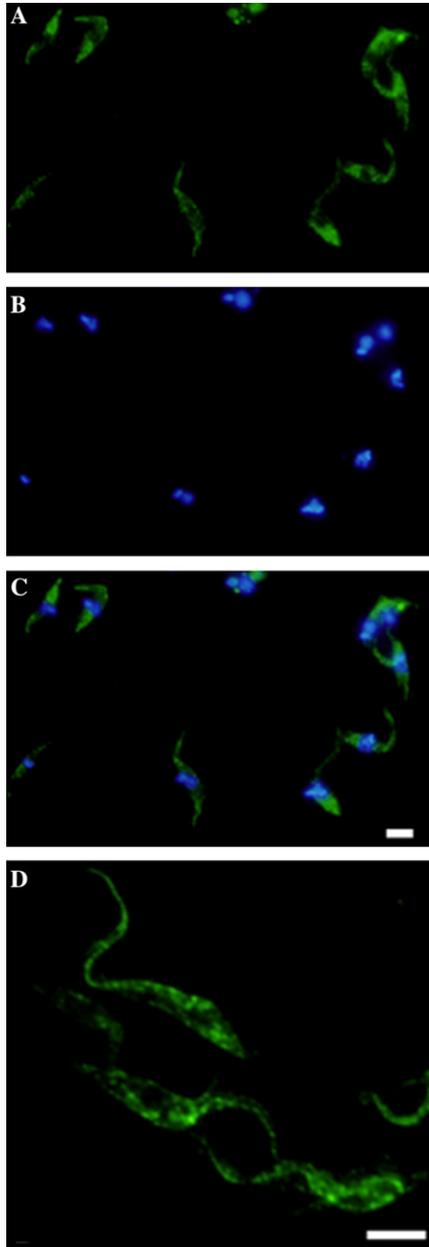


Fig. 4. Immunolocalization of TcPUF6 protein in *T. cruzi* epimastigote cells. Parasites were harvested from culture media, washed four times with PBS, and resuspended (5×10^6 cells/ml). The fixed cells were blocked with PBS–Tween BSA 1% 30 min. (A) Incubation with anti His-TcPUF6 (1/100) followed by Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H + L) (Molecular probes). (B) Nuclear localization by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (C) Merged figure. (D) Enlarged image of the indirect immunoanalysis. Bars correspond to $\approx 5 \mu\text{m}$. Images were resolved using an Olympus BX61 microscope equipped for epifluorescence and recorded with a CCD camera (Olympus DP70). Digital capturing of images was performed with Olympus Microsuite B35V 3.2 software.

Pumilio yeast proteins Puf3p, Puf4p, and Puf5p defining particular enlarged consensus elements (Gerber et al., 2004). Although in vitro NRE binding is a common feature of Pumilio proteins, the actual TcPuf6 target is to be identified.

The polyclonal antiserum was used to determine TcPUF6 expression by Western blot. A single band corresponding to a protein of the predicted molecular size (approximately 65 kDa) was observed in the different parasite life cycle forms (Fig. 3A). It has been suggested that maintenance of the mitotic state in the cell could be the ancient function of this protein family (Crittenden et al., 2003). Therefore, we analyzed the expression of TcPUF6 during the in vitro differentiation of replicative epimastigotes into non-replicative metacyclic trypomastigotes. The TcPUF6 protein was present throughout the metacyclogenesis process (Fig. 3B). For both experiments, a polyclonal serum against phospho-enol-pyruvate carboxykinase (PEPCK), which is expressed constitutively during differentiation (Linss et al., 1993), was used as a control of protein loading (Figs. 3C and D).

The polyclonal antiserum was used for immunofluorescence analysis in order to determine the cellular localization of the TcPUF6 protein in *T. cruzi* epimastigotes. The TcPUF6 protein was found predominantly localized in the cytoplasm of the parasite (Figs. 4A and C). No clear evidence was obtained to support nuclear localization (Figs. 4B and C). The cytoplasmic signal observed is not diffuse throughout the cytoplasm but rather appears to be concentrated in multiple discrete foci (Fig. 4D). This pattern is similar to the previously reported localization for the TbPUF1 homologue in *T. brucei* using a GFP fusion protein (Hoek et al., 2002) and for the homologous Puf protein family in *S. cerevisiae* (Gerber et al., 2004). In *S. cerevisiae*, each of the Puf proteins described are associated with distinct mRNA subpopulations that encode for proteins with common functions and subcellular localization, suggesting that Puf proteins could direct specific mRNAs to the cytoplasmic compartment where they will be translated (Gerber et al., 2004). Whether this could be one of the functions of TcPUF6 in *T. cruzi* parasites remains to be elucidated.

TcPUF6 conserves properties of nucleic acid binding and localization that characterize the Pumilio family throughout evolution. We are currently analyzing the mRNA population associated to TcPUF6 mRNP complexes by immunoprecipitation and microarray analysis in order to determine the actual targets of the protein.

Acknowledgments

We thank Dr. Marco Aurelio Krieger and Dr. Samuel Goldenberg for the metacyclic and amastigote protein extracts and for the anti PEPCK serum. We also thank Dr. N. Williams for helpful discussions and critical reading of the manuscript. This work was financially supported by Fondo Clemente Estable 7108 DINACYT (Uruguay) and FIRCA-NIH 1R03 TW05665-01. L.P. and M.A.D. PEDECIBA fellowships.

References

- Avila, A.R., Yamada-Ogatta, S.F., da Silva Monteiro, V., Krieger, M.A., Nakamura, C.V., de Souza, W., Goldenberg, S., 2001. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 117, 169–177.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanosomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiologico da nova entidade morbida do homen. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1, 159–219.
- Clayton, C.E., 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO Journal* 21, 1881–1888.

- Coughlin, B.C., Teixeira, S.M., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., 2000. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent *cis*-element and an untranslated region-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 275, 12051–12060.
- Crittenden, S.L., Eckmann, C.R., Wang, L., Bernstein, D.S., Wickens, M., Kimble, J., 2003. Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences* 358, 1359–1362.
- Cui, L., Fan, Q., Li, J., 2002. The malaria parasite *Plasmodium falciparum* encodes members of the Puf RNA-binding protein family with conserved RNA binding activity. *Nucleic Acids Research* 30, 4607–4617.
- D'Orso, I., De Gaudenzi, J.G., Frasch, A.C., 2003. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends in Parasitology* 19, 151–155.
- Duhagon, M.A., Dallagiovanna, B., Garat, B., 2001. Unusual features of poly[dT-dG][dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 98–103.
- Edwards, T.A., Pyle, S.E., Wharton, R.P., Aggarwal, A.K., 2001. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 105, 281–289.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., Brown, P.O., 2004. Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biology* 2, E79.
- Hoek, M., Zanders, T., Cross, G.A., 2002. *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 269–283.
- Kraemer, B., Crittenden, S., Gallegos, M., Moulder, G., Barstead, R., Kimble, J., Wickens, M., 1999. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 9, 1009–1018.
- Linss, J., Goldenberg, S., Urbina, J.A., Amzel, L.M., 1993. Cloning and characterization of the gene encoding ATP-dependent phospho-enol-pyruvate carboxykinase in *Trypanosoma cruzi*: Comparison of primary and predicted secondary structure with host GTP-dependent enzyme. *Gene* 136, 69–77.
- Moore, F.L., Jaruzelska, J., Fox, M.S., Urano, J., Firpo, M.T., Turek, P.J., Dorfman, D.M., Pera, R.A., 2003. Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100, 538–543.
- Murata, Y., Wharton, R.P., 1995. Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell* 80, 747–756.
- Nakahata, S., Katsu, Y., Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y., Yamashita, M., 2001. Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20945–20953.
- Nozaki, T., Cross, G.A., 1995. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75, 55–67.
- Parisi, M., Lin, H., 2000. Translational repression: A duet of Nanos and Pumilio. *Current Biology* 10, R81–R83.
- Sonoda, J., Wharton, R.P., 1999. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes and Development* 13, 2704–2712.
- Teixeira, S.M., 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31, 1503–1516.
- Tyler, K.M., Engman, D.M., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology* 31, 472–481.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P.D., Hall, T.M., 2002. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110, 501–512.
- Wharton, R.P., Struhl, G., 1991. RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell* 67, 955–967.
- White, E.K., Moore-Jarrett, T., Ruley, H.E., 2001. PUM2, a novel murine puf protein, and its consensus RNA-binding site. *Rna* 7, 1855–1866.
- Zamore, P.D., Williamson, J.R., Lehmann, R., 1997. The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *Rna* 3, 1421–1433.
- Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J., Wickens, M.P., 1997. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* 390, 477–484.

4.2 Análisis de la familia PUF en tripanosomátidos

Para realizar el análisis de los integrantes de la familia PUF en tripanosomátidos, se partió de las 9 proteínas de esta familia anotadas para *T. cruzi* en ese momento. Para confirmar que estas secuencias eran las únicas presentes en las bases de datos para este organismo, se realizaron búsquedas de homología con el algoritmo *psi-blast*, no encontrándose nuevos miembros de la familia secuenciados.

Luego de realizada esta comprobación se buscó por homología en la base de *T. brucei* del TIGR los homólogos de cada una de las proteínas de *T. cruzi*. Para comprobar el grado de homología entre las mismas se las alineó a pares. Con estos alineamientos se comprobó el alto grado de similitud entre las proteínas ortólogas de ambos parásitos (Figura 4.2.1).

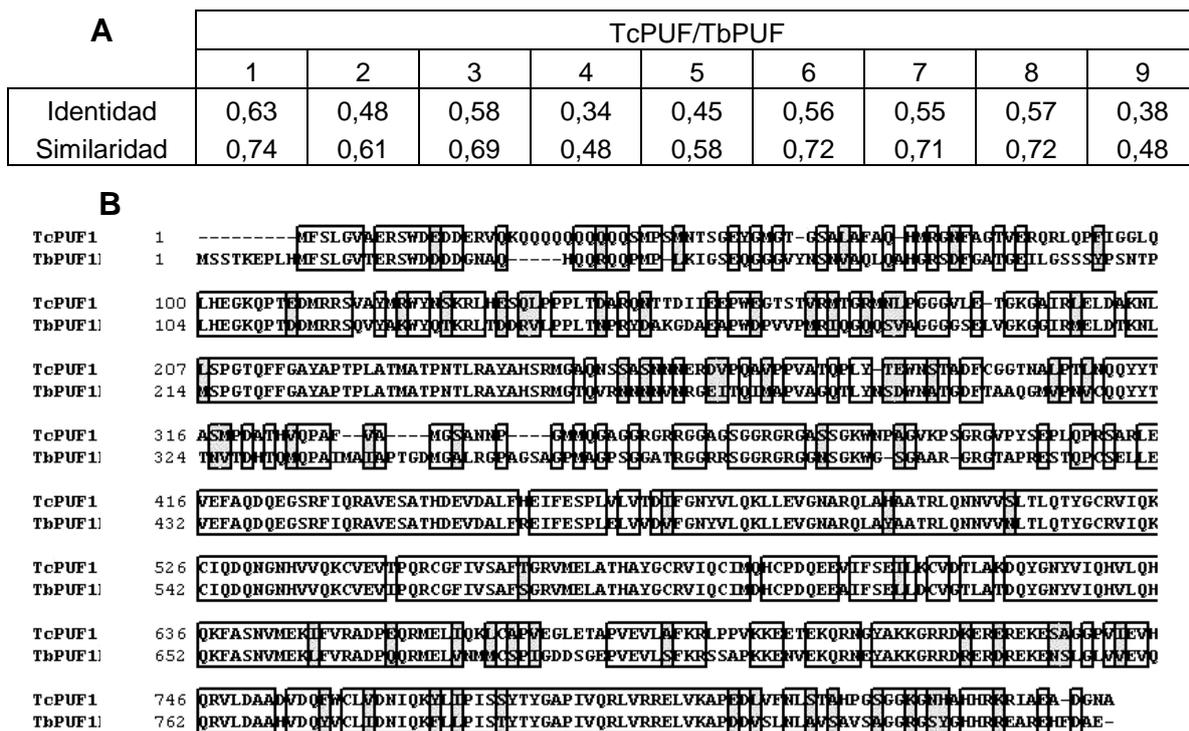


Figura 4.2.1 - Análisis comparativo de la Familia PUF en *T. cruzi* y *T. brucei*. **A** Porcentajes de similitud e identidad para los diferentes pares de ortólogos. **B** Alineamiento entre la proteína TcPUF1 y su ortólogo en *T. brucei*. Los aminoácidos idénticos se presentan encuadrados, mientras que los similares se muestran sombreados en gris. Para el sombreado se utilizó la matriz *blosum62*.

De manera similar a lo hecho para *T. cruzi*, se comprobó por *psi-blast* que los 9 homólogos encontrados por *blast* eran los únicos miembros de la familia PUF de *T. brucei* secuenciados hasta ese momento.

Para extender el análisis a otros tripanosomátidos se buscaron homólogos por *blastp* en la base del TIGR de *Leishmania major* encontrándose una única proteína similar a las anteriores en las bases disponibles en ese momento (el avance de los proyectos genoma permitió encontrar otros miembros de la familia, ver más adelante).

Se alinearon las secuencias completas de las 19 proteínas. El estudio de estos alineamientos mostró que los diferentes ortólogos presentaban grados significativos de homología únicamente en la región del dominio PUM-HD y por lo tanto se definieron estos dominios para continuar el análisis. Para esto se utilizó la búsqueda de dominios conservados en el ExPASSy-Prosite. La siguiente figura muestra en forma gráfica la ubicación del dominio Pumilio en las proteínas de tripanosomátidos así como la ubicación de las regiones de cada uno de los repetidos (Figura 4.2.2). Cabe señalar el perfil similar de los distintos ortólogos, como era de esperarse dada la similitud de secuencia entre ellos. Además podemos observar que la proteína de *L. major* tiene un perfil similar a TcPUF3. Por último, vemos que el dominio PUM-HD se encuentra mayormente en la región C terminal de las proteínas como es característico.

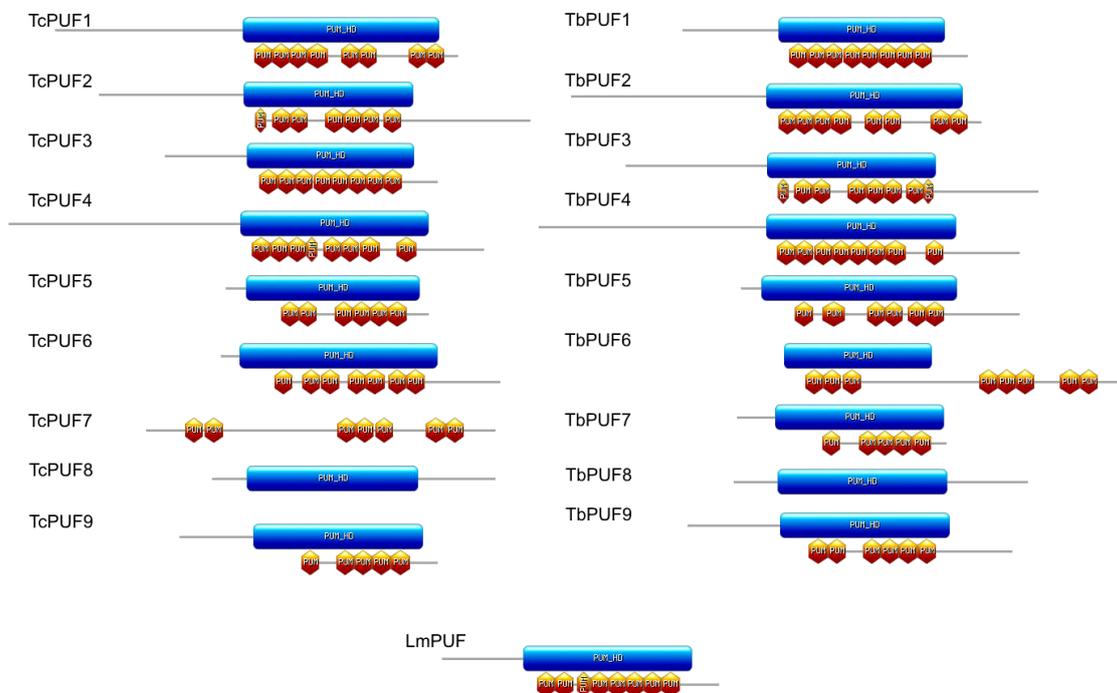


Figura 4.2.2 - Búsqueda de dominios conservados en las proteínas PUF. En la figura se observan las diferentes secuencias y la ubicación de las regiones homologas al dominio PUM-HD (en azul) y a los repetidos PUM (en naranja) de la base de datos. El tamaño de los gráficos no es proporcional al tamaño de las proteínas.

El alineamiento de estos dominios y la definición de regiones de alta conservación permitieron realizar una reconstrucción filogenética por el método de Neighbor-Joining (Figura 4.2.4).

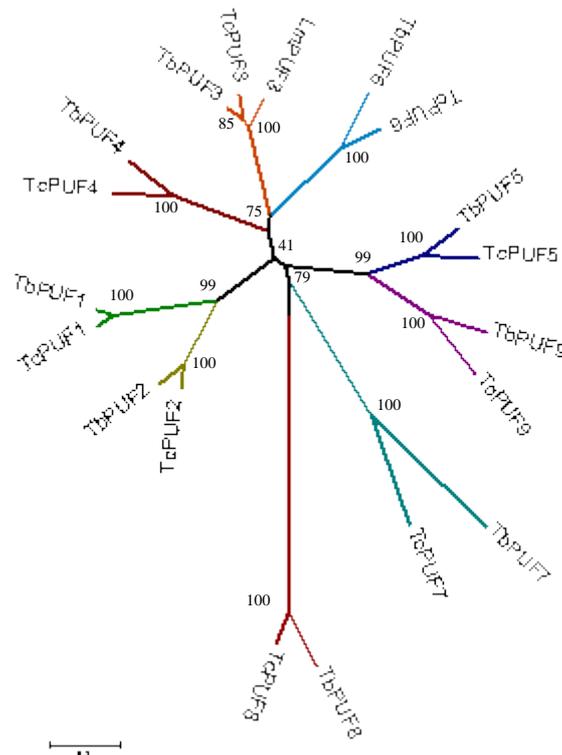


Figura 4.2.4 - Reconstrucción filogenética utilizando los dominios PUM-HD de las 19 proteínas PUF estudiadas.

En la reconstrucción podemos observar que las proteínas ortólogas son más similares entre sí, estando los parálogos más alejados filogenéticamente. Otra observación interesante es la divergencia de TcPUM7 y TcPUM8 con respecto al resto. También vemos que la proteína encontrada para *L. major* es el ortólogo de Tc PUM3 y TbPUM3.

Como una aproximación para tratar de inferir la función de los miembros de esta familia y dado que se ha caracterizado la funcionalidad varias de las proteínas PUF en *S. cerevisiae* (Gerber *et al.* 2004; Gu *et al.* 2004; Garcia-Rodriguez *et al.* 2007; Hook *et al.* 2007; Stewart *et al.* 2007; Ulbricht *et al.* 2008), las proteínas PUF de los tripanosomátidos fueron comparadas con las proteínas de levadura. En el momento de realizar esta comprobación se contaba con mayor información acerca del genoma de *Leishmania* siendo posible incluir en el análisis los demás miembros de la familia en este organismo. En general las secuencias resultaron muy divergentes entre los tripanosomátidos y el organismo modelo, y por lo tanto no fue posible asignar

posibles funciones a las proteínas de PUF de tripanosomátidos (Figura 4.2.5). La proteína Scpuf3 parece presentar mayor homología con TcPUF1 y 2, las implicancias funcionales de esta observación deben ser aclaradas por un estudio a nivel experimental.

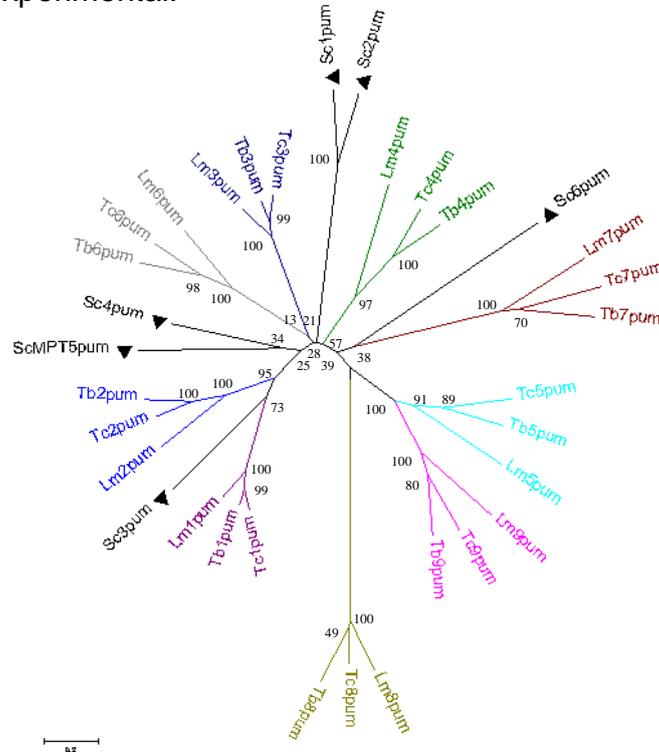


Figura 4.2.5 - Reconstrucción filogenética de las proteínas PUF de tripanosomátidos y levadura estudiadas basadas en el análisis de los dominios PUM-HD (xpum representa el dominio PUM-HD de la proteína PUFx). Los grupos de ortólogos de tripanosomátidos se encuentran deferencialmente coloreados mientras que los miembros de *S. cerevisiae* se encuentran señalados con un triángulo negro.

Dado que las reglas de reconocimiento de las proteínas de la familia con su ARN blanco se conocen bien, nos propusimos estudiar la región de interacción de la proteína TcPUF6 para intentar aproximarnos a la secuencia de los blancos en el ARN que esta proteína pudiese tener.

Para esto se analizaron los aminoácidos en las posiciones 12, 13 y 16 de la región *core* de los repetidos PUM (ver página 20) según los dominios definidos previamente. Estos aminoácidos son los que interactúan directamente con las bases nitrogenadas del blanco en el ARN y por lo tanto son los principales responsables de la especificidad de reconocimiento. La tabla muestra los aminoácidos presentes en estas posiciones claves y la base en el ARN que reconocería cada repetido de acuerdo con las reglas de reconocimiento establecidas previamente (Wang *et al.* 2002; Cheong *et al.* 2006; Gupta *et al.* 2008; Miller *et al.* 2008)(Tabla 4.2.1).

Repetido	Posición 12	Posición 13	Posición 16	Base reconocida
1	L	R	M	-
2	S	E	Q	A
3	T	R	Q	-
4	S	H	A	-
5	C	C	Q	-
6	N	Y	Q	U
7	S	N	E	G
8	N	Y	Q	U

Tabla 4.2.1 - Predicción de los nucleótidos a ser reconocidos por TcPUF6. Con un guión se señalan los casos en que no se puede deducir la base que participaría en la interacción.

Este análisis permitió establecer que TcPUF6 posee en los repetidos 6, 7 y 8 los aminoácidos que interaccionan directamente con la secuencia UGU característica de las señales blanco de la mayor parte de las proteínas de la familia PUF descritas. Por otra parte, es posible que el repetido 2 sea capaz de reconocer adenina. Debido a la alta frecuencia de este patrón de bases simplemente debido al azar, no fue posible la identificación de posibles blancos con esta metodología.

Los resultados obtenidos *in silico* apoyan los resultados experimentales sobre la interacción de TcPuf6 con el elemento NRE de *Drosophila* mostrado en el capítulo anterior, pero no permiten realizar una búsqueda de posibles blancos en el genoma de *T. cruzi*.

Cabe señalar que luego de la finalización de esta parte del trabajo, se publicó un reporte por el grupo de Vázquez en el cual realizan el estudio de la familia en *T. cruzi*. Con las nuevas bases de datos genómicas los autores identifican 10 proteínas PUF en el parásito y realizan un análisis similar al comentado anteriormente. Los resultados obtenidos reproducen nuestros resultados satisfactoriamente (Caro *et al.* 2006). Por otra parte, es importante señalar que de haberse contado con las bases de datos completas la estrategia aquí planteada hubiese sido capaz de identificar las 10 proteínas que se describen en ese trabajo, como se pudo comprobar una vez que el genoma completo de los tripanosomátidos se hizo de acceso público.

4.3 Caracterización Genómico Funcional de los ARNm asociados a TcPUF6, una proteína Pumilio de *Trypanosoma cruzi*

Dallagiovanna B, Correa A, Probst C, Holetz F, **Smircich P.**,
Melo de Aguiar A, Mansur F, Vieira da Silva C, Mortara RA, Garat B.
Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA

Journal Of Biological Chemistry 283 (2007) 8266-73

El objetivo de este trabajo fue continuar con la caracterización molecular de TcPUF6 y comenzar a aproximarnos a la función particular de esta proteína en *T. cruzi*.

Dentro de los objetivos específicos se buscaron los blancos en el ARN de la proteína TcPUF6. Esto fue realizado por estudios de ribonómica que permiten un análisis del problema a nivel global. En una de las aproximaciones más usadas, una proteína de fusión a *tags* se expresa en el organismo homólogo para luego purificar en columnas de afinidad los complejos que esta proteína formó *in vivo* con sus blancos.

Esta metodología es una modificación de la técnica descrita por Rigaut y colaboradores, en la cual los autores buscan la identificación de compañeros proteicos de la proteína en estudio (Rigaut *et al.* 1999). El sistema, denominado purificación por afinidad en tandem (TAP) consiste en la unión de la proteína problema a dos *tags* para luego preparar extractos y purificar los complejos mediante dos cromatografías de afinidad consecutivas. En síntesis, los complejos son purificados en una primera instancia por afinidad a una columna de Ig-G (que une la proteína A del *tag*), para luego ser eluidos mediante el tratamiento con una proteasa específica (proteasa TEV) que separa el complejo del primer *tag* y por lo tanto de la columna. Este eluido es luego purificado una segunda vez mediante la unión del segundo *tag* (péptido de unión a la calmodulina) a una columna de calmodulina (Figura 4.3.1). Este método permite el análisis de una variedad de proteínas utilizando el mismo protocolo básico ya que la purificación depende de los *tags* y no de la proteína en particular.

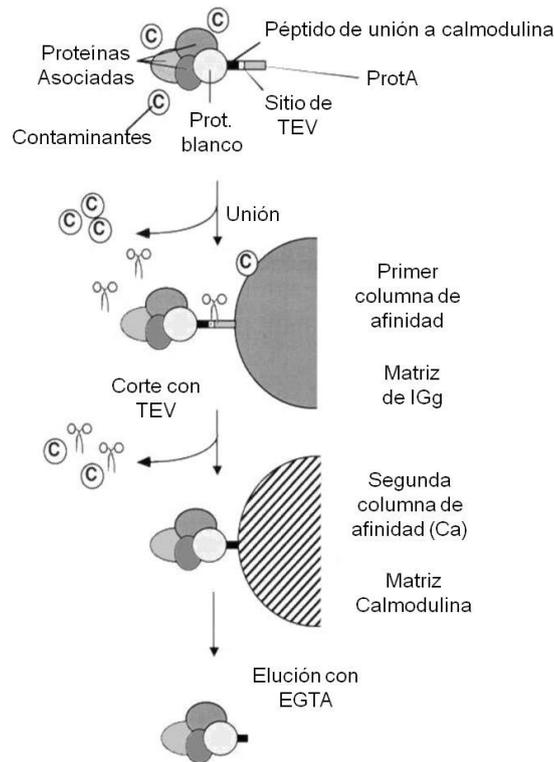


Figura 4.3.1 - Representación esquemática del procedimiento de purificación de complejos proteicos mediante TAP-tag. Extraído y modificado de (Puig *et al.* 2001).

En particular, en los ensayos de ribonómica se realiza únicamente la primer ronda de purificación de los complejos, uniendo los extractos a la columna de IgG sepharosa. Luego del marcado, los ARN purificados de esta forma se hibridan en microarreglos de ADN para su identificación (Gerber *et al.* 2004; Gerber *et al.* 2006) (Figura 4.3.2).

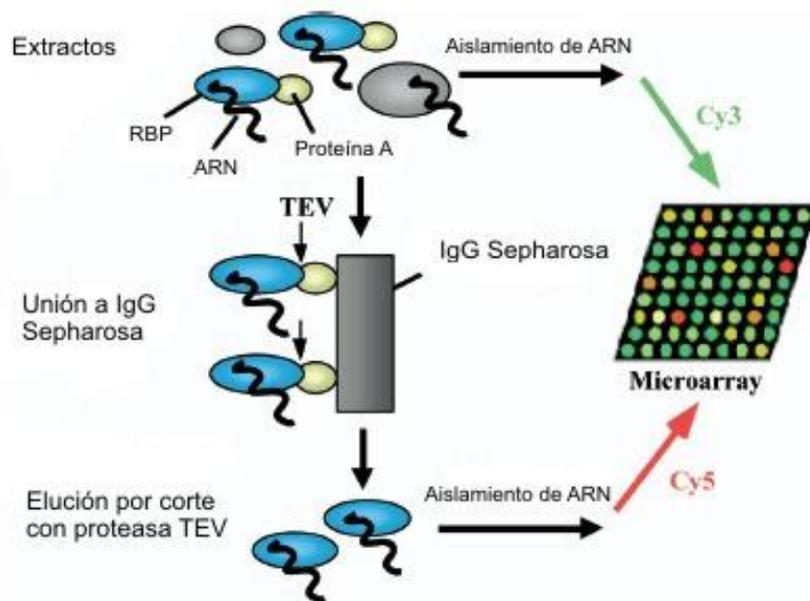


Figura 4.3.2 - Esquema de la estrategia de purificación e identificación de blancos de ARN de la proteína de unión a ARN (RBP) en estudio. Extraído y modificado de (Gerber *et al.* 2004).

Para realizar la metodología descrita anteriormente, se clonó la secuencia codificante de TcPUF6 en un vector que permite la expresión de la proteína en estudio fusionada al *tag* de afinidad (Rigaut *et al.* 1999).

Elegimos usar un derivado del plásmido pTEX, desarrollado para la expresión de proteínas en *T. cruzi* (Kelly *et al.* 1992). La secuencia de este vector posee las regiones intergénicas de los genes que codifican la GAPDH de *T. cruzi*. Estas regiones dirigen el procesamiento, y por lo tanto permiten la expresión, de los genes clonados en el sitio de clonado múltiple así como del gen de resistencia al antibiótico G418. La sobre expresión de las proteínas codificadas en este vector es relativamente baja, facilitando la purificación de los complejos a la vez que se minimizan los posibles falsos positivos o localizaciones no fisiológicas de la proteína de fusión, efectos que si podrían ser causados por plásmidos de mayor número de copia y cantidad de expresión. El vector modificado con el agregado del *cassette* que codifica para el *tag* de afinidad fue construido y cedido por el Dr. Esteban Serra (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Instituto de Biología Molecular y Celular, Dto Microbiología, Universidad Nacional de Rosario) (Figura 4.3.3).

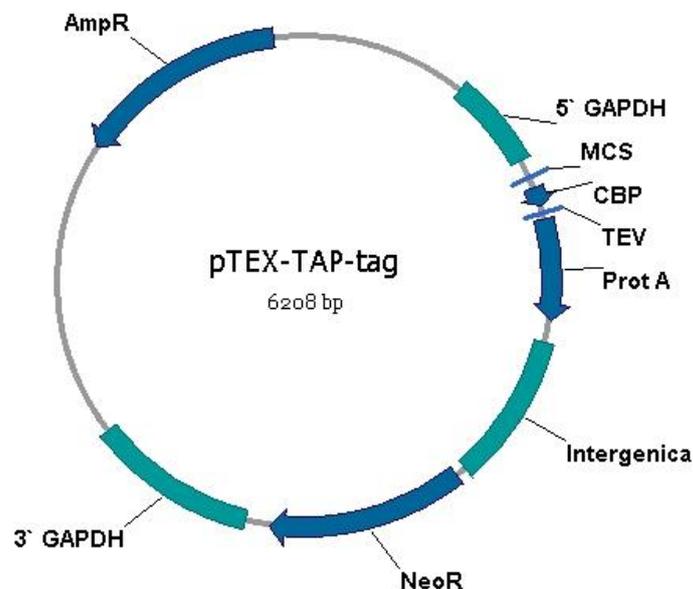


Figura 4.3.3 - Esquema del vector pTEX-TAP-tag. CBP: Péptido de unión a la calmodulina. TEV: Sitio de corte para la TEV proteasa. Prot A: Secuencia codificante de la proteína A. NeoR: Resistencia a G418. AmpR: Resistencia a ampicilina. MCS: Sitio de clonado múltiple. 5' GAPDH, Intergénica, 3' GAPDH: Regiones UTRs e intergénicas de los genes *gapdh* I y II utilizadas para la construcción del vector.

La participación particular en este artículo consistió en primer lugar en el clonado de la proteína TcPUF6 en el vector pTEX-TAP-*tag*, la posterior transfección del vector generado en epimastigotas y la selección de transfectantes. El clonado de la secuencia codificante de TcPUF6 fue realizado amplificando la región codificante de esta proteína a partir de ADN genómico de *T. cruzi* con cebadores que agregan a la secuencia codificante sitios para las enzimas de restricción SpeI y HindIII. La ligación con los sitios compatibles en el sitio de clonado múltiple (MCS) del vector dejan esta secuencia en fase con el *tag* de afinidad. Los clones obtenidos de la reacción de ligación fueron analizados en una primera instancia por el patrón de digestión con enzimas de restricción, para luego ser confirmada la secuencia de los clones positivos por secuenciación automática. Este vector al que denominamos pT-PUF6-*tap* fue transfectado en epimastigotas de *T. cruzi* según protocolos establecidos. Una vez seleccionados los parásitos transfectantes se verificó la expresión de la proteína de fusión por ensayos de *western blot* utilizando el anticuerpo policlonal anti-TcPUF6. En el ensayo de *western blot* observamos que en el extracto de epimastigotas salvajes obtenemos una banda de aproximadamente 64 kDa que corresponde con la proteína TcPUF6. En los parásitos transfectantes obtenemos además una banda de un peso molecular de aproximadamente 90 kDa correspondiente a la proteína TcPUF6 fusionada al *tag* de afinidad.

Finalmente, utilizando estos parásitos transfectantes se implementó la técnica de purificación por TAP-*tag* según los protocolos recomendados, tanto para la purificación de ARNs (ver artículo a continuación) como de complejos proteicos (ver sección 4.4 “Búsqueda de los compañeros proteicos de TcPuf6”). Estos ensayos permitieron la identificación de blancos a nivel de ARN de TcPUF6 así como la identificación de factores proteicos que involucran a la proteína Dhh1.

Functional Genomic Characterization of mRNAs Associated with TcPUF6, a Pumilio-like Protein from *Trypanosoma cruzi*^{*S}

Received for publication, April 12, 2007, and in revised form, December 4, 2007. Published, JBC Papers in Press, December 4, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703097200

Bruno Dallagiovanna^{‡S}, Alejandro Correa[‡], Christian M. Probst^{‡S}, Fabiola Holetz[‡], Pablo Smircich[¶],
Alessandra Melo de Aguiar^{‡S}, Fernanda Mansur[‡], Claudio Vieira da Silva^{||}, Renato A. Mortara^{||}, Beatriz Garat[¶],
Gregory A. Buck^{**}, Samuel Goldenberg^{‡S}, and Marco A. Krieger^{‡S1}

From the [‡]Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010 PR, Brazil, the ^SFundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-900 RJ, Brazil, the [¶]Laboratório de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay, the ^{||}Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Botucatu 862-8a, UNIFESP, São Paulo 04023-062 SP, Brazil, and the ^{**}Center for the Study of Biological Complexity, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23284

Trypanosoma cruzi is the protozoan parasite that causes Chagas disease or American trypanosomiasis. Kinetoplastid parasites could be considered as model organisms for studying factors involved in posttranscriptional regulation because they control gene expression almost exclusively at this level. The PUF (Pumilio/FBF1) protein family regulates mRNA stability and translation in eukaryotes, and several members have been identified in trypanosomatids. We used a ribonomic approach to identify the putative target mRNAs associated with TcPUF6, a member of the *T. cruzi* PUF family. TcPUF6 is expressed in discrete sites in the cytoplasm at various stages of the parasite life cycle and is not associated with the translation machinery. The overexpression of a tandem affinity purification-tagged TcPUF6 protein allowed the identification of associated mRNAs by affinity purification assays and microarray hybridization yielding nine putative target mRNAs. Whole expression analysis of transfected parasites showed that the mRNAs associated with TcPUF6 were down-regulated in populations overexpressing TcPUF6. The association of TcPUF6 with the TcDhh1 helicase *in vivo* and the cellular co-localization of these proteins in epimastigote forms suggest that TcPUF6 promotes degradation of its associated mRNAs through interaction with RNA degradation complexes. Analysis of the mRNA levels of the putative TcPUF6-regulated genes during the parasite life cycle showed that their transcripts were up-regulated in metacyclic trypomastigotes. In these infective forms no co-localization between TcPUF6 and TcDhh1 was observed. Our results suggest that TcPUF6 regulates the half-lives of its associated transcripts via differential association with mRNA degradation complexes throughout its life cycle.

The kinetoplastid parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease or American trypanosomiasis, which affects several million people in South and Central America. During its life cycle, *T. cruzi* invades two different hosts: a reduviid insect and a mammal. The parasite has at least four distinct and well defined developmental stages: replicative epimastigotes, the infective metacyclic and cellular trypomastigotes, and replicative intracellular amastigotes (1). The developmental forms differ in terms of the environment they inhabit, metabolic activity, and ability to invade different host cells. Consequently, tight regulation of gene expression is required to allow the rapid adaptation essential for parasite survival. Gene expression in trypanosomes differs from that of higher eukaryotes and involves unusual mechanisms, such as polycistronic transcription, the editing of mitochondrial transcripts, and the addition of a 5' mini exon sequence by *trans*-splicing and of the 3' poly(A) tail to mRNA in a coupled reaction. No canonical RNA polymerase II promoter has yet been identified, and there is no clear evidence of transcriptional regulation for protein coding genes (2). Because the individual genes present in a given polycistronic unit may show different temporal expression patterns, the regulation of gene expression in trypanosomes is thought to be posttranscriptional (2, 3).

In eukaryotes, posttranscriptional regulation mechanisms allow rapid and efficient responses to environmental changes and physiological conditions. Detailed characterization of the regulatory processes involved and of the various components of the posttranscriptional machinery is needed. However, such studies have been hampered by the need to separate the effects of posttranscriptional control from the mechanisms regulating transcription initiation. Trypanosomatids, which lack transcriptional regulation, provide an excellent noise-free model for studying the posttranscriptional control of gene expression, the gene regulatory networks controlled at this level, and the macromolecular machineries involved. Posttranscriptional regulation involves specific interactions between regulatory *trans*-acting factors and conserved *cis*-elements present in the 5'- and 3'-untranslated regions (UTR)² of the transcripts (4). RNA-binding proteins bind to sequence-specific and/or struc-

* This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Núcleos de Excelência (Fundação Araucária), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PROSUL), and National Institutes of Health Grant 5R01AI050196-02. This work was also supported by CNPq research fellowships (to B. D., A. C., C. M. P., M. P. M., S. G., and M. A. K.) and a Programa de Estudio y Desarrollo de Ciencias Básicas fellowship and an AMSUD/Pasteur training fellowship (to P. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^S The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables S1 and S2 and supplemental Figs. S1–S4.

¹ To whom correspondence should be addressed: Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010 PR, Brazil. Tel.: 5541-3316-3232; Fax: 5541-3316-3267; E-mail: mkrieger@tecpa.br.

² The abbreviations used are: UTR, untranslated region; TAP, tandem affinity purification; PEPCCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase.

tural elements in the UTR regions of functionally related mRNAs, modulating their expression (5, 6). RNA-binding proteins can be classified into different families according to their structural features. The PUF (Pumilio/FBF1) family of post-transcriptional regulators is widespread among eukaryotes and has been the focus of intense studies in recent years. PUF proteins are defined by the presence of a Pumilio domain consisting of eight imperfect repeats and carboxyl- and amino-terminally flanking regions. Each repeat folds into three α -helices, which face the internal side of a rainbow-shaped structure. RNA binds to the α -helices present on the concave surface of the protein, this RNA recognition system being highly modular (7). The recognition motif has been identified for *Drosophila*, yeast, *Caenorhabditis elegans*, mouse, and human PUF proteins. Most PUF family proteins bind sequences containing an UGUR core motif, with the flanking sequences controlling the target specificity of each PUF protein (7–9). PUF proteins regulate mRNA stability and translation by enhancing the deadenylation and subsequent degradation of mRNAs or repressing translation initiation (8, 10). Interactions between the yeast PUF protein Mpt5p (or PUF5) and deadenylating complexes have recently been described, and such interactions are conserved throughout evolution in eukaryotes (11). Mpt5p interacts directly with the Pop2p nuclease, which is part of the Ccr4p-Pop2p-Not deadenylase complex. This protein bridges the interaction with the Dhh1 helicase, which is also involved in mRNA storage and degradation (12). Affinity tag purification and microarray analysis have shown that each PUF protein binds and regulates a functionally and cytotopically related subpopulation of mRNAs in yeast (9).

Several conserved PUF proteins have been identified in the genomes of kinetoplastida. In *T. cruzi*, the PUF protein family has 10 members. Based on *in silico* analysis, they can be assigned to three groups according to putative binding specificity (13). We have previously described and characterized TcPUF6, a member of this family (14). TcPUF6 is an ortholog of the *Trypanosoma brucei* protein TbPUF1 (15). *T. cruzi* PUF6 protein is produced constitutively, throughout the life of the parasite. The protein is present in the cytoplasm of the replicative epimastigote forms in multiple discrete foci, a characteristic pattern also observed for members of the yeast PUF family (9) and other trypanosome PUF proteins (13, 15). We used a ribonomic approach (16, 17) to identify the putative target mRNAs associated with TcPUF6. The overexpression of a TAP-tagged TcPUF6 protein did not affect growth rate or morphology. Microarray analysis of affinity-purified transcripts and whole expression of the transfected parasites showed that mRNAs associated with TcPUF6 were down-regulated in parasites overexpressing TcPUF6. We assessed the *in vivo* association of TcPUF6 with the TcDhh1 helicase by immunoprecipitation, TAP-Tag assays, and immunofluorescence co-localization assays.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Parasites—*T. cruzi* clone Dm28c (18) was used throughout this work. Epimastigote forms were maintained at 28 °C in liver infusion tryptose medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Metacyclic trypomastigotes and

Functional Genomics of TcPUF6-associated mRNAs

extracellular amastigotes were prepared as described by Contreras *et al.* (19, 20).

Immunofluorescence and Imaging—Immunofluorescence assays were performed as previously described by Holetz *et al.* (21). Serum dilutions were: rabbit anti-TcPUF6 1:50 and mouse anti-TcDhh1 1:20. Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse and Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (1:400) (Molecular Probes, Invitrogen) were used. The cells were stained with 4',6'-diamino-2-phenylindole (1:2000; Sigma). Subcellular localization images were acquired using a Nikon Eclipse E600 microscope coupled to a Cool SANP-PRO color camera (Media Cybernetics). The merged images were obtained by superimposing image files in the Image-PRO PLUS software V6.2 (Media Cybernetics).

Sucrose Density Gradient Separation and Polysome Analysis—*T. cruzi* polysomes were purified and separated on sucrose gradients, using a modified version of the method described by Brecht and Parsons (22). Exponentially growing cultures of 5×10^8 epimastigotes were lysed in buffer A (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% Nonidet P-40, and 2 M sucrose) and centrifuged at $16,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. The supernatant (400 μ l) was layered onto 15 to 55% sucrose density gradients prepared in buffer B plus inhibitors (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 μ g/ml cycloheximide, 10 μ M E-64, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml heparin) and centrifuged at 4 °C for 2 h at 39,000 rpm in a Beckman SW40 rotor. As a control, the cells were preincubated with 2 mM of Puromycin for 1 h at 28 °C before being lysed. Gradients were fractionated using an ISCO Foxy Jr. collection system with pump speed set to 1 ml/min, a fraction time of 30 s/fraction, and a chart speed of 60 cm/h. For Western blot analysis, 30- μ l aliquots of the indicated fractions were boiled for 5 min with SDS-PAGE loading buffer.

RNA Preparations—Total RNA was extracted from 5×10^8 exponentially growing epimastigote forms, using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Linearly amplified RNA was generated from 1 μ g of total RNA (single round), using the MessageAmp amplified RNA kit (Ambion) according to the manufacturer's manual. cDNA was synthesized from 1 μ g of total or affinity-purified RNAs using an oligo(dT) primer (US Biochemical Corp.) and reverse transcriptase (IMPROM II, Promega) as recommended.

Microarray Hybridization and Analysis—Fluorescent cyanin (Cy) dyes Cy3 or Cy5, as appropriate were incorporated into the second strand of the cDNA, using 2 μ g of amplified RNA as the starting material for each sample. The labeled cDNA was purified with a Microcom 30 device (Millipore). Microarray hybridizations and washes were carried out in a GeneTac automated hybridization station (Genomic Solutions). The Cy3- and Cy5-labeled cDNAs were mixed and added to 120 μ l of hybridization solution and allowed to hybridize for 14–16 h at 42 °C. The microarray slides were then washed in buffers of increasing stringency (0.5 \times and 0.05 \times SSC) and dried by centrifugation at $280 \times g$ for 5 min. The dried slides were scanned in a 428 Array Scanner (Affymetrix). The images were analyzed with Spot software. The resulting data were corrected for background and normalized, using the normexp and PrintTip-Loess methods, respectively, within the Limma package (24). Microarray

results were confirmed by quantitative PCR, as previously described (25). Two-step real time reverse transcription-PCR assays were carried out with an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems).

Tandem Affinity Purification and Immunoprecipitation Assays—For TAP-Tag assays, the coding sequence of the *TcPUF6* gene inserted into a pTEXTAPTAG vector³ encoding the amino acid sequences of the IgG-binding domain of *Staphylococcus aureus* protein A and the human calmodulin-binding peptide as a double tag (26). *T. cruzi* epimastigotes (5×10^7) were transfected with 50 μg of vector DNA by electroporation in 4-mm cuvettes, using the Bio-Rad GenePulser II electroporator, with two pulses of 450 V and 500 millifarads. We added 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin 24 h after electroporation, for the selection of transfected parasites. After 72 h, the cultures were diluted 1:4, and the concentration of geneticin was increased to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Transfectants were cloned by serial dilution in 24-well plates and cultured in the presence of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of geneticin. TAP-Tag assays of bound proteins and RNAs were performed as previously described (9, 17). The soluble cytosolic fraction was prepared from 10^{10} exponentially growing epimastigote forms at a final concentration of $10^9/\text{ml}$ of polysome lysis buffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, pH 7.0, and 1% Nonidet P-40). The parasites were lysed for 1 h at 4 °C (17). Lysed parasites were centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the supernatants were immediately used in affinity purification assays. The tagged proteins were purified on IgG-Sepharose columns (Amersham Biosciences). They were washed three times and treated with 200 units/ml of TEV protease (Invitrogen), as previously described (26). Eluted RNAs were purified using the RNeasy mini kit (Qiagen) and amplified using the cRNA amplification kit (Ambion), following the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation assays were performed as previously described (17). Antiserum against TcPUF6 or TcDhh1 (50 μl) was incubated with 100 μl of protein A-Sepharose or protein G-agarose beads (Sigma), respectively, overnight at 4 °C. The beads were blocked by incubation in 5% skim milk powder in phosphate-buffered saline. The soluble cytosolic fraction was prepared from 10^9 exponentially growing epimastigote forms. Conjugated beads were incubated for 1 h at room temperature in the presence of the soluble protein fraction. Bound proteins were washed three times with ten column volumes of polysome lysis buffer and eluted with one volume of 0.2 M glycine, pH 2.3. For RNA immunoprecipitation assays 50 μl of anti-TcPUF6 and preimmune serum were used as previously described. Eluted RNAs were purified using the RNeasy mini kit (Qiagen) concentrated on microcon devices and immediately converted to cDNA as described. Similar volumes of the resulting cDNAs were subjected to PCR amplification. PCR conditions were as follows: 95 °C for 1 min, followed by 26 cycles of 58 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min for all the genes studied. Primer sets are listed in supplemental Table S2.

Western Blot Analysis—Protein extracts from epimastigotes in the exponential growth phase were prepared and separated

by SDS-PAGE in 10% acrylamide gels, electrotransferred onto Hybond-C membranes (Amersham Biosciences), and incubated with the different polyclonal sera as previously described (14). Bound antibodies were detected using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Sigma) diluted 1/7.500. For relative protein quantification, band densitometry was performed with One DScan E X 3.1 software (Scanalytic), using wild-type TcPUF6 protein levels as a reference. Before each microarray hybridization or affinity purification assay, Western blots were performed to confirm the overexpression of the tagged protein.

Quantitative PCR—Two-step real time reverse transcription-PCR assays were performed using the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) as previously described (25). In brief, amplifications were carried out in triplicate with 10 ng of cDNA and the recommended concentration of SYBR green master mix (Applied Biosystems). Primer sets are listed in supplemental Table S2. PCR conditions were as follows: 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s for all genes studied or 45 cycles of 95 °C for 15 s and 70 °C for 1 min for control genes. Thermal dissociation confirmed that reverse transcription-PCR generated a single amplicon. For relative quantification, the standard curve method was used, based on cycle threshold values. 1:5 dilutions of known concentrations of cDNA were used to generate curves extending from 80 pg to 50 ng of cDNA. A standard curve was generated for each of the genes studied and both control genes. Gene expression was normalized against *TcL9* or *TcH2B* control genes (25). The results are expressed as fold changes of gene expression in metacyclic trypomastigotes using epimastigotes as the reference population.

RESULTS

Cellular Localization of TcPUF6 in the Different Stage Forms—We have previously shown that TcPUF6 is present in multiple discrete foci in the cytoplasm of the replicative epimastigote forms. However, given the differences between the developmental stages of *T. cruzi*, we conceived that TcPUF6 might be distributed differently in nonreplicative, infective metacyclic trypomastigotes and in replicative intracellular amastigote forms. We used a previously described polyclonal TcPUF6 antiserum (14) to determine the distribution of the protein in cells. In both cellular forms, TcPUF6 was localized in discrete cytoplasmic foci (supplemental Fig. S1).

TcPUF6 Is Localized in Ribosome-free Regions of the Cytoplasm—It has been suggested that PUF proteins bind to functionally related mRNAs and localize them in specific cytoplasmic regions. We analyzed the possible association of TcPUF6 with polysomes. Exponentially growing epimastigotes were treated with cycloheximide to trap the mRNAs on the elongating ribosomes. Polysome profiles were obtained from sucrose gradients loaded with the soluble cytoplasmic fractions in three independent assays (Fig. 1a). As a control, the polysome-enriched fraction was treated with EDTA or puromycin prior centrifugation to dissociate the ribosomal subunits from the mRNAs (not shown). Western blot analysis of the different fractions showed that TcPUF6 co-sedimented with the ribo-

³ E. Serra, unpublished observations.

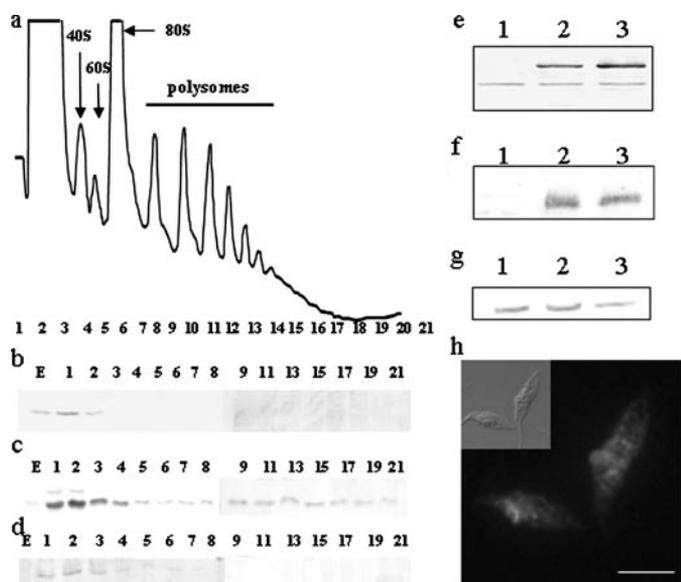


FIGURE 1. TcPUF6 is present in the ribosome-free fractions of sucrose gradients. *a*, the positions of the 40 and 60 S subunits, the 80 S ribosome monomer, and polysomes are indicated in the sucrose density gradient. *b–d*, Western blots of the collected fractions (30 μ l) probed with anti-TcPUF6 (1/500) (*b*), anti-TcTif34 (1/500) (*c*), and anti-PEPCK (1/250) sera (*d*). Transfected parasites overexpress a TcPUF6-tagged protein. *e*, Western blot analysis of protein extracts from epimastigotes (lane 1), epimastigotes transfected with the pTEX-TAPTAG-transfected clones (lane 2), and the PUF6 A- and (4) B-transfected clones (lane 3), with antiserum against TcPUF6 protein (1/500 dilution). *f*, protein extracts were also tested with an anti-CBP serum (1/1000) (Upstate). *g*, the same blot was re-probed with an anti-PEPCK serum (1/500). *h*, immunolocalization of *T. cruzi* TcPUF6 in TcPUF6-TAPTAG-transfected epimastigote forms with anti-CBP antiserum (1/100). Bars, 5 μ m.

some-free fractions in all three experiments (collected fractions 1–3). No signal was detected with polysomes or monosomes (Fig. 1*b*). An antiserum against *T. cruzi* eIF3 translation initiation factor subunit Tif34 was used as a control of a polysome associated protein.⁴ A signal corresponding to the TcTif34 protein was found in fractions along the entire gradient in all of the experiments (Fig. 1*c*). As negative control, an anti-PEPCK serum was tested, and the corresponding signal was found up to fractions 6–9 depending on the assay analyzed (Fig. 1*d*). Furthermore, we used confocal microscopy to perform co-localization assays with the anti-TcPUF6 serum and a commercial antiserum against human ribosomal P-proteins (Immunovision). Our results showed that TcPUF6 was not present in the ribosome-rich regions of the cytoplasm (supplemental Fig. S2*g*). We also investigated possible associations between TcPUF6 and actively translating ribosomes. Co-localization assays were performed with two different antisera raised against two subunits, Tif34 and Ptr1, of *T. cruzi* eIF3. No clear co-localization was observed with either the Ptr1 subunit (supplemental Fig. S2*h*) or the Tif34 subunit (not shown). Thus, TcPUF6 is present in the cytoplasm and is not associated with ribosomes or polysomes.

Overexpression of a TAP-tagged TcPUF6 Protein Does Not Affect Differentiation Phenotype—A TAP-tagged TcPUF6 protein was overexpressed in epimastigote forms to identify the mRNAs associated with TcPUF6 and to obtain additional information about protein function. We used the pTEX vector,

which is maintained as a low copy number episomal DNA with discrete overexpression (27), to facilitate the purification of mRNA complexes without affecting the cellular distribution of the protein. Two clonal populations derived from independent transfection assays were selected. These populations, PUF6A and PUF6B, overexpressed a protein of about 90 kDa in size resulting from the fusion of TcPUF6 with the 30-kDa tag. The level of overexpression was analyzed by Western blotting, using different concentrations of total protein extract, with *in silico* quantification by peptide densitometry, using the wild-type protein as a reference. The fusion protein was overexpressed by factors of three and five in the PUF6 A and B populations, respectively (Fig. 1*e*). Immunofluorescence microscopy was performed with both the anti-TcPUF6 and an anti-tag serum and showed that the characteristic cellular distribution of TcPUF6 was maintained in the transfected parasites (Fig. 1*h*). Parasites overexpressing the TcPUF6-tagged protein showed no significant change in cell growth rate or morphology; parasites transfected with the pTEX-TAPTAG vector were used as the reference population. The ability of the TcPUF6-overexpressing parasites to differentiate was also analyzed *in vitro*, and no significant difference in differentiation rates following metacyclogenesis and amastigogenesis *in vitro* were observed (not shown).

Microarray Analysis of TcPUF6-overexpressing Parasites—We investigated the phenotypic changes caused by TcPUF6 at the molecular level, using DNA microarray hybridization to study the steady-state mRNA levels of parasites transfected with vector alone and epimastigotes overexpressing TcPUF6. A *T. cruzi* cDNA microarray containing ~6,200 independent probes was analyzed by competitive hybridization, using an amplified cRNA derived from the total RNA of both populations (supplemental Figs. S3 and S4). TcPUF6 overexpression had a considerable effect on global gene expression. We simplified the analysis by considering only genes showing changes in mRNA levels by at least a factor of three. Overall, 269 genes fulfilled this condition, corresponding to about 4% of the sequences present in the microarray. From these genes, 232 were up-regulated in the TcPUF6 transfectants, whereas 37 were clearly down-regulated (supplemental Table S1). The TcPUF6 transcript itself increased in abundance by a factor of 4.5, consistent with Western blotting data (Fig. 1*e*). The genes selected were identified as putative RNA-binding proteins (9), proteases (11), protein kinases (18), transporters (13), and 48 enzymes involved in central metabolism. However, about 50% of the sequences analyzed were classified as hypothetical proteins (122 sequences) (supplemental Table S1). An analysis of the biological process potentially affected by changes in TcPUF6 levels showed that the up-regulated probes included genes encoding proteins involved in DNA metabolism, stress responses, cytoskeleton and mitochondrial proteins, and several surface antigens. An analysis of the down-regulated genes showed that they included one encoding a putative cyclin and six genes encoding proteins involved in RNA processing, including the TcPUF7 protein. However, most of the down-regulated genes were identified as hypothetical proteins. These results were corroborated by quantitative PCR.

⁴ S. P. Fragoso, personal communication.

TABLE 1

Putative TcPUF6 targets identified by affinity purification assays are down-regulated in the transfected parasites and up-regulated in the metacyclic forms

GeneID TSK ^a	Gene annotation	Immunoprecipitation assays ^b	Fold change in transfectants ^c	Fold change in metacyclics ^d
Tc00.1047053508039.70	Hypothetical protein	+,+,-	-4.9	0.34 ± 0.02
Tc00.1047053506753.110	Hypothetical protein (cytochrome b5-like)	-,,-,-	-3.5	ND ^e
Tc00.1047053504013.110	Serine/threonine-protein phosphatase 2A	+,+,+	-3.6	8.67 ± 1.02
Tc00.1047053511523.20	Hypothetical protein	+,+,-	-3.6	6.57 ± 0.53
Tc00.1047053507641.80	XRND1 exonuclease	+,+,-	-4.0	4.23 ± 0.35
Tc00.1047053509179.50	Hypothetical protein	+,+,-	-3.4	70.3 ± 6.48
AAS47054	PAT6 amino acid transporter	+,+,+	-3.0	1.54 ± 0.14
Tc00.1047053511215.119	69 kDa paraflagellar rod protein putative	+,+,+	-8.4	7.81 ± 0.68
EH035829	Hypothetical protein	ND	-4.7	ND

^a Gene code from *Trypanosoma cruzi* Sequencing Consortium (when this is not available, the GenBank™ sequence ID is provided instead).

^b Presence (+) or absence (-) of the affinity purified transcripts in the three independent immunoprecipitation assays.

^c Fold change value of decreased expression determined by microarray analysis.

^d Fold change value of transcript expression levels in metacyclic trypomastigotes compared with epimastigote forms by quantitative PCR assays.

^e ND, not determined.

Identification of Putative TcPUF6 Target mRNAs—Ribonucleoprotein complexes formed by mRNAs, and the tagged TcPUF6 protein were purified from soluble protein lysates prepared from transfected exponentially growing epimastigote forms by affinity chromatography on IgG-Sepharose columns, as previously described (9). RNA was purified from the eluted fractions and amplified; the resulting cRNA was labeled and hybridized to the *T. cruzi* cDNA microarray. Parasites transfected with vector alone were used as a control in affinity purification experiments; however, the levels of RNA obtained were almost undetectable, even after amplification (not shown). Total epimastigote RNA was used as a control in microarray competitive hybridization analyses to eliminate nonspecific hybridization signals with the most abundant mRNAs. Eight independent affinity purifications were performed, only three of which generated enough RNA for microarray hybridization, including dye swap controls.

Nine probes were selected based on increased signals obtained in at least two of three experiments (Table 1). Five corresponded to genes encoding hypothetical proteins. The others corresponded to a serine-threonine phosphorilase, the XRND1 exonuclease, a putative amino acid transporter (PAT6), and the 69-kDa PFR2 (paraflagellar rod protein 2). A detailed analysis of the hypothetical proteins showed that two had predicted transmembrane domains and one had a signal peptide. One of the proteins with transmembrane domains presented some similarity to the cytochrome B5 protein.

Alternatively, to confirm the TAP-Tag results, the ribonucleoprotein complexes were purified by immunoprecipitation assays using soluble lysates prepared from wild-type epimastigote forms. The anti-TcPUF6 serum was used in the immunoprecipitation experiments (Fig. 2a) using preimmune serum as a negative control (Fig. 2b). The presence of the previously identified mRNAs in the eluted complexes was detected by reverse transcription-PCR. We obtained positive results for seven of the eight sequences tested in at least two of three independent assays confirming the TAP-Tag results. Only the mRNA corresponding to the cytochrome B5-like gene was not detected in any of the experiments.

PUF proteins bind conserved elements present in the 3'-UTR of mRNAs. In most proteins characterized to date, the consensus sequence bears a core motif with the UGUR

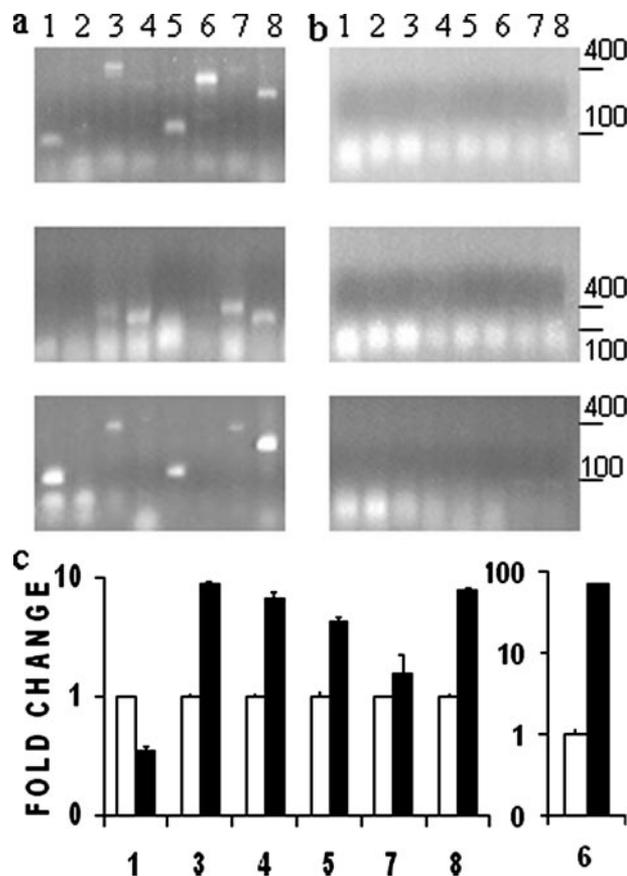


FIGURE 2. Tag affinity-purified transcripts are also present in anti-TcPUF6 immunoprecipitation elutes. Reverse transcription-PCR analysis of eluted fractions from three independent Immunoprecipitation assays using anti-TcPUF6 sera (a) or preimmune serum as a control (b). PCR products were resolved in 1.2% agarose gels. c, TcPUF6 associated mRNAs are preferentially expressed in metacyclic trypomastigotes. Total RNA from epimastigotes (white bars) and metacyclic trypomastigotes (black bars) was analyzed. Metacyclic trypomastigotes gene expression results are expressed in terms of fold change in relation to epimastigotes gene expression. The results were normalized against those for the L9 ribosomal protein. Standard deviations for triplicate experiments are shown. The numbers correspond to: Tc00.1047053508039.70 (bar 1), cytochrome b5-like (bar 2), Ser/Thr phosphatase 2A (bar 3), Tc00.1047053511523.20 (bar 4), XRND1 (bar 5), Tc00.1047053509179.50 (bar 6), PAT6 (bar 7), and 69-kDa PFR2 (bar 8).

sequence. As a first approach to characterize the TcPUF6 target sequence, the MEME algorithm (28) was used to search for the presence of the UGUR motif in the 3'-UTR of seven selected

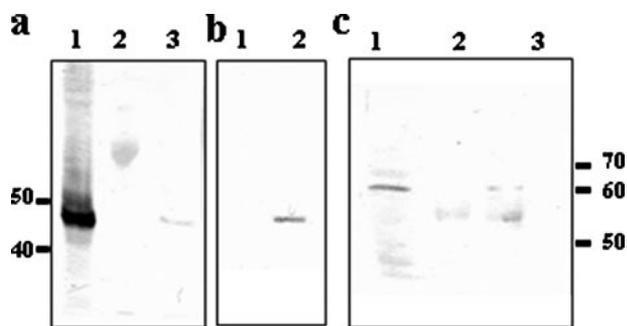


FIGURE 3. TcPUF6 is part of a complex bearing the TcDhh1 helicase. *a*, Western blot using anti-TcDhh1 antibody (1/250) of total protein input (*lane 1*) and eluates immunoprecipitated with preimmune (*lane 2*) and anti-TcPUF6 antisera (*lane 3*). *b*, Western blots with anti-TcDhh1 antibody of TAG affinity-purified proteins from vector-transfected parasites (*lane 1*) and TcPUF6-tagged expressing parasites (*lane 2*). *c*, Western blot using anti-TcPUF6 antibody (1/500) of total protein input (*lane 1*), and eluates immunoprecipitated using preimmune (*lane 2*) and anti-TcDhh1 antibody (*lane 3*).

genes annotated in the *T. cruzi* GeneDB. Because we have no information about the 3'-UTR of the mRNAs studied, we analyzed 200 nucleotides downstream from the stop codon as the putative UTR of these genes. At least one UGUR sequence was found, though no clear motif could be determined *in silico* (not shown).

Transcripts Associated with TcPUF6 Are Down-regulated in Transfected Parasites—It can be inferred that in the case of transcripts bound and regulated by TcPUF6, its overexpression should affect their expression levels in a coordinated manner. Analysis of the microarray data showed significantly lower mRNA levels in the transfected parasites than in control parasites for all of the selected genes (Table 1). Microarray results were confirmed by quantitative PCR using total RNA prepared from control and TcPUF6-transfected parasites. The quantitative PCR assays confirmed the microarray data for all the selected genes, although differences in expression levels were smaller (not shown). Thus, overexpression of TcPUF6 results in down-regulation of the transcript levels of its putative mRNA targets.

TcPUF6 and TcDhh1 Are Present in the Same Ribonucleoprotein Complexes—Our results strongly suggest that TcPUF6 promotes the degradation of target mRNAs, consistent with an interaction between this protein and RNA-degrading complexes. We have recently developed a mouse polyclonal antiserum against a recombinant *T. cruzi* Dhh1 helicase ortholog (21). This antiserum was used to investigate the interaction of TcPUF6 and TcDhh1 by immunoprecipitation assays followed by Western blotting with rabbit anti-TcPUF6 and mouse anti-TcDhh1 sera. The anti-TcPUF6 serum bound to protein A-Sepharose was used in immunoprecipitation assays with soluble protein extracts of epimastigote forms. Western blots of the eluted proteins with the mouse anti-TcDhh1 serum showed the presence of a 50-kDa band corresponding to TcDhh1 in three independent experiments (Fig. 3*a*). The preimmune serum bound to protein A-Sepharose was used as a negative control. These results were confirmed by carrying out TAP-Tag affinity purification with soluble protein extracts from the transfected epimastigote forms and from parasites transfected with vector alone as a control. Tandem affinity-purified frac-

Functional Genomics of TcPUF6-associated mRNAs

tions gave no signal corresponding to TcDhh1 in Western blots. No protein band was detected on the silver-stained SDS-PAGE gel of the eluted fractions (not shown). We attempted only one purification protocol, consisting of the use of IgG-Sepharose columns followed by TEV protease treatment. In this case, a clear band corresponding to the 50-kDa protein TcDhh1 was observed in Western blots of the eluted fractions (Fig. 3*b*).

Immunoprecipitation assays were also performed using the mouse anti-TcDhh1 serum bound to protein G-agarose beads. Western blotting for TcPUF6 revealed the presence of a faint 65-kDa band corresponding to the protein in the eluted fractions (Fig. 3*c*). The various purification assays were carried out in at least three independent assays, and similar results were obtained in each case.

TcPUF6-associated mRNAs Are Up-regulated in the Infective Metacyclic Trypomastigotes—Microarray analysis of gene expression during the parasite life cycle showed that some of the transcripts associated with TcPUF6 were preferentially expressed in metacyclic forms.⁵ Because no clear functional relationship could be established for the previously identified transcripts, we considered the possibility that TcPUF6 could be regulating their temporal expression. Quantitative PCR analysis was performed to determine the levels of mRNA expression of these genes in epimastigotes and metacyclic trypomastigote forms. Total RNA was used in the assays, and the results showed that six of the seven genes have their transcript levels up-regulated in the infective metacyclic forms when compared with epimastigote forms. The results were normalized with respect to expression of the ribosomal L9 gene (Fig. 2*c* and Table 1) and the histone H2B gene (not shown) rendering similar results.

TcPUF6 and TcDhh1 Do Not Co-localize in Metacyclic Trypomastigotes—We have previously showed that mRNAs associated with TcPUF6 are negatively regulated in the transfected parasites. Interaction with TcDhh1 suggests that TcPUF6 enhances degradation of its molecular targets through association with mRNA degradation complexes. However, *in vivo* these mRNAs are up-regulated in the metacyclic forms where TcPUF6 is also expressed. This could be the result of differential localization of the regulated mRNAs in the infective forms. We performed co-localization experiments between TcPUF6 and TcDhh1 both in epimastigotes and metacyclic trypomastigotes. In epimastigotes all of the signal corresponding to TcDhh1 co-localizes with TcPUF6 (Fig. 4*c*), whereas part of the foci where TcPUF6 is detected remain as an independent signal. When metacyclic trypomastigotes were analyzed, TcDhh1 signal was overall clearly decreased in comparison with epimastigotes, and no co-localization between the two proteins was observed (Fig. 4*g*).

DISCUSSION

In this work, we used a ribonomic approach to characterize the biological role of TcPUF6 and its molecular targets. It is now accepted that discrete subpopulations of mRNAs are bound to RNA-binding proteins and have their expression co-regulated by these proteins through their function as posttranscriptional

⁵ M. A. Krieger, manuscript in preparation.

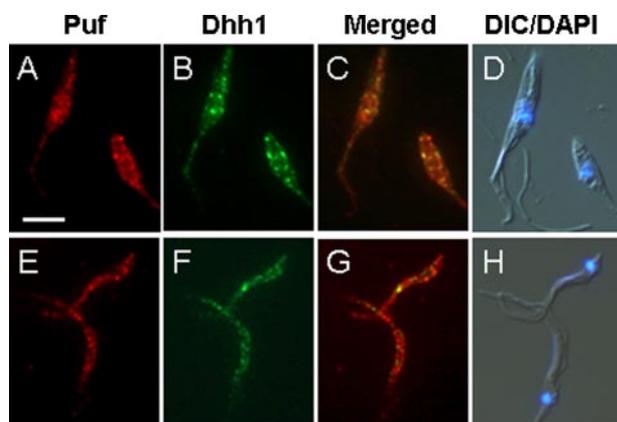


FIGURE 4. TcPUF6 and TcDhh1 show different co-localization patterns during the parasite life cycle. Localization of TcPUF6 (A and E) and TcDhh1 (B and F) in *T. cruzi* epimastigotes (A–D) and metacyclic trypomastigotes (E–H) is shown. C and G show superimposed TcPUF6 and TcDhh1 images. D and H show 4',6'-diamino-2-phenylindole images merged with differential interference contrast images. Scale bar, 5 μ m.

inducers or repressors of functionally related genes. Functionally related mRNAs are regulated in ribonucleoprotein complexes and degraded or stored for subsequent translation in defined cytoplasmic regions, defining what has been termed “posttranscriptional operons” (16).

We characterized the putative mRNA targets of TcPUF6, using a strategy combining the analysis of overall gene expression in the transfected parasites and TAP-Tag affinity purification of the TcPUF6-associated mRNAs. Microarray analyses of total RNA from the transfected parasites indicated that the mRNA levels of several genes are affected by TcPUF6 overexpression. Some of the affected genes encode RNA-binding proteins, various kinases, and proteases, pointing to the existence of complex and interconnected posttranscriptional and post-translational regulatory networks in *T. cruzi*. Changes in TcPUF6 protein level might therefore disturb different gene regulation cascades, although this does not necessarily imply that these mRNAs are targets of the protein.

TAP-Tag affinity purification assays and microarray hybridization were carried out to identify the molecular targets of TcPUF6. Despite the use of a genome-wide analysis, we were able to identify only a few target mRNAs reliably. Recent work on *T. brucei* did not lead to identification of the putative targets of the TcPUF6 ortholog, TbPUF1 (29). This may be due to the technical limitations of affinity purification assays. Consistent with this hypothesis, only small amounts of RNA were recovered in the affinity purification assays, making it necessary to carry out RNA amplification to obtain enough RNA for microarray experiments. The affinity-purified transcripts were down-regulated in TcPUF6-overexpressing parasites. This strongly suggests that TcPUF6 enhances the degradation of its associated mRNAs, as described for other PUF proteins in eukaryotes (30, 31). In this work, we overexpressed a tagged TcPUF6 protein to facilitate purification of the associated transcripts. However, this procedure may have affected purification efficiency, because overexpression of the tagged TcPUF6 protein may have reduced levels of the target mRNAs.

Caro *et al.* (13) classified the *T. cruzi* PUF family as a function of putative sequence targets. TcPUF6 was grouped with pro-

teins capable of binding the conserved UGUR motif. We identified the UGUR motif in the putative 3'-UTR sequences of most of the purified transcripts. However, detailed binding assays are required to determine the specific target sequence in the UTRs of all the associated mRNAs. One of the identified transcripts corresponds to the PFR2 protein. In *Leishmania mexicana*, Mishra *et al.* (32) identified a 10-nucleotide negative regulator element present in the long 3'-UTR of the PFR2 mRNA. The paraflagellar rod protein regulator element bears an UGUR motif and acts by destabilizing the PFR2 mRNA in amastigotes.

It has been suggested that PUF proteins regulate the half-lives of associated mRNAs by interacting with proteins involved in mRNA degradation via a mechanism that is conserved throughout eukaryote evolution (11). We observed the interaction and co-localization between TcPUF6 and the decapping activator TcDhh1, supporting the notion that TcPUF6 might target mRNAs for degradation. TcDhh1-containing P body-like structures have been described in *T. cruzi*, and the number of such complexes per cell has been determined (21). The number of foci in which TcPUF6 is detected exceeds the estimated number of TcDhh1 foci/cell, suggesting that TcPUF6 is part of RNP complexes other than P-body-like structures. In yeast, PUF proteins do not localize with P-bodies, and it has been suggested that its association with these structures may be transient (11). The mammalian Pumilio2 protein has been localized in neurons and described as a novel member of dendrite stress granules, another macromolecular structure involved in mRNA degradation, being excluded from P-bodies under all conditions tested (33). The interaction of TcPUF6 with TcDhh1 may reflect differences in structure and function of *T. cruzi* P-body-like structures compared with higher eukaryotes. Recently, the formation of mRNA granules as a response to nutritional stress has been reported in *T. cruzi*. These RNA granules seem to be involved in the stabilization and storage of mRNAs, and they only partially co-localize with TcDhh1 (34). Our results suggest that the localization of TcPUF6 to specific loci in the cytoplasm and the interaction of this protein with TcDhh1 may be related to its putative involvement in RNA degradation mechanisms more than with mRNA storage mechanisms.

Conditional knock-out and interference assays have shown that the *T. brucei* ortholog, TbPUF1, is not essential for parasite survival (15, 29). It therefore seems that, rather than regulating in an “all-or-nothing” manner, TcPUF6 may control the fate of the associated transcripts so as to maintain the required levels of target mRNA expression. TcPUF6 is expressed throughout the parasite life cycle, and our results suggest that it is involved in mRNA degradation; however, analysis of the expression patterns of its associated mRNAs showed that they are up-regulated in the metacyclic forms. PUF proteins usually exert their control functions by interacting with other protein partners in combinatorial regulatory mechanisms (23, 35). Immunofluorescence assays showed that TcPUF6 and TcDhh1 do not co-localize in the infective metacyclic forms, hence suggesting the absence of interaction in these forms. Our results suggest that TcPUF6 might also play a role in the regulation of metacyclic trypomastigote transcripts. We propose a model in which

TcPUF6 regulates the half-lives of its associated transcripts by its stage-dependent association with TcDhh1 containing complexes involved in mRNA degradation. The characterization of mRNA subsets and proteins interacting with TcPUF6 in parasites of different developmental stages might shed light on the mechanisms involved in posttranscriptional regulation in trypanosomes.

Acknowledgments—We thank Nilson Fidêncio for skilful technical assistance and Paulo Arauco for DNA sequencing. We also thank Dr. Esteban Serra for providing the pTEX-TAPTAG vector.

REFERENCES

- De Souza, W. (2002) *Kinetoplastid Biol. Dis.* **31**, 1–3
- Clayton, C. E. (2002) *EMBO J.* **21**, 1881–1888
- Teixeira, S. M. (1998) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 1503–1516
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. (2002). *Genome Biol.* **3**, 0004.1–0004.10
- Auwater, S. D., Oberstrass, F. C., and Allain, F. H. T. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, 4943–4959
- Keene, J. D., and Tenenbaum, S. A. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1161–1167
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D., and Tanaka Hall, T. M. (2002). *Cell* **110**, 501–512
- Wickens, M., Bernstein, D. S., Kimble, J., and Parker, R. (2002) *Trends Genet.* **18**, 150–157
- Gerber, A. P., Herschlag, D., and Brown, P. O. (2004) *PLoS Biol.* **2**, 342–354
- Wharton, R. P., and Aggarwal, A. K. (2006). *Sci. STKE* 2006, pe37
- Goldstrohm, A. C., Hook, B. A., Seay, D. J., and Wickens, M. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 533–539
- Coller, J. M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., and Parker, R. (2001) *RNA* **7**, 1717–1727
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J., and Vazquez, M. P. (2006) *Exp. Parasitol.* **113**, 112–124
- Dallagiovanna, B., Perez, L., Sotelo-Silveira, J., Smircich, P., Duhagon, M. A., and Garat, B. (2005) *Exp. Parasitol.* **109**, 260–264
- Hoek, M., Zanders, T., and Cross, G. A. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**, 706–716
- Keene, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7018–7024
- Tenenbaum, S. A., Lager, P. J., Carson, C. C., and Keene, J. D. (2002) *Methods* **26**, 191–198
- Contreras, V. T., Araujo-Jorge, T. C., Bonaldo, M. C., Thomaz, N., Barbosa, H. S., Meirelles, M., de, N., and Goldenberg, S. (1988). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83**, 123–133
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., and Goldenberg, S. (1985). *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 315–327
- Contreras, V. T., Navarro, M. C., DeLima, A. R., Arteaga, R., Duran, F., Askue, J., and Franco, Y. (2002). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**, 1213–1220
- Holetz, F., Correa, A., Avila, A. R., Nakamura, C. V., Krieger, M. A., and Goldenberg, S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 1062–1067
- Brecht, M., and Parsons, M. (1998) *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**, 189–198
- Sonoda, J., and Wharton, R. P. (1999) *Genes Dev.* **13**, 2704–2712
- Smyth, G. K. (2004). *Stat. App. Genet. Mol. Biol.* **3**, article 3
- Nardelli, S. C., Avila, A. R., Freund, A., Motta, M. C., Manhaes, L., de Jesus, T. C., Schenkman, S., Fragoso, S. P., Krieger, M. A., Goldenberg, S., and Dallagiovanna, B. (2007) *Eukaryot. Cell* **6**, 337–345
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). *Methods* **24**, 218–229
- Kelly, J. M., Ward, H. M., Miles, M. A., and Kendall, G. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3963–3969
- Bailey, T. L., and Elkan, C. (1994). *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28–36, AAAI Press, Menlo Park, CA
- Luu, V. D., Brems, S., Hoheisel, J. D., Burchmore, R., Guilbride, D. L., and Clayton, C. (2006) *Mol. Biochem. Parasitol.* **150**, 340–349
- Olivas, W., and Parker, R. (2000) *EMBO J.* **19**, 6602–6611
- Wreden, C., Verrotti, A. C., Schisa, J. A., Lieberfarb, M. E., and Strickland, S. (1997). *Development* **124**, 3015–3023
- Mishra, K. K., Holzer, T. R., Moore, L. L., and LeBowitz, J. H. (2003) *Eukaryot. Cell* **2**, 1009–1017
- Vessey, J. P., Vaccani, A., Xie, Y., Dahm, R., Karra, D., Kiebler, M. A., and Macchi, P. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 6496–6508
- Cassola, A., De Gaudenzi, J. G., and Frasch, A. C. (2007) *Mol. Microbiol.* **65**, 655–670
- Jaruzelska, J., Kotecki, M., Kusz, K., Spik, A., Firpo, M., and Reijo-Pera, R. A. (2003) *Dev. Genes Evol.* **213**, 120–126

4.4 Búsqueda de compañeros proteicos.

4.4.1 Purificación de complejos proteicos mediante TAP-tag

4.4.1.1 Estrategia

Para la determinación de la función de TcPUF6 una aproximación muy informativa es el estudio de las interacciones de esta con otras proteínas del parásito. Las interacciones entre proteínas se encuentran involucradas en casi todos los procesos celulares, sin embargo la determinación de los complejos proteicos, formados muchas veces de manera transitoria, es una tarea complicada. Por lo tanto se han desarrollado varios métodos que permiten aproximarnos a la solución de este problema.

Los métodos bioquímicos como la cromatografía de afinidad de proteínas (Ratner 1974), tienen la ventaja de una alta sensibilidad y especificidad (Mayer *et al.* 1991; Zhang *et al.* 1993; Lee *et al.* 2004). Estas metodologías tienen la desventaja de que las interacciones se producen *in vitro* y además es necesario contar con las proteínas puras. Otras metodologías, como la coimmunoprecipitación, intentan solucionar algunos de estos problemas aunque a expensas de perder sensibilidad. (Harlow *et al.* 1986). La purificación por afinidad en tandem (TAP), desarrollada por Rigaut y colaboradores, fue ya comentada en este trabajo (ver sección 4.3 “Caracterización Genómico Funcional de los ARNm asociados a TcPuf6, una proteína Pumilio de *Trypanosoma cruzi*”) siendo una alternativa que conserva las ventajas de la coimmunoprecipitación pero que además no necesita de anticuerpos específicos para la proteína y posee una mayor especificidad que ésta (Rigaut *et al.* 1999).

4.4.1.2 Resultados

La construcción del vector pT-PUF6-tap y obtención de parásitos transfectantes que sobre expresan la proteína de fusión fue comentada en el apartado 4.3. Además en dicha sección mostramos que esta técnica permitió la identificación de la proteína Dhh1 como parte del complejo multiprotéico junto con el cual TcPUF6 actúa.

Aquí mostraremos los resultados obtenidos al proponernos la identificación de otros miembros del complejo de acción de esta proteína PUF a través del estudio por espectrometría de masas de los complejos purificados por tándem de afinidad usando los parásitos transfectados con el vector pT-PUF6-tap. Para cumplir con este objetivo se procedió de la misma forma que lo indicado en el apartado 4.3, pero esta vez los complejos purificados fueron separados en geles de acrilamida preparativos y revelados por tinción de plata. Las bandas fueron recortadas de gel para su análisis por MS. Las alícuotas de las muestras obtenidas además de ser corridas en geles de acrilamida preparativos se corrieron mini-geles para seguir las purificaciones y transferir a membranas de nitrocelulosa con el fin de estudiar la presencia de la proteína de fusión durante la purificación.

En principio se realizaron varios intentos siguiendo los dos pasos de purificación por las columnas de afinidad. Sin embargo, no fuimos capaces de recuperar cantidades suficientes de proteínas para ser visualizadas por esta técnica. Se muestra el perfil obtenido por análisis de las alícuotas de las diferentes fracciones de una purificación en un mini-gel (Figura 4.4.1).

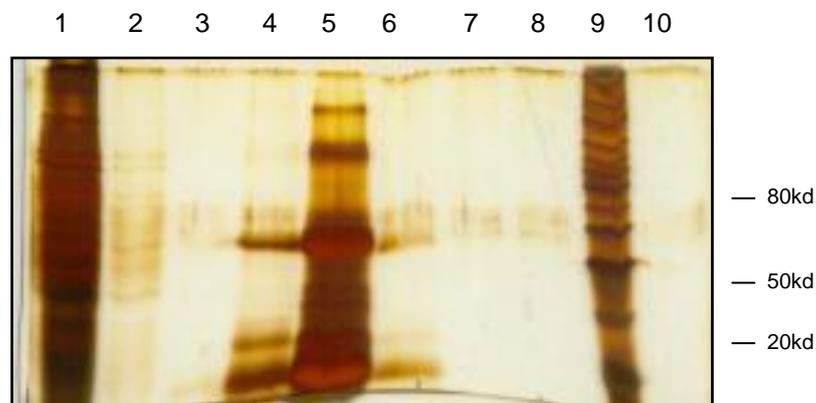


Figura 4.4.1 - Análisis por SDS PAGE de la purificación de proteínas asociadas a TcPUF6-tap por tándem de afinidad. Gel de acrilamida 10% mostrando diferentes fracciones de la purificación. 1-*Flow through* columna de IgG. 2-Lavado. 3-Equilibración con *buffer* TEV. 4-Elución columna de IgG. 5-Columna de IgG luego de eluída tratada con *buffer* de muestra. 6-*Flow through* columna de calmodulina. 7-Lavado. 8-Primer eluído de columna de calmodulina. 9-Marcador de peso molecular Benchmarck. 10-Segundo eluído de columna de calmodulina. En cada carril fueron sembrados 10 μ L de la fracción.

Se puede observar que la elusión de la segunda columna presenta bandas muy tenues y en menor número que el resultado de la primer columna (carriles 8 y 4 respectivamente). La diferencia entre las mallas de los mini-geles y los geles preparativos o las diferencias en la tinción podría explicar la

ausencia de bandas observada en el eluido de la columna de calmodulina en el caso del gel preparativo. Por otra parte, la alícuota correspondiente a la columna de IgG presenta varias bandas similares a las de la fracción eluída con TEV indicando posiblemente que la elusión no fue completa.

Posteriormente se analizaron los eluidos de ambas columnas mediante ensayo de *western blot* utilizando anticuerpo anti-TcPuf6 (Figura 4.4.2). El resultado muestra para el caso del *flow through* dos bandas cuyos tamaños corresponden a la proteína salvaje y a la proteína de fusión. La proteína de fusión también se observa en el eluido de la columna de IgG y en la fracción que quedó unida a la columna luego de la elusión. El hecho de que se observe también en el *flow through* de la columna de calmodulina y en los lavados de la misma muestra claramente que esta columna no es capaz de retener a la proteína de fusión. De hecho, en las eluciones de esta columna la banda correspondiente a TcPUF6-tap no es detectable. Este resultado concuerda con el análisis por minigel de la purificación, mostrando que se obtiene muy poca proteína de la segunda columna.



Figura 4.4.2 - Análisis por *western blot* de la purificación de proteínas asociadas a TcPUF6-tap por tándem de afinidad. La electroforesis se realizó igual que en la figura anterior. 1-*Flow through* columna de IgG. 2-Lavado. 3-Equilibración con *buffer* TEV. 4-Elución columna de IgG. 5-Columna de IgG luego de eluída tratada con *buffer* de muestra. 6- *Flow through* columna de calmodulina. 7-Lavado. 8-Primer eluido de columna de calmodulina. 9-Marcador de peso molecular Benchmarck. 10-Segundo eluido de columna de calmodulina.

El bajo rendimiento del sistema de TAP-*tag* en *T. cruzi*, específicamente a nivel de la purificación por la columna de calmodulina, fue reportado durante el transcurso de este trabajo (Schimanski *et al.* 2005). Con este antecedente se decidió no continuar realizando ambos pasos de purificación sino que se analizaron las proteínas que se purifican sólo del primer paso: columna de IgG. Esta estrategia ha sido aplicada para la identificación de proteínas interactuantes en reportes previos (Goldstrohm *et al.* 2006).

Se realizaron varios intentos siguiendo un único paso de purificación por columna de afinidad de IgG. Alícuotas del *flow through* y del lavado de la

columna de IgG fueron colectadas para su análisis en mini-geles de acrilamida, mientras que el eluido correspondiente se colectó en distintas fracciones en el tiempo (Figura 4.4.3).

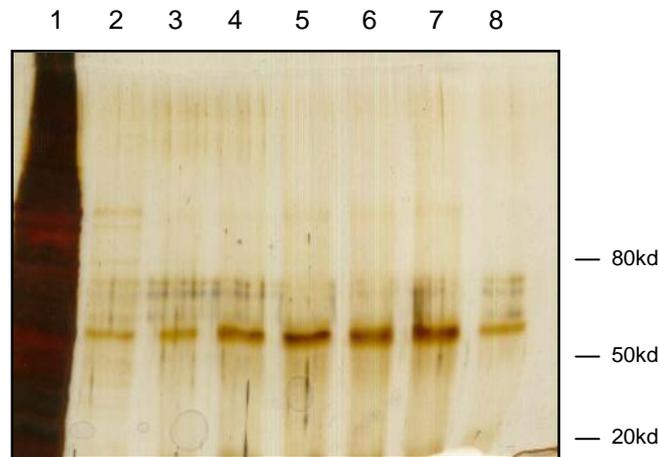


Figura 4.4.3 - Análisis por SDS PAGE de la purificación de proteínas asociadas a TcPUF6-tap por afinidad en columna de IgG. Gel de acrilamida 10% mostrando diferentes fracciones de la purificación: 1-*Flow through* columna de IgG. 2-Lavado. 3 al 8-Eluciones 1 al 6 respectivamente. En cada carril fueron sembrados 10 μ L de la fracción.

Las fracciones de la elusión se corrieron en geles preparativos y se recortaron las bandas mayoritarias como se muestra en la siguiente figura correspondiente a uno de los ensayos realizados (Figura 4.4.4). El mismo experimento realizado con parásitos transfectados con el vector vacío no produjo bandas detectables en los geles preparativos.

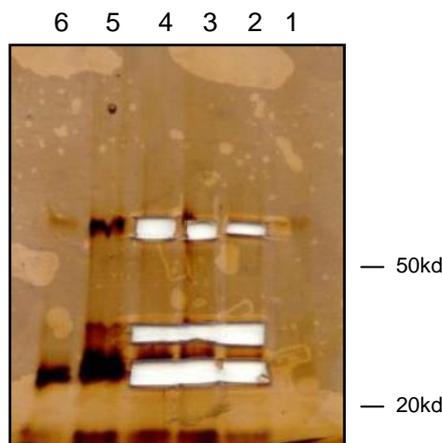


Figura 4.4.4 - Análisis por SDS PAGE de la purificación de proteínas asociadas a TcPUF6-tap por afinidad en columna de IgG. Gel de acrilamida 10% mostrando las diferentes fracciones eluidas de la purificación: MW- Marcador de peso molecular Benchmark. 6-1-Eluciones 1 al 6.

Por lo tanto, con esta metodología fuimos capaces de obtener señales en los diferentes geles de acrilamida preparativos realizados y por lo tanto recortar una serie de bandas de los mismos para ser analizadas. El análisis fue realizado por el servicio de Espectrometría de Facultad de Ciencias-IIBCE por MS de los productos trípticos de cada banda. De los cinco geles analizados, en uno de los casos la calidad de las bandas no permitió la identificación de ninguna proteína. En los otros cuatro geles se obtuvieron bandas que permitieron las búsquedas de péptidos compatibles en las bases de datos arrojando algunos resultados que se resumen en la tabla 4.4.1. Hacemos notar que los cuatro experimentos rindieron bandas que permitieron la identificación de proteínas diferentes. Es decir que, en nuestras condiciones no hubo reproducibilidad. Por otra parte, los valores estadísticos de fidelidad de la identificación de las proteínas mostradas en la tabla son bajos. Ambos problemas puede ser debido a los escasos niveles de proteínas retenidos. Por lo tanto, los resultados obtenidos requieren de una confirmación por metodologías alternativas antes de sacar conclusiones definitivas.

Proteína	Acceso	experimental	teórica	Péptidos reconocidos	Características
Proteína Pumilio 6	35186946	1191.6090	1191.6374	(K)NSPYGVKVEAK (L)	Familia PUF
		1433.5969	1433.6872	(K)ALRENAEEEESSK (E)	
		1707.7452	1707.8124	(-)MPSDEEALAAQYARR (Q)	
Proteína Pumilio 8	35186950	1412.6889	1412.7174	(R)FGIEVVNAAYSSR (L)	Familia PUF
		1493.7848	1493.8368	(R)LFDLVYDVQLLR (K)	
Proteína hipotética	71419074	835.4083	835.4314	(R)EELAAFR (K)	Dominio WD40
		1286.6158	1286.6461	(R)FFFLSFTSYK (K)	
		2153.0409	2153.0259	(R)TITSMCTVEDESPAPLFVGR (E)	
		2331.0060	2331.0265	(R)LPEFGDEDEEDVAPSSPDNIR (Q)	
Proteína RHS	71415074	1341.6383	1341.6005	(K)DDVKAMCVWMK(Q)	retrotransposon hot spot protein
		1384.7169	1384.7299	(K)SVLYGLWKSGMK(G)	
		1615.8310	1615.7498	(R)MATAGEHHTTTSTVR(Q)	
		1774.9654	1774.8686	(K)MALQDTNYYTVLGTGK (M)	
Proteína hipotética	71661982	979.5173	979.4453	(K)QMMRPER(F)	Homología con eIF3
		1064.5412	1064.5628	(R)YALEVAAAEK (A)	
		1267.6710	1267.6693	(R)HGNSLRPSLMR (T)	
		1479.7705	1479.8180	(R)GMPVLAQALVPMPR (E)	
		1725.7992	1725.8845	(K)QIVMLDDDGPRELPK (F)	
		1946.0187	1945.9709	(K)LCDILHFYGINFCFLK (E)	
β-tubulina	18568141	3092.3608	3092.3999	K.FWEVISDEHGVDPDTGTQYQGSDQLER.I	
		1340.5970	1340.6360	R.INVYFDEATGGR.Y	
		1614.8014	1614.8287	R.AVLIDLEPGTMDSVR.A	
		2811.2980	2811.3516	R.AGPYGQIFRPDNFIFGQSGAGNNWAK.G	
		1076.4702	1076.5250	K.LREEYPDR.I	
		1145.5272	1145.5829	R.FPQQLNSDLR.K	
		1124.6190	1124.6706	K.LAVNLVPFPR.L	
		1040.5176	1040.5654	R.YLTASALFR.G	
		1959.9085	1959.9004	K.MAVTFVGNNTCIQEMFR.R	
1184.5169	1184.5648	R.VGEQFTAMFR.R			

Tabla 4.4.1 - Identificación por MS de las proteínas purificadas en los experimentos de TAP-tag. Proteína: nombre en las bases de datos. Acceso: Número de acceso en el GenBank. experimental: masa obtenida experimentalmente para el péptido. teórica: masa del péptido compatible en las bases de datos. Péptidos reconocidos: secuencia del péptido identificado en la muestra. Características: Comentarios relevantes sobre la proteína identificada.

El primer resultado interesante es la identificación de la propia proteína TcPUF6 en los extractos purificados. Este resultado era de esperarse por la metodología utilizada, la cual debería de recuperar en el eluido la proteína de fusión al péptido de unión a calmodulina. Por otra parte, esto valida la metodología utilizada para identificar proteínas en los extractos.

El reconocimiento de la proteína TcPUF8 puede ser un resultado muy interesante dada la metodología aplicada en este ensayo en particular. Este fue el único caso en que los complejos fueron purificados en condiciones libres de ARNasa. Esto es interesante ya que en estas condiciones se pueden llegar a purificar proteínas que interactúan con el mismo mensajero que TcPUF6 aunque no haya una interacción directa con esta última. Trabajos recientes en levadura demuestran que proteínas de la familia PUF, particularmente Mpt5 y PUF4p, son capaces de actuar sobre el mismo mensajero regulando de manera coordinada el destino del mismo (Hook *et al.* 2007). La futura confirmación del resultado obtenido por MS podría estar mostrando la conservación de este tipo de mecanismos en los tripanosomátidos.

Además es de hacer notar la presencia de varias proteínas hipotéticas. Aún luego de los esfuerzos de anotación de los genomas de tripanosomátidos la presencia de proteínas de este tipo es habitual. Esto se debe a la alta proporción de proteínas que son exclusivas de tripanosomátidos. Sin embargo, en este caso en una de las proteínas identificadas pudimos comprobar la presencia de un dominio de tipo WD40. Este dominio está presente en varias proteínas en otros eucariotas, algunas de ellas relacionadas con el procesamiento de los pre-ARNm. La otra proteína hipotética de la lista es similar al factor de inicio de la traducción eIF3 según el análisis por homología, aunque el grado es bajo (*blast expected value* 0.007 con el eIF3 de *Aedes aegypti*).

No comprendemos el significado de la identificación de una proteína RHS.

Por último, la presencia de tubulina de *T. cruzi* es probable que se deba a contaminación de la muestra eluida por arrastre dada la abundancia de esta proteína en el parásito. De todas formas la asociación de RNPs al citoesqueleto para su transporte intracelular está claramente descrita, y por lo tanto no se puede descartar la presencia real de esta proteína en los complejos formados

por TcPUF6 *in vivo*.

Con esta metodología no fue posible identificar ningún componente proteico cuya asociación haya sido previamente descrita en otros organismos modelos. Esto puede deberse a particularidades de los complejos en tripanosomátidos o a una falta de sensibilidad de la técnica utilizada. Particularmente llama la atención la no identificación de la proteína Dhh1 de *T. cruzi* cuya presencia en complejos de TcPuf6 fue demostrada por *western blot* usando los mismos extractos estudiados por SDS Page y MS. Esto pone en evidencia que en nuestras condiciones los ensayos de *western blot* presentan más sensibilidad debido a la amplificación de la señal que resulta del uso del anticuerpo secundario.

Como comentamos en la introducción, según el modelo propuesto de acción de las proteínas de la familia PUF en *S. cerevisiae* la proteína Pop2 actúa como puente entre las PUF y el complejo que posee la actividad efectora de inactivación de ARNm. Los autores sugieren que este mecanismo de acción podría estar conservado en diferentes organismos. La identificación de la proteína Dhh1 en los complejos formados por TcPUF6 que observamos en las purificaciones con TAP-tag apoyan la existencia de esta interacción en *T. cruzi*. Por lo tanto decidimos avanzar en la comprensión de los complejos formados por TcPUF6 teniendo en cuenta los datos previos reportados en otros organismos y reproducidos por *western blot* para *T. cruzi* en nuestros experimentos utilizando la técnica de híbridos en levadura.

4.4.2 Identificación de interacciones por Y2H

4.4.2.1 Estrategia

Otra serie de métodos para la búsqueda de interacciones proteicas están basados en la construcción de bibliotecas de expresión. Una ventaja en este caso es que pueden ser detectadas interacciones entre proteínas de muy baja expresión ya que las proteínas entre las que se quiere evaluar la interacción son enfrentadas una a una. La técnica de doble híbrido en levadura ha sido extensamente utilizada desde su desarrollo hace ya varios años (Fields *et al.* 1989). Esta metodología se basa en la estructura modular de las proteínas de interacción con el ADN y de las proteínas que actúan como

activadoras de la transcripción en organismos eucariotas. Existen dos modalidades diferentes de esta técnica. Una de ellas consiste en la unión de una proteína problema a un dominio de unión al ADN y por otro lado se construye otro híbrido en el que un dominio activador de la transcripción se clona en fase con una biblioteca de ADNc. En este caso se quieren descubrir nuevas proteínas interactuantes con la problema. Por otra parte este ensayo puede ser realizado para averiguar si dos proteínas conocidas interactúan entre sí, en cuyo caso se construyen las dos proteínas de fusión, con el dominio de unión al ADN y con el dominio de activación de la transcripción, una para cada proteína problema.

En ambas modalidades las dos construcciones se transfectan en una célula que expresa un gen reportero controlado por un promotor que incluye la secuencia blanco para el dominio de unión al ADN de la proteína quimérica. Las interacciones son reveladas por la activación de la expresión de este gen reportero (Miller *et al.* 2004). En este caso no se requiere de la purificación de las proteínas ya que estas son expresadas por la propia levadura, lo cual es una ventaja significativa. A diferencia de los métodos como el TAP-tag que identifica todo el complejo multiprotéico, esta metodología permite identificar sólo las proteínas que interactúan directamente con la que se está estudiando.

En nuestro caso utilizamos el sistema de identificación de interacciones ProQuest desarrollado por la compañía Invitrogen con algunas modificaciones. Describiremos brevemente los aspectos más salientes de este sistema para facilitar la comprensión de la estrategia seguida y de los resultados obtenidos. Este sistema utiliza vectores que expresan proteínas de fusión con el dominio de interacción con el ADN de la proteína GAL4 (BD *binding domain*) y con el dominio de activación del mismo factor transcripcional (AD *activation domain*). La interacción de las proteínas problema activará por lo tanto la expresión de genes reporteros que se encuentran bajo el control de promotores que contienen el sitio de unión para el factor GAL4 (Figura 4.4.5).

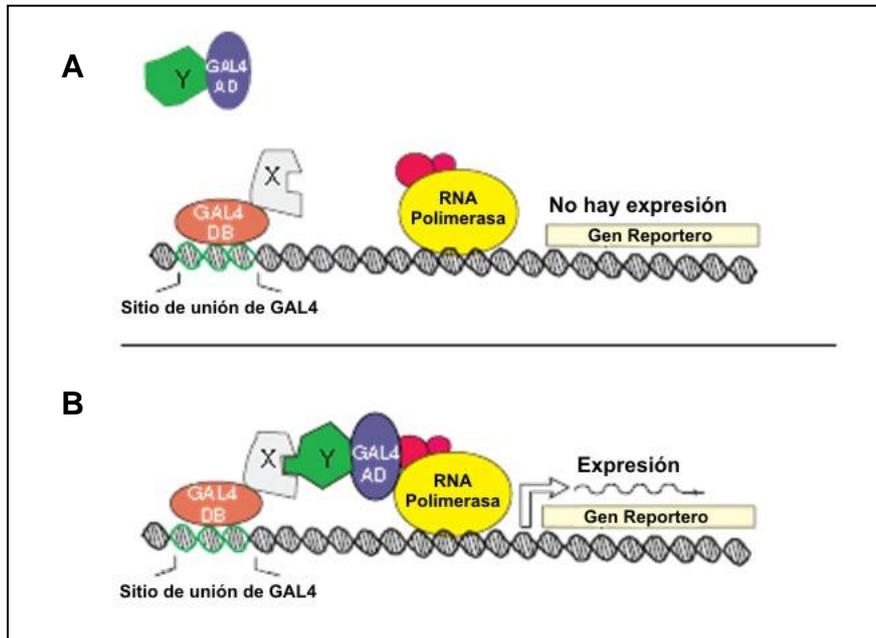


Figura 4.4.5 - Esquema de la técnica de doble híbrido. **A** - En este caso las proteínas no interaccionan, no hay factor de activación reconociendo el promotor y por lo tanto no hay activación del reportero. **B** - Hay interacción entre las proteínas problema y por lo tanto se reconstruye un factor de activación funcional lo que determina la expresión del reportero. Extraído y modificado del manual de referencia ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen).

En particular en este sistema se utiliza la cepa de levaduras MAV203 las cuales tienen integrados en un genoma 3 sistemas de genes reporteros independientes. Por lo tanto una GAL4 interacción en principio debería de ser revelada por cuatro fenotipos particulares (Figura 4.4.6). Como vemos en la

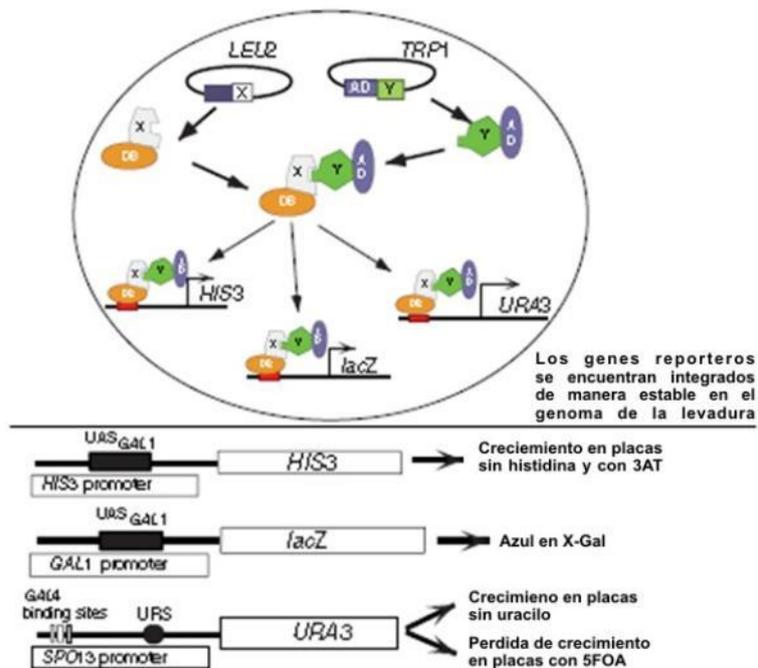


Figura 4.4.6 - Representación de los tres sistemas de reporteros y los fenotipos esperados. Extraído y modificado del manual de referencia ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen). 3AT: 3-Amino-1,2,4-Triazol.

figura, las células que posean proteínas de fusión que interaccionen entre sí serán capaces de crecer en ausencia de histidina, en ausencia de uracilo y presentarán actividad de β -galactosidasa. Por otra parte no serán capaces de crecer en 0.2% 5-FOA (Ácido 5-Fluoroorótico) ya que en presencia del gen Ura3 esta sustancia es metabolizada a 5-fluorouracilo, un producto tóxico.

Otro punto a señalar es que este sistema presenta la disponibilidad previa de cepas transfectadas con varias parejas de proteínas de fusión interactuantes las cuales sirven como control positivo. La afinidad de las interacciones entre estas diferentes parejas de proteínas es variable. Este hecho puede ser usado para comparar con la interacción en estudio y definir semicuantitativamente la afinidad de la misma ya que interacciones más fuertes deberían mostrar fenotipos más marcados. En la siguiente tabla, extraída de la guía del sistema, se muestran las proteínas control transfectadas (A-E) y la afinidad de sus interacciones (Tabla 4.4.2).

Cepa Control	Proteína	Aminoácidos presentes	Intensidad Fenotipo
A	Vector vacío	-	-
	Vector vacío	-	
B	RB	302-928	Débil
	E2F1	342-437	
C	dDP	1-377	Moderada
	dE2F	225-433	
D	Fos	132-211	Fuerte
	Jun	250-325	
E	GAL4	1-881	Muy Fuerte
	Vector vacío	-	

Tabla 4.4.2 - Intensidad de afinidad de interacciones de los patrones de referencia en el sistema ProQuest. Se muestran los diferentes controles junto con el genotipo correspondiente a cada cepa y su fenotipo esperado.

Además de estos controles es necesario controlar que la propia proteína que estamos estudiando no sea capaz de activar el sistema por sí misma sin la necesidad de interaccionar con la segunda proteína en estudio o que interactúe directamente con el dominio de activación de GAL4 de la segunda proteína de fusión. De la misma manera, es necesario verificar que la proteína en estudio de fusión con el dominio de activación no sea capaz de unirse al elemento blanco del dominio de unión o lo haga por interacción directa con el dominio de

unión al ADN de GAL4. Estos controles se realizan transfectando a las levaduras con cada una de las proteínas en estudio y el segundo vector vacío el cual expresa únicamente la región correspondiente de GAL4.

Los plásmidos utilizados son derivados de los vectores pGADT7 y pGBKT7 pertenecientes al sistema Matchmaker de doble híbrido (Clontech). Los vectores son equivalentes a los efectos de ser utilizados en el sistema ProQuest ya que comparten las proteínas de fusión que generan y los sistemas de selección. El cambio de vectores se debe a que los plásmidos fueron modificados por el agregado de un *cassette* que los hace compatibles con el sistema de subclonado múltiple Gateway (Invitrogen). El clonado en los vectores que poseen dicha secuencia se basa en la recombinación del fragmento de interés (insertado en un vector de entrada) en el vector de destino, utilizando el sistema de recombinación específica de sitio de fagos (ver sección 3.7.9 Ensayo de recombinación (Sistema Gateway)). La ventaja de esta metodología es que una vez clonado el fragmento de interés en el vector de entrada, es posible realizar la recombinación a varios vectores de destino diferentes con una reacción de alta eficiencia y quedando el inserto siempre en fase en los casos que esto sea requerido. En nuestro caso se utilizó como vector de entrada el plásmido pENTR3C (Figura 4.4.7).

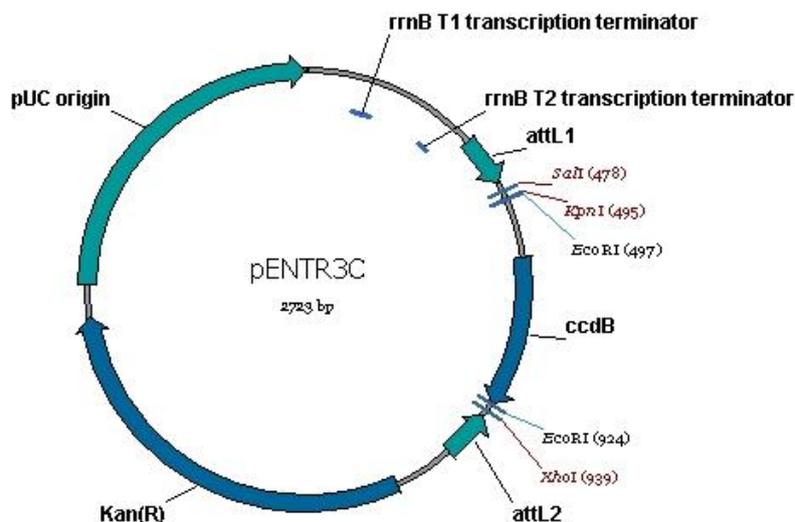


Figura 4.4.7 - Esquema del vector de entrada del sistema Gateway utilizado. AttL 1 y 2: elementos de recombinación específica de sitio. ccdB: gen letal. Kan(R): Resistencia a Kanamicina. pUC origin: origen de replicación. rrnB T1 y T2: Terminadores de transcripción.

Para la realización de los ensayos de doble híbrido se utilizaron los dos vectores de destino comentados anteriormente (Figura 4.4.8).

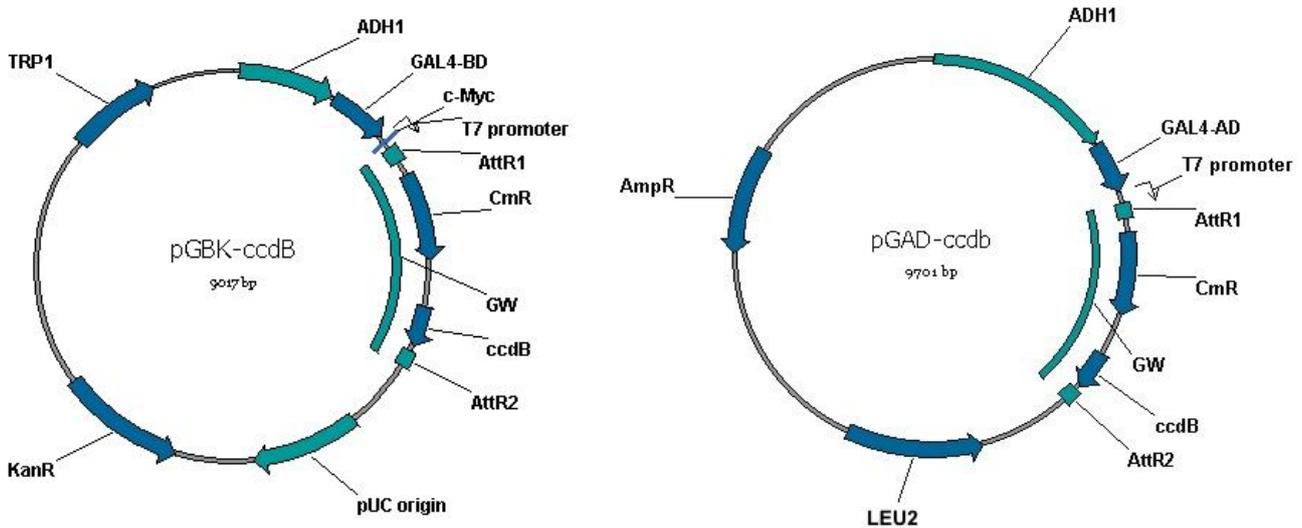


Figura 4.4.8 - Esquema de los vectores utilizados para expresar las proteínas de fusión en el sistema de doble híbrido. GW: *cassette Gateway*. AttR 1 y 2: elementos de recombinación específica de sitio. ccdB: gen letal. CmR resistencia al cloramfenicol. ADH1: Promotor ADH1 de *S. cerevisiae*. **A** - Vector pGBK-ccdB. GAL4-BD: Dominio de unión al ADN del factor GAL4. KanR: Resistencia a Kanamicina. TRP1: reversión de auxotrofia a triptófano. **B** - Vector pGAD-ccdB. GAL4-AD: Dominio de activación del factor GAL4. AmpR: Resistencia a Ampicilina. LEU2: reversión de auxotrofia a Leucina.

Una vez que se cuenta con los vectores de expresión de las proteínas recombinantes los mismos son cotransfectados en dos etapas en la cepa de levadura. Primeramente se transfecta y selecciona con el marcador de auxotrofia de uno de los vectores siendo esta nueva cepa transfectada con el segundo vector y seleccionada por los marcadores de auxotrofia de ambos vectores.

Cuando se cuenta con todas las cepas necesarias se construye una placa maestra donde se crecen varios clones de las diferentes transfecciones junto con los controles del A al E. Esta placa maestra selecciona únicamente la presencia de los vectores de expresión y no las interacciones.

Para comprobar las interacciones se hacen replicas de la placa maestra en las diferentes placas selectivas. Para homogenizar el inóculo en las diferentes placas de los distintos clones se realizan limpiezas de forma que no se observe presencia del inóculo a simple vista. El procedimiento completo se esquematiza en la siguiente figura (Figura 4.4.9).

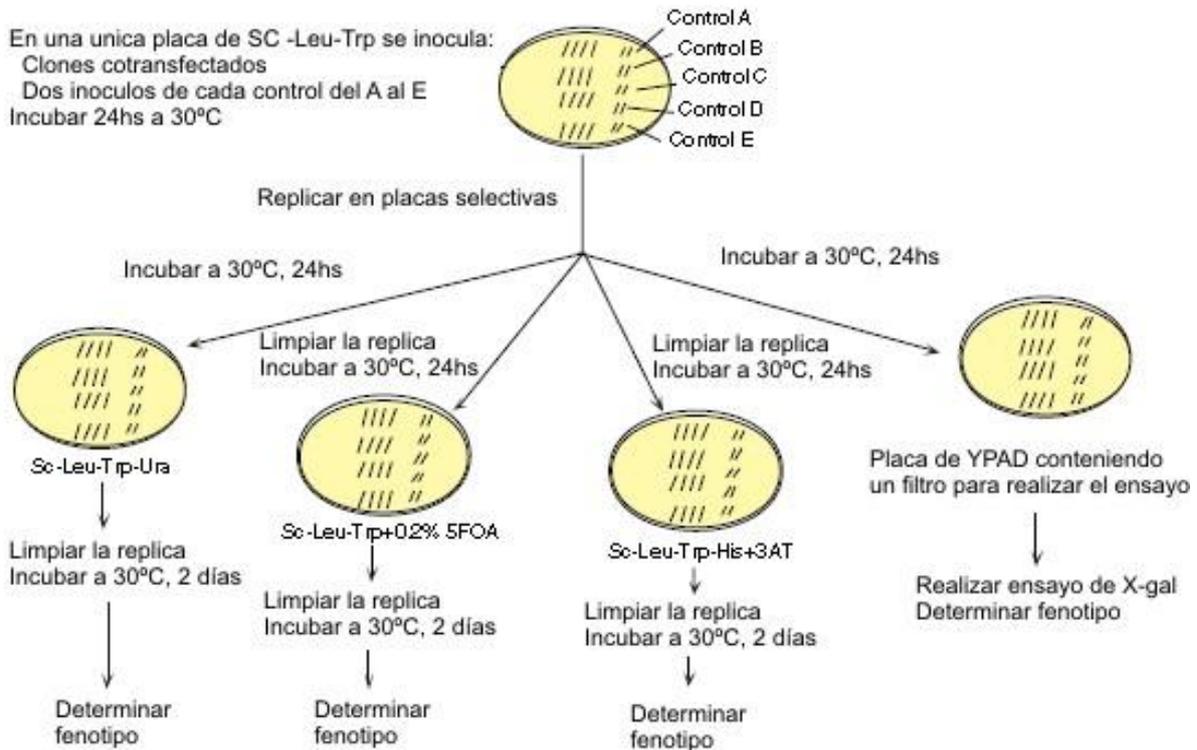


Figura 4.4.9 - Esquema de las etapas implicadas en el análisis de doble híbrido usando el sistema ProQuest. Extraído y modificado del manual de referencia ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen).

Las interacciones positivas deben ser capaces de ser reconocidas por más de un sistema de reporteros.

Un detalle importante es que el sistema reportero que muestra como fenotipo el crecimiento en ausencia de histidina presenta la particularidad de que el gen *HIS3* en las células MAV203 tiene una expresión basal y por lo tanto las levaduras pueden crecer en ausencia de este aminoácido sin existir proteínas interactuantes. El crecimiento producido por esta expresión basal es controlado agregando a las placas 3AT, un inhibidor competitivo específico del producto del gen *HIS3*, la enzima imidazolglicerol fosfato dehidratasa encargada del sexto paso del anabolismo de la histidina. La expresión basal del gen mejora la sensibilidad de este sistema reportero, ya que pequeñas

activaciones pueden ser detectadas si con el agregado de 3AT se observa de todas formas crecimiento de las colonias.

Esta propiedad es también aprovechada en los casos en donde una sola de las proteínas de fusión es capaz de activar un poco el sistema (mecanismo de autoactivación). En este caso se aumenta la concentración de 3AT hasta que el control de autoactivación no sea capaz de crecer. Luego las interacciones son evaluadas a esta misma concentración de 3AT dado que las interacciones positivas serán capaces de activar el sistema en mayor proporción y por lo tanto producir mayor cantidad de HIS3 siendo entonces estas cepas capaces de crecer a la concentración de 3AT que inhibe la autoactivación.

4.4.2.2 Resultados

Clonado de la proteína TcPop2

Como comentamos antes se decidió comprobar la conservación de los complejos descritos en organismos modelo de acción de las proteínas PUF. El mecanismo involucra la interacción directa entre la proteína PUF con Pop2 que a su vez se encarga de interaccionar con el resto de los componentes del complejo macro molecular.

Con estos antecedentes decidimos buscar en las bases de datos la presencia de homólogos para Pop2 en *T. cruzi*. Esta búsqueda dio como resultado la identificación de una secuencia codificante de 1248 pb, la cual esta anotada como un factor putativo asociado a CCR4 (gendb ID Tc00.1047053511827.60). Se realizó el alineamiento de esta secuencia con la correspondiente de levadura revelando el alto grado de similaridad entre ambas proteínas (Figura 4.4.10). A partir de este alineamiento fue posible calcular el porcentaje de identidad y similaridad de ambas secuencias siendo estos valores de 23% y 43% respectivamente. Por otra parte una búsqueda de dominios conservados realizada en el sitio *web* de PFam de la secuencia codificante de TcPop2 reveló la presencia del dominio exonucleolítico conservado Caf1 característico de estas proteínas entre los aminoácidos 119 y 347.

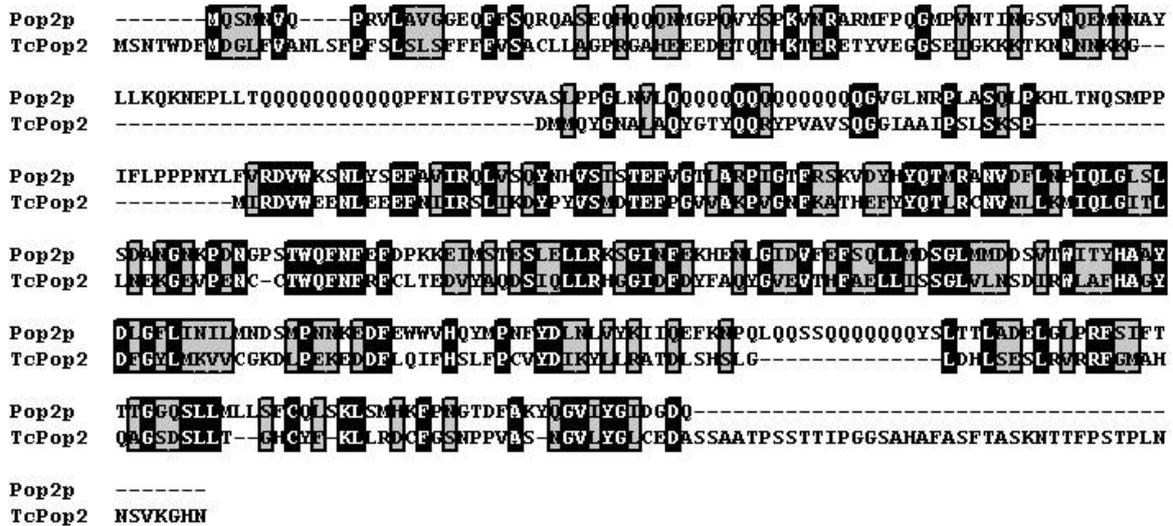


Figura 4.4.10 - Alineamiento entre las secuencias de las proteína Pop2p de *S. cerevisiae* y TcPop2 de *T. cruzi*. En negro se muestran los aminoácidos idénticos mientras que en gris se muestran los similares utilizando la matriz Blosum62.

Con el fin de clonar la región codificante completa de TcPop2 se diseñaron oligonucleótidos específicos para ser usados como cebadores en reacciones de PCR con polimerasas de alta fidelidad utilizando como molde ADN genómico de *T. cruzi*. Los productos de reacción obtenidos fueron purificados en geles de agarosa y clonados en el vector de entrada de Gateway pENTR3C utilizando sitios de restricción previamente incluidos en los cebadores (KpnI y XhoI). El clonado de los insertos fue verificado en un principio por PCR de colonia y mapas restricción de ADN plasmídico (Figura 4.4.11).

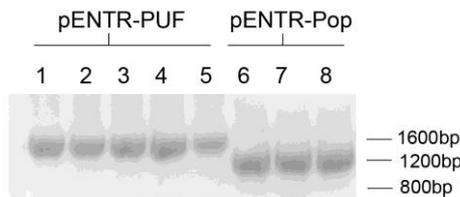


Figura 4.4.11 - Gel de agarosa al 1% con los productos de amplificación obtenidos por PCR de colonia. 1 al 5: Clones de la ligación de pENTR-3C con la secuencia codificante de TcPUF6. 6 al 8 Clones de la ligación de pENTR-3C con la secuencia codificante de TcPop2.

Los clones seleccionados fueron finalmente secuenciados, confirmandose la correcta inserción del producto buscado (Figura 4.4.12).

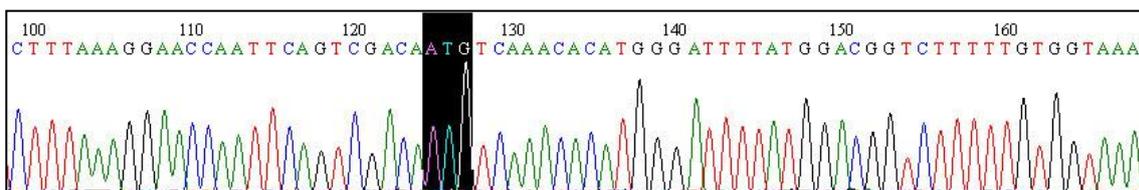


Figura 4.4.12 - Cromatograma obtenido de la secuenciación automática de un clon de pENTR-Pop. En negro se señala el codón de inicio del factor TcPop2.

Ensayos de interacción

Para el clonado en el vector pENTR3C de la secuencia codificante de TcPUF6 se procedió de manera análoga a lo realizado para TcPop2 utilizando cebadores específicos con sitios de restricción apropiados (Sall y EcoRI) (Figura 4.4.13).

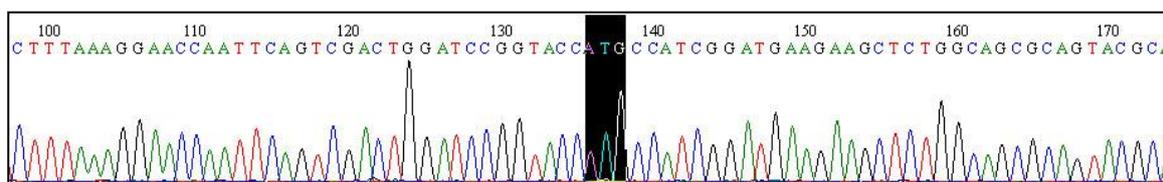


Figura 4.4.13 - Cromatograma obtenido de la secuenciación automática de un clon de pENTR-PUF. En negro se señala el codón de inicio del factor TcPUF6.

Una vez obtenidos los vectores de entrada para el sistema Gateway se realizaron las reacciones de recombinación con el fin de introducir las secuencias de TcPop2 y TcPUF6 en los vectores de destino para realizar los ensayos de doble híbrido. Ambas secuencias codificantes fueron introducidas en ambos vectores de destino para poder producir en las levaduras las 4 proteínas de fusión diferentes, o sea BD-TcPUF6 (vector pGBK-PUF), AD-TcPop2 (vector pGAD-Pop), BD-TcPop2 (vector pGBK-Pop) y AD-TcPUF6 (vector pGAD-PUF). La inserción de las secuencias codificantes en estos vectores fue verificada por PCR y mapeo de restricción, estando la confirmación por secuenciación automática en curso al momento de escribir este trabajo.

La interacción entre las proteínas en estudio se comprueba cotransfectando los plásmidos que expresan las dos parejas de posibles proteínas interactuantes, o sea cotransfectando por un lado con los vectores pGAD-Pop y pGBK-PUF y por otro los vectores pGAD-PUF y pGBK-Pop. Es necesario realizar ambas cotransfecciones ya que está descrito que en ocasiones sólo una de las combinaciones es capaz de detectar la interacción entre las proteínas en estudio.

Por otro lado, es necesario transfectar con cada uno de estos vectores y el correspondiente vector vacío, con el fin de comprobar que una sola de las proteínas de fusión no sea capaz de activar el sistema (mecanismo de autoactivación).

Por último, se cotransfectan ambos vectores sin inserto como control negativo los cuales expresan únicamente los dominios de unión al ADN y de activación.

Con estas consideraciones se realizaron las cotransfecciones de manera seriada, o sea primeramente electroporando uno de los vectores y seleccionando las levaduras transformadas con el marcador adecuado (medio SC sin Leucina o Triptófano según el vector) y luego realizando la transfección de esta línea con el segundo plásmido y seleccionando con los marcadores de ambos vectores (placas de SC agar sin Leucina ni Triptófano), obteniéndose 7 líneas de levaduras cotransfectadas diferentes (Tabla 4.4.3).

Vectores cotransfectados		Proteínas expresadas	Objetivo
pGAD-Pop	pGBK-PUF	AD-TcPop2/ BD-TcPUF6	Evaluar interacción
pGAD-PUF	pGBK-Pop	AD-TcPUF6/ BD-TcPop2	
pGAD-T7	pGBK-PUF	AD/BD-TcPUF6	Evaluar autoactivación por las fusiones al BD
pGAD-T7	pGBK-Pop	AD/ BD-TcPop2	
pGAD-Pop	pGBK-T7	AD-TcPop2/ BD	Evaluar autoactivación por las fusiones al AD
pGAD-PUF	pGBK-T7	AD-TcPUF6/ BD	
pGAD-T7	pGBK-T7	AD/BD	Control negativo

Tabla 4.4.3 - Cotransfecciones a realizar para el ensayo de doble híbrido. En la tabla se muestran en una misma fila los plásmidos a ser cotransfectados, las proteínas que producirán y el objetivo de cada ensayo.

Varios clones de estas cepas son luego inoculados en una única placa de SC agar sin leucina ni triptófano (-Leu-Trp), junto con los controles de interacción del A al E comentados anteriormente, obteniéndose de esta manera la placa maestra. En nuestro caso, dado el número de cotransfectantes, decidimos obtener dos placas maestras separadas. La primera de ellas consiste en el control negativo más los controles de autoactivación de las proteínas de fusión al dominio de unión al ADN (Figura 4.4.14 A). La otra placa maestra consiste en los controles de autoactivación de las proteínas de fusión al dominio de activación y las dos cepas cotransfectadas que evalúan la interacción entre las proteínas en estudio (Figura 4.4.14 B).

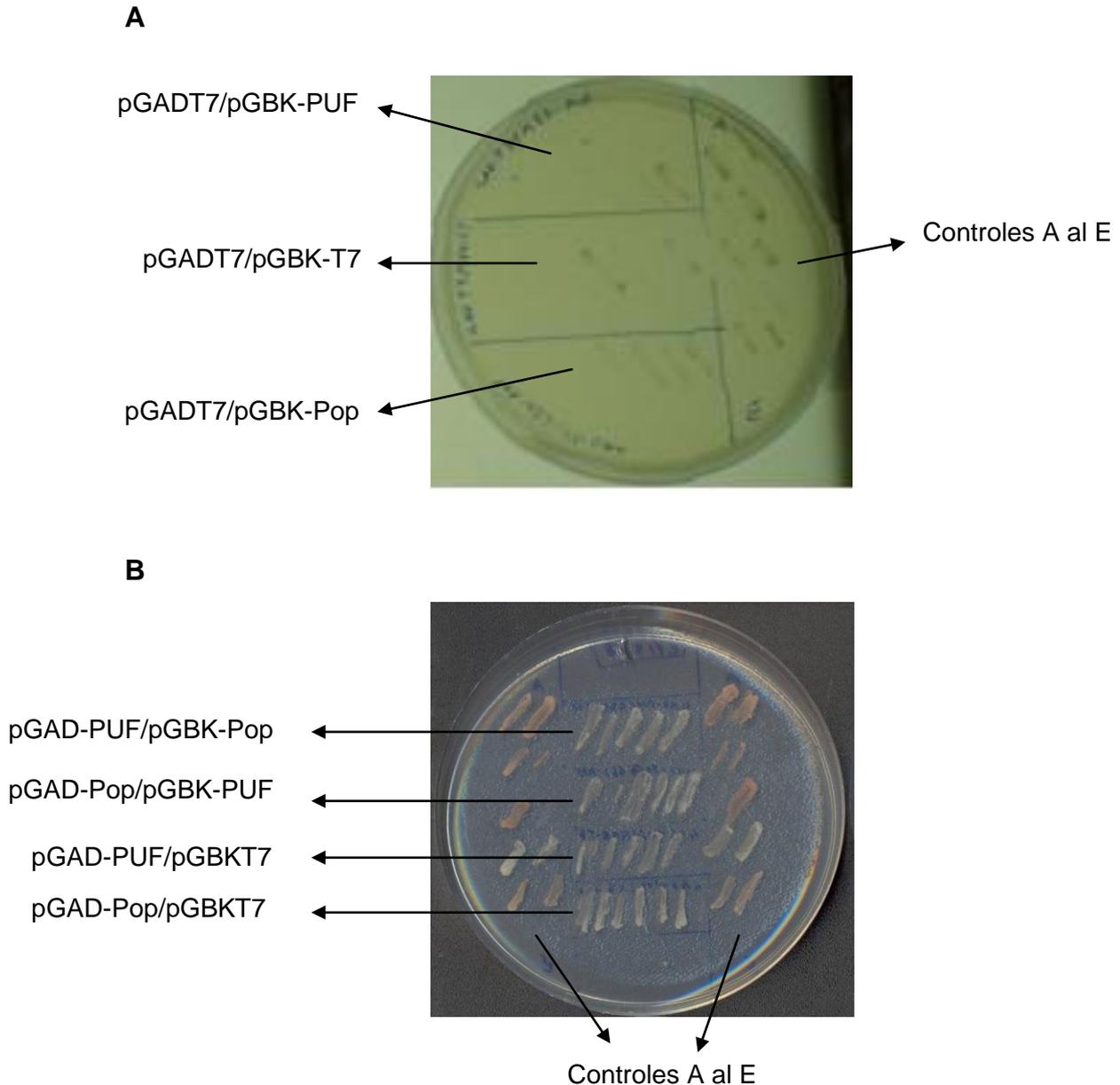


Figura 4.4.14 - Placas -Leu-Trp maestras conteniendo clones de las diferentes cotransfecciones. Los plásmidos cotransfectados en cada cepa están indicados con flechas. **A** - Placa maestra 1. En esta placa algunos de los clones no son visibles debido a que la imagen fue tomada luego de realizarse replicas con la misma. **B** - Placa maestra 2. Se indica en ambos casos los controles plaqueados. Las estrías centrales corresponden a las células cotransfectadas problemas como se indica sobre la izquierda.

Como comentamos en la estrategia para evaluar el reportero HIS3 se aconseja realizar ensayos de inhibición del crecimiento a diferentes concentraciones de 3AT en los controles de autoactivación. Resulta conveniente testear la concentración inhibitoria fundamentalmente para el caso de las autoactivaciones producidas por las proteínas de fusión al dominio de unión al ADN ya que estas son las que más probablemente autoactiven el sistema.

Por esa razón se realizaron replicas en placas -Leu-Trp-His a diferentes concentraciones de 3AT que variaban de 0 a 100 mM de la primera placa maestra (Figura 4.4.15).

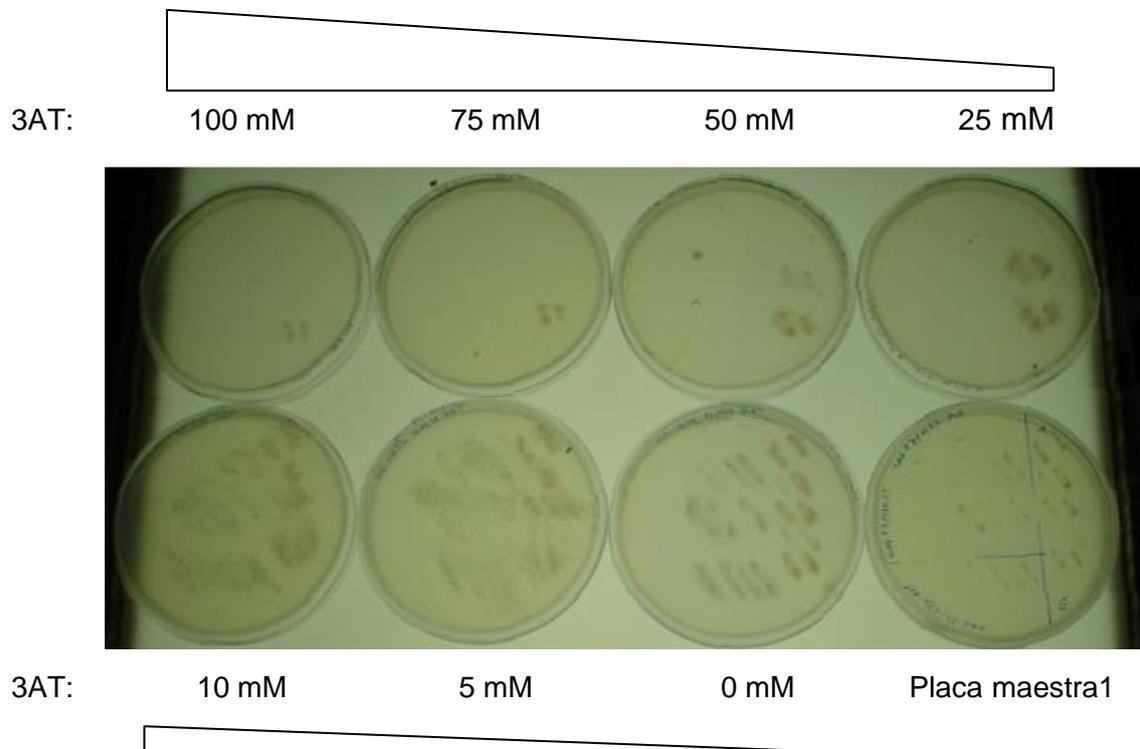


Figura 4.4.15 - Replicas de la placa maestra en medio mínimo -Leu-Trp-His con 3AT (excepto la placa maestra). En la parte superior en inferior se indica la concentración de 3AT. Los números representan las concentraciones de 3AT para cada caso.

En la figura podemos observar que en las placas de 5 y 10 mM de 3AT las estrías se encuentran poco definidas seguramente debido a la aplicación de demasiada presión durante el procedimiento de limpieza de las replicas. De todas formas es claro que a estas concentraciones todos los clones son capaces de crecer mientras que a concentraciones mayores a 25 mM de 3AT los clones correspondientes a los controles no son capaces de crecer. Notamos también que la pérdida de señal para los controles de autoactivación se da junto con la pérdida de señal del control negativo, por lo que podemos especular que no ocurre una activación significativa del sistema por parte de las proteínas de fusión. Por lo tanto los siguientes estudios fueron realizados en el rango de 25 a 75 mM de 3AT. La señal para los controles del A al E se va perdiendo a medida que aumenta la concentración de 3AT primero en el control A y así sucesivamente como corresponde a las diferentes intensidades de las interacciones control.

Esta placa maestra fue replicada también en ausencia de uracilo y fue evaluada la expresión de β -galactosidasa en los diferentes clones, siendo ambos resultados negativos para como era de esperarse (Figura 4.4.16).

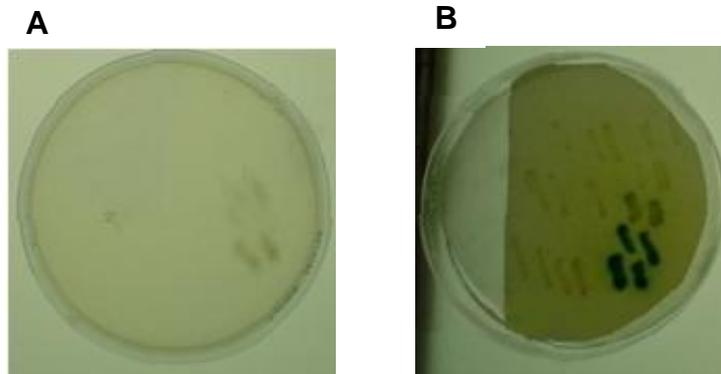


Figura 4.4.16 - Análisis de los reporteros URA3 y β -galactosidasa **A** - Réplica de la placa maestra 1 crecida en medio -Leu-Trp-Ura. **B** - Réplica de la placa maestra 1 a la cual se le realiza el ensayo de actividad β -galactosidasa sobre filtro de nitrocelulosa. Las estrías con actividad enzimática se observan oscuras.

Con estos resultados se procedió a realizar las replicas para evaluar los diferentes sistemas de reporteros utilizando la placa maestra 2 (Figura 4.4.17 A y B).

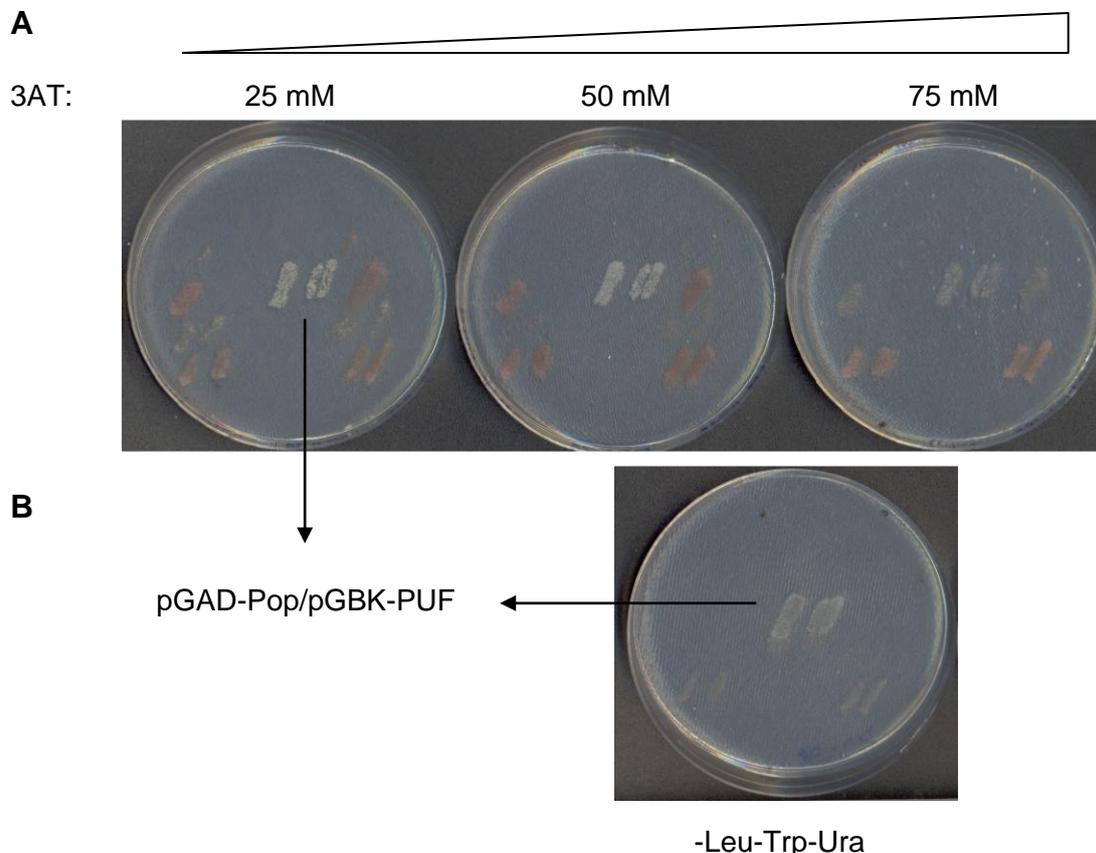


Figura 4.4.17 - Réplicas de la placa maestra 2. **A** - crecida en medio -Leu-Trp-His con agregado de 3AT según lo indicado. **B** - Réplica de la placa maestra 2 crecida en medio -Leu-Trp-Ura.

La figura muestra que varios clones de la cepa de levaduras cotransfectadas con los plásmidos que expresan la proteína TcPUF6 fusionada al dominio de unión al ADN y la proteína TcPop2 fusionada al dominio de activación (pGAD-Pop/pGBK-PUF) son capaces de crecer tanto en ausencia de histidina a altas concentraciones de 3AT así como en ausencia de uracilo. Ninguno de los controles es capaz de crecer en estas condiciones. Cabe destacar que se realizaron replicas en placas conteniendo 5-FOA sobre las cuales son capaces de crecer únicamente las cepas que no expresan el gen URA3. La mala calidad de las imágenes impide su presentación en este trabajo, aunque el análisis minucioso de las placas sugiere que los clones positivos para la interacción son efectivamente incapaces de crecer en presencia de esta droga, confirmando la inducción del gen URA3.

Estos resultados estarían mostrando la interacción directa entre ambas proteínas y por lo tanto también la conservación en *T. cruzi* del mecanismo de acción propuesto para las PUF de otros organismos.

Llamativamente las cotransfecciones que expresan las proteínas fusionadas con los dominios cambiados (pGad-PUF/Gbk-Pop) no crecen en los medios selectivos indicando que los productos proteicos no son capaces de interaccionar con la suficiente afinidad como para producir señal en este sistema. Este fenómeno ha sido observado con anterioridad y ha sido atribuido a un plegamiento tal de alguna de las proteínas de fusión que impidan la interacción entre ambas. Otro resultado llamativo es que el ensayo de actividad β -galactosidasa realizado sobre los filtros de nitrocelulosa resultó negativo. En estos casos se puede evaluar esta actividad enzimática realizando una determinación de actividad *in vitro* a partir de extractos de las cepas cotransfectadas. Dado que encontramos activación para los reporteros Ura e His comentados con anterioridad, se considera que existe interacción.

Para confirmar los controles realizados y como una forma alternativa y más sensible de realizar los ensayos de interacción se realizaron diluciones seriadas de cultivo de levaduras las cuales se plaquearon en los diferentes medios. Para sembrar en cada gota la misma cantidad de células se normalizó por medida de la densidad óptica de los cultivos (Figura 4.4.18). Esta estrategia se realizó fundamentalmente para analizar aquellas cotransfecciones cuyos productos proteicos no rindieron una interacción apreciable por la metodología anterior. El caso donde si se detectó interacción clara no fue ensayado de esta forma.

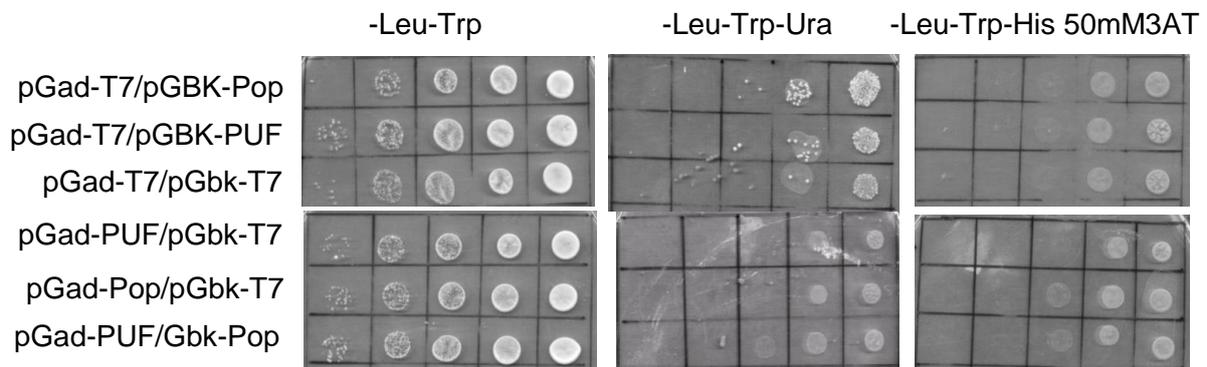


Figura 4.4.18 - Análisis por crecimiento en medio selectivo de diluciones seriadas. En cada fila están sembradas las levaduras transfectadas con los plásmidos que se indican sobre la izquierda. El carril de la derecha corresponde al cultivo sin diluir realizándose diluciones seriadas al décimo en las siguientes gotas hacia la izquierda. Los medios selectivos se indican sobre cada figura.

De esta forma confirmamos aquí también como los controles son sensibles a la deficiencia en uracilo e histidina, reforzando los resultados obtenidos en el ensayo anterior.

Por otra parte, si se observa la placa sin uracilo vemos como la cepa que expresa ambas proteínas de fusión (pGad-PUF/Gbk-Pop) es capaz de crecer hasta la segunda dilución mientras que ninguno de los controles es capaz de hacerlo. Este resultado podría sugerir que en este sistema más sensible que el anterior estamos observando la capacidad de ambas proteínas de establecer una interacción aunque sea débil lo cual apoya el claro resultado obtenido para las proteínas de fusión con los dominios cambiados (pGAD-Pop/pGBK-PUF).

4.4.3 Expresión de TcPop2 recombinante en *E. coli*.

Para confirmar los resultados obtenidos por doble híbrido nos proponemos realizar diferentes técnicas que en general involucran la obtención de la proteína TcPop2 pura y la producción de anticuerpos específicos. Para comenzar a realizar este objetivo decidimos clonar la secuencia codificante de TcPop2 en vectores que permitan su expresión heteróloga en *E. coli* como proteína de fusión a *tags* de afinidad para facilitar la purificación. Para esto se aprovecho la ventaja de contar con el vector de entrada pENTR-Pop, el cual nos permite el clonado por recombinación en vectores de destino que cuentan con la posibilidad de expresar la proteína de interés fusionada a GST (glutación S-transferasa) y al *tag* de seis histidinas (6xHIS) (Figura 4.4.19).

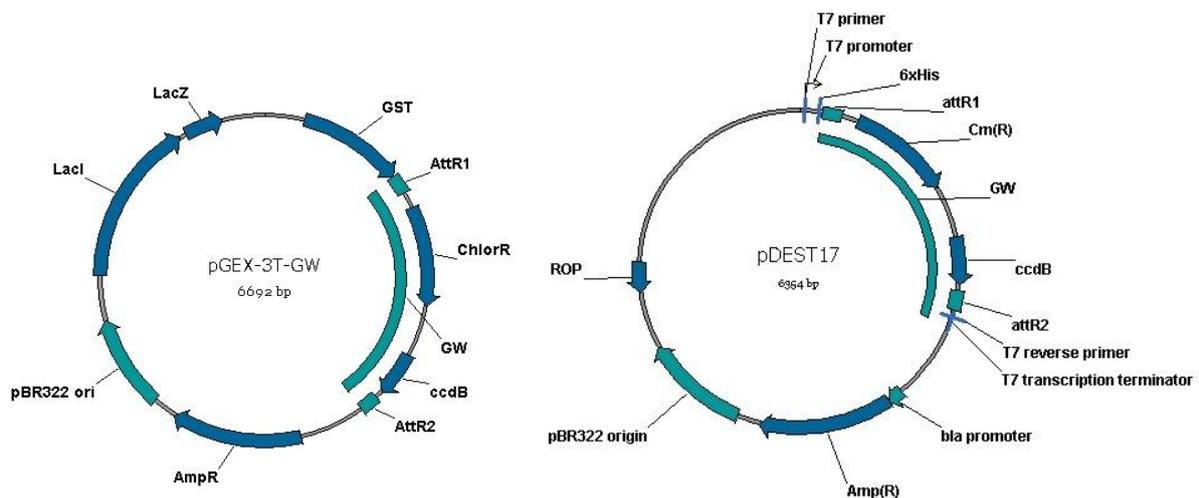


Figura 4.4.19 - Esquema de los vectores utilizados para expresar las proteínas de fusión en *E. coli*. GW: *cassette* Gateway. AttR 1 y 2: elementos de recombinación específica de sitio. ccdB: gen letal. CmR/ChlorR: resistencia al cloramfenicol. pBR322 ori: origen de replicación. **A** - Vector pGEX-3T-GW. GST: Secuencia codificante de la proteína GST. AmpR: Resistencia a Ampicilina. LacI: Represor lac. LacZ: Secuencia codificante de la β -galactosidasa. **B** - Vector pDEST17. 6xHis: Secuencia codificante del *tag* de 6 histidinas. Amp(R): Resistencia a Ampicilina. ROP: Secuencia codificante de la proteína ROP.

Luego de realizada la reacción de recombinación con ambos vectores de destino, las colonias obtenidas fueron rastreadas por PCR de colonia y los clones positivos fueron verificados por mapeo de restricción.

Una vez verificados los vectores, se procedió a comprobar la correcta expresión de la proteína recombinante en *E. coli*. La cepa DH5 α en la cual se transformaron los vectores no posee polimerasa T7 y por lo tanto no es capaz de inducir la expresión a partir del vector pDEST17 por lo cual, en una primera

instancia, no fue ensayada la expresión a partir de este vector. Por otro lado, el vector pGEX-3T no tiene requerimientos específicos de cepa de *E. coli* y por lo tanto se decidió realizar la inducción con 1 mM IPTG del promotor *tac* encargado de controlar la producción de la proteína de fusión. La inducción se realizó a 37 °C durante 2 horas luego de lo cual las bacterias fueron colectadas y lisadas por el agregado de *buffer* de carga e hirviéndolas durante 5 min. El extracto proteico total fue sembrado en un gel de acrilamida que fue teñido con Coomassie Blue (Figura 4.4.20).

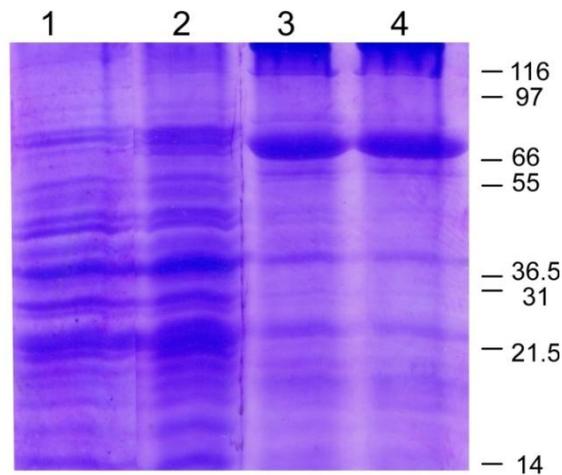
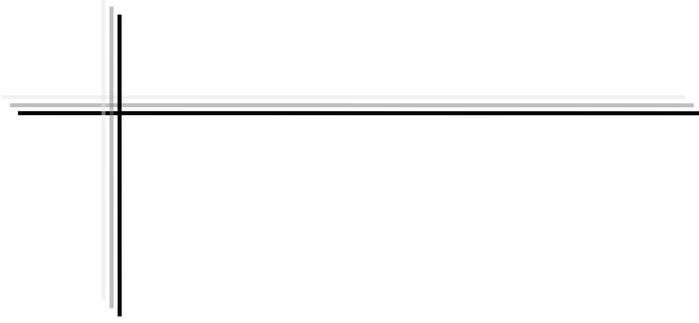


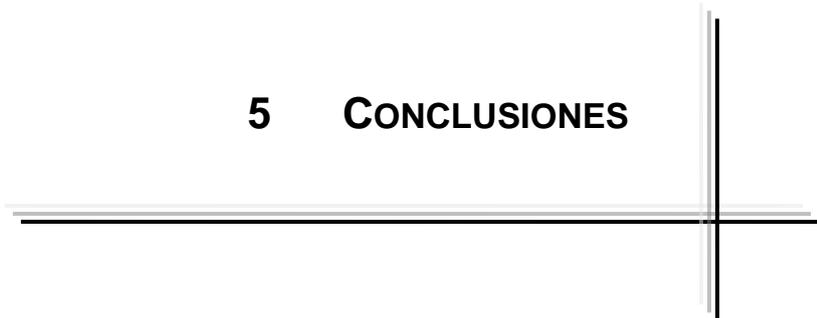
Figura 4.4.20 - Análisis de expresión de la proteína de fusión TcPop2-Gst. Se muestra un gel de acrilamida al 10% teñido con Coomassie Blue en donde se siembran los extractos obtenidos de los diferentes cultivos. Carril 1: Sin inducir. Carriles 2 al 4: Clones 2, 3 y 4 respectivamente inducidos con IPTG.

En el gel observamos que los clones 3 y 4 claramente sobre expresan una proteína del tamaño esperado (aproximadamente 75 kDa).

La puesta a punto de las mejores condiciones para la obtención de proteína soluble está siendo realizada al momento de escribir este trabajo.



5 CONCLUSIONES



El área de estudio de la regulación a nivel post transcripcional ha sufrido un gran avance en los últimos años. La descripción de grandes familias de reguladores tanto a nivel de proteínas como a nivel de ARN pequeños y la gran cantidad de procesos en los cuales estos actúan ha mostrado la importancia de este tipo de regulación en los diferentes organismos.

La particularidad de *Trypanosoma cruzi* de basar la regulación de la expresión génica a este nivel lo convierte en un excelente modelo para el estudio de estos procesos. Sin embargo, hasta el momento son pocos los factores que intervienen en la regulación de la expresión génica de este organismo que han sido descritos y menos los que han sido caracterizados a nivel funcional.

Los reguladores de la familia Pumilio están universalmente distribuidos y actúan a nivel de la estabilidad o traducibilidad de los ARNm. En este trabajo nos propusimos profundizar en el conocimiento de los mecanismos post transcripcionales que intervienen en la regulación de la expresión génica en *T. cruzi* centrándonos en el estudio de la familia de proteínas Pumilio.

Este trabajo aportó el clonado y caracterización molecular de uno de los miembros de la familia al cual denominamos TcPUF6. La secuencia aminoacídica y la estructura secundaria predicha acompañan las características comunes de la familia de proteínas Pumilio. A partir de la proteína recombinante TcPUF6 se pudo por un lado, generar anticuerpos para el estudio de la expresión subcelular a lo largo del ciclo de vida y por otro lado, se pudo determinar la capacidad de establecer interacciones con elementos de respuesta heterólogos. Se encontró que al igual que los otros miembros de la familia Pumilio en los diferentes eucariotas estudiados, TcPUF6 no presenta expresión diferencial durante el desarrollo. A nivel subcelular se encuentra dispersa en el citoplasma y formando focos discretos. La proteína recombinante TcPUF6 es capaz de establecer interacciones específicas *in vitro* con el elemento de respuesta a Nanos, NRE de *Drosophila*.

En este trabajo logramos definir la composición de la familia Pumilio en *T. cruzi* así como en otros tripanosomátidos. Los datos obtenidos concuerdan con los publicados posteriormente una vez completados los proyectos genomas. Es interesante destacar que esta familia resultó ser muy numerosa en los tripanosomátidos estudiados. Este hecho respalda la hipótesis de una

fuerte regulación a nivel post transcripcional y concuerda con los datos de abundancia descritos para otros factores reguladores a nivel de ARN en estos organismos. Los nueve miembros de la familia analizados comparten las características fundamentales de esta familia aunque sus secuencias son bastante divergentes dificultando la asignación de funcionalidad por homología a las descritas en otros eucariotas. Se pudieron establecer predicciones de características de la secuencia reconocida por TcPUF6 en los blancos específicos.

Para el estudio de la funcionalidad de TcPUF6 en este trabajo se implementó la sobre expresión en el sistema homólogo como proteína de fusión al TAP-*tag*. Esto permitió el análisis de sus efectos a nivel de la población de ARNm. Los mensajeros afectados codifican proteínas con funciones diversas en el parásito incluyendo quinasas, proteasas y proteínas de unión al ARN. Por otra parte esta aproximación permitió el estudio global de los blancos directos y de compañeros proteicos de acción. Los ARN identificados como posibles blancos directos incluyen exonucleasas, fosfatasas y transportadores. Sus secuencias se caracterizan por contener la secuencia predicha como elemento blanco en el análisis *in silico*. De hecho el análisis de motivos realizado mediante el software meme permitió identificar una secuencia UGUUUUUUUU consenso entre los diferentes mensajeros. El nivel de estos ARN es menor en los parásitos que sobre expresan la proteína de fusión sugiriendo que TcPUF6 es un regulador negativo de los niveles de sus ARN blanco. Otra observación interesante es que estos transcritos se encuentran presentes en mayor proporción en el estadio tripomastigota metacíclico. Esto sugiere que TcPUF6 afecta la expresión diferencial en el ciclo de vida de las proteínas que regula, seguramente a través de su interacción con proteínas diferentes. Este rango variado de acción para TcPUF6 es semejante a lo que ocurre para proteínas de esta familia en otros organismos modelo.

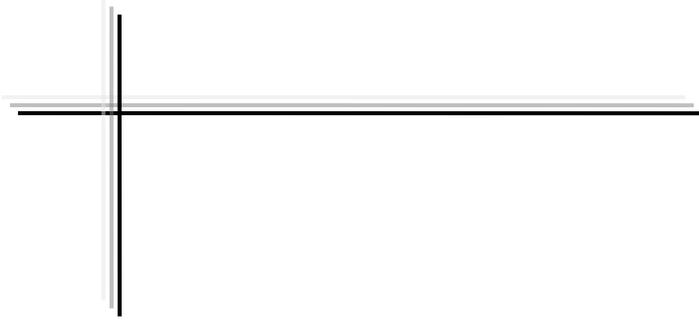
A nivel de compañeros proteicos, la resolución obtenida por la aproximación de sobre expresión como TAP-*tag* no rindió resultados reproducibles. Los datos de la literatura junto con los resultados obtenidos para TcPUF6 de niveles de ARN blanco y la localización subcelular a nivel de *foci* discretos, nos llevó a preguntarnos sobre la coexistencia de TcPUF6 con marcadores característicos de *P bodies*. Se observó la copurificación de

TcDhh1 una helicasa que interviene en la potenciación de los mecanismos de degradación a partir de extractos de parásitos que sobre expresan TcPUF6-tap, además de su colocalización con TcPUF6 *in vivo*. Esto también apunta a la participación de TcPUF6 en procesos de degradación de sus ARN blancos. El hecho de que la interacción con Dhh1 no se observa en la forma tripomastigota metacíclica estaría respaldando los estudios por microarreglos que sugieren que el rol diferencial de TcPUF6 en el ciclo de vida depende de los compañeros proteicos. Para profundizar en el mecanismo molecular involucrado, en este trabajo nos planteamos el estudio de interacciones mediante la implementación del sistema de doble híbrido. Esta aproximación nos permitió verificar que TcPUF6 establece una interacción directa con la proteína TcPop2 que funciona como puente entre proteínas de unión al ARN y la maquinaria de degradación que se encuentra presente característicamente en los *P bodies*.

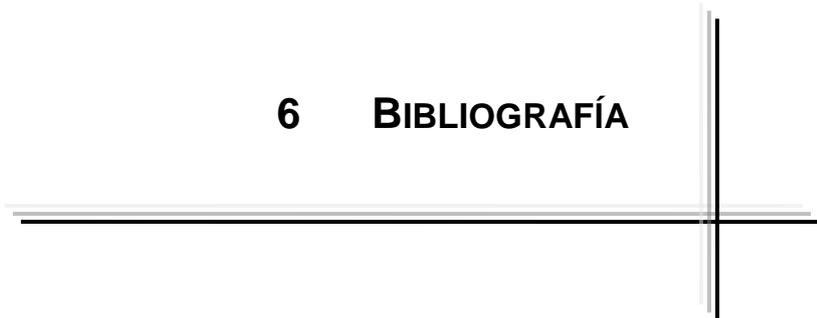
Estos datos sumados a otros obtenidos en otros organismos permiten comenzar a armar una visión de la funcionalidad de esta proteína en el parásito. Además de la interacción aquí identificada, otras interacciones que involucren nuevos actores intervinientes podrán ser verificadas haciendo usufructo de las herramientas desarrolladas.

Muy recientemente y durante la escritura de este trabajo el grupo de Clayton y colaboradores, describió el complejo Not/Caf1/Ccr4 de *T. brucei* usando la estrategia de TAP-tag (Schwede *et al.* 2008). Encuentran que sería directamente TbCaf1 la encargada de realizar la deadenilación de los mensajeros a diferencia de lo descrito para levaduras. De hecho, el complejo formado por TbCaf1 (ortólogo de TcPop2) no incluye a la proteína Ccr4. Por otro lado demuestran la asociación de la helicasa Dhh1 a estos complejos. Estos resultados complementan y apoyan los obtenidos en nuestro trabajo confirmando entonces la importancia de los mecanismos descritos en la regulación de la estabilidad de los mensajeros en tripanosomátidos.

En conclusión, las metodologías aquí implementadas permitieron caracterizar una proteína de unión al ARN de la familia Pumilio en *Trypanosoma cruzi* y varias de las interacciones moleculares en las que participa e intervienen en la determinación de su funcionalidad, abriendo la posibilidad de profundizar en los mecanismos de regulación de la expresión génica en este parásito.



6 BIBLIOGRAFÍA



- Abaza, I. y Gebauer, F. (2008). "Trading translation with RNA-binding proteins." RNA **14**(3): 404-9.
- Agabian, N. (1990). "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." Cell **61**(7): 1157-60.
- Andersson, B., Aslund, L., Tammi, M., Tran, A.N., Hoheisel, J.D., Pettersson, U. (1998). "Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region." Genome Research **8**: 809-816.
- Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., *et al.* (1999). "Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos." Nat Cell Biol **1**(7): 431-7.
- Ausubel, F. M. (1987). Current protocols in molecular biology. New York, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.
- Auweter, S. D., Oberstrass, F. C., *et al.* (2006). "Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition?" Nucleic Acids Res **34**(17): 4943-59.
- Avila, A. R., Yamada-Ogatta, S. F., *et al.* (2001). "Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." Mol Biochem Parasitol **117**(2): 169-77.
- Barker, D. D., Wang, C., *et al.* (1992). "Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos." Genes Dev **6**(12A): 2312-26.
- Boucher, N., Wu, Y., *et al.* (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element." J Biol Chem **277**(22): 19511-20.
- Bringaud, F., Muller, M., *et al.* (2007). "Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*." PLoS Pathog **3**(9): 1291-307.
- Brooks, D. R., Denise, H., *et al.* (2001). "The Stage-regulated Expression of *Leishmania mexicana* CPB Cysteine Proteases Is Mediated by an Intercistronic Sequence Element." J. Biol. Chem. **276**(50): 47061-47069.
- Caro, F., Bercovich, N., *et al.* (2006). "*Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family." Exp Parasitol **113**(2): 112-24.
- Castellani, O., Ribeiro, L. V., *et al.* (1967). "Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture." J Protozool **14**(3): 447-51.
- Castresana, J. (2000). "Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis." Mol Biol Evol **17**(4): 540-52.
- Clayton, C. y Shapira, M. (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias." Mol Biochem Parasitol **156**(2): 93-101.
- Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." Embo J **21**(8): 1881-8.
- Coderre, J. A., Beverley, S. M., *et al.* (1983). "Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(8): 2132-6.
- Colasante, C., Robles, A., *et al.* (2007). "Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **151**(2): 193-204.
- Contreras, V. T., Araujo-Jorge, T. C., *et al.* (1988). "Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media." Mem Inst Oswaldo Cruz **83**(1): 123-33.
- Coughlin, B. C., Teixeira, S. M., *et al.* (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**(16): 12051-60.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o

- ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homen." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **1**: 159-219.
- Cheong, C. G. y Hall, T. M. (2006). "Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13635-9.
- D'Orso, I., De Gaudenzi, J. G., *et al.* (2003). "RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes." Trends Parasitol **19**(4): 151-5.
- D'Orso, I. y Frasch, A. C. (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**(19): 15783-93.
- D'Orso, I. y Frasch, A. C. (2001). "TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes." J Biol Chem **276**(37): 34801-9.
- D'Orso, I. y Frasch, A. C. (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**(52): 50520-8.
- Dallagiovanna, B., Correa, A., *et al.* (2007). "Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem.
- Dallagiovanna, B., Perez, L., *et al.* (2005). "*Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein." Exp Parasitol **109**(4): 260-4.
- Dallagiovanna, B., Plazanet-Menut, C., *et al.* (2001). "*Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis." Exp Parasitol **99**(1): 7-16.
- Das, A. y Bellofatto, V. (2003). "RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 80-5.
- de Carvalho, T. U. y de Souza, W. (1986). "Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **28**(4): 205-12.
- de Moor, C. H., Meijer, H., *et al.* (2005). "Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 49-58.
- De Souza, W. (2002). "Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*." Curr Pharm Des **8**(4): 269-85.
- Devaux, S., Lecordier, L., *et al.* (2006). "Characterization of RNA polymerase II subunits of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **148**(1): 60-8.
- Di Noia, J. M., D'Orso, I., *et al.* (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**(14): 10218-27.
- Drozd, M. y Clayton, C. (1999). "Structure of a regulatory 3' untranslated region from *Trypanosoma brucei*." Rna **5**(12): 1632-44.
- Dubessay, P., Ravel, C., *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**(17): 3692-7.
- Dubnau, J., Chiang, A. S., *et al.* (2003). "The staufer/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory." Curr Biol **13**(4): 286-96.
- Edwards, T. A., Pyle, S. E., *et al.* (2001). "Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs." Cell **105**(2): 281-9.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., *et al.* (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-15.
- Engstler, M. y Boshart, M. (2004). "Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **18**(22): 2798-811.
- Espinosa, J. M., Portal, D., *et al.* (2003). "*Trypanosoma cruzi* poly-zinc finger protein: a novel DNA/RNA-binding CCHC-zinc finger protein." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 35-44.

- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., *et al.* (2007). "*P bodies*: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**: 9-22.
- Fields, S. y Song, O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Frasch, A. C. (2000). "Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*." Parasitol Today **16**(7): 282-6.
- Furger, A., Schurch, N., *et al.* (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**(8): 4372-80.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Gay, A. C., *et al.* (2007). "Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast." J Cell Biol **176**(2): 197-207.
- Gerber, A. P., Herschlag, D., *et al.* (2004). "Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast." PLoS Biol **2**(3): E79.
- Gerber, A. P., Luschnig, S., *et al.* (2006). "Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4487-92.
- Gilinger, G. y Bellofatto, V. (2001). "Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms." Nucleic Acids Res **29**(7): 1556-64.
- Goldstrohm, A. C., Hook, B. A., *et al.* (2006). "PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs." Nat Struct Mol Biol **13**(6): 533-9.
- Goldstrohm, A. C., Seay, D. J., *et al.* (2007). "PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p." J Biol Chem **282**(1): 109-14.
- Gu, W., Deng, Y., *et al.* (2004). "A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization." Genes Dev **18**(12): 1452-65.
- Gunzl, A., Bruderer, T., *et al.* (2003). "RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell **2**(3): 542-51.
- Gupta, Y. K., Nair, D. T., *et al.* (2008). "Structures of Human Pumilio with Noncognate RNAs Reveal Molecular Mechanisms for Binding Promiscuity." Structure.
- Haile, S., Estevez, A. M., *et al.* (2003). "A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs." RNA **9**(12): 1491-501.
- Haile, S. y Papadopoulou, B. (2007). "Developmental regulation of gene expression in *trypanosomatid* parasitic protozoa." Curr Opin Microbiol **10**(6): 569-77.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl Acids Symp Ser **41**: 95-98.
- Harlow, E., Whyte, P., *et al.* (1986). "Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides." Mol Cell Biol **6**(5): 1579-89.
- Hartmann, C., Benz, C., *et al.* (2007). "Small trypanosome RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2 influence expression of F-box protein mRNAs in bloodstream trypanosomes." Eukaryot Cell **6**(11): 1964-78.
- Hartmann, C. y Clayton, C. (2008). "Regulation of a transmembrane protein gene family by the small RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2." Mol Biochem Parasitol **157**(1): 112-5.
- Hendriks, E. F. y Matthews, K. R. (2005). "Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein." Mol Microbiol **57**(3): 706-16.
- Hendriks, E. F., Robinson, D. R., *et al.* (2001). "A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form." EMBO J **20**(23): 6700-11.
- Hoek, M., Zanders, T., *et al.* (2002). "*Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein." Mol Biochem Parasitol

- 120(2):** 269-83.
- Hook, B. A., Goldstrohm, A. C., *et al.* (2007). "Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA." J Biol Chem **282(21)**: 15430-8.
- Hotz, H. R., Hartmann, C., *et al.* (1997). "Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation." Nucleic Acids Res **25(15)**: 3017-26.
- Jackson, J. S., Jr., Houshmandi, S. S., *et al.* (2004). "Recruitment of the Puf3 protein to its mRNA target for regulation of mRNA decay in yeast." RNA **10(10)**: 1625-36.
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., *et al.* (2007). "Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline." Development **134(8)**: 1519-27.
- Keene, J. D. (2007). "RNA regulons: coordination of post-transcriptional events." Nat Rev Genet **8(7)**: 533-43.
- Kelly, J. M., Ward, H. M., *et al.* (1992). "A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*." Nucleic Acids Res **20(15)**: 3963-9.
- Kobayashi, S., Yamada, M., *et al.* (1996). "Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*." Nature **380(6576)**: 708-11.
- Koziol, U., Marin, M., *et al.* (2008). "Pumilio genes from the Platyhelminthes." Dev Genes Evol **218(1)**: 47-53.
- Kumar, S., Tamura, K., *et al.* (2004). "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment." Brief Bioinform **5(2)**: 150-63.
- Laufer, G. y 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(1)**: 55-65.
- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., *et al.* (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*." Genes Dev **7(6)**: 996-1007.
- Lee, J. Y., Lim, J. M., *et al.* (2008). "Identification and gene expression profiling of the Pum1 and Pum2 members of the Pumilio family in the chicken." Mol Reprod Dev **75(1)**: 184-90.
- Lee, M. G. y Van der Ploeg, L. H. (1997). "Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I." Annu Rev Microbiol **51**: 463-89.
- Lee, W. C. y Lee, K. H. (2004). "Applications of affinity chromatography in proteomics." Anal Biochem **324(1)**: 1-10.
- Liang, X. H., Haritan, A., *et al.* (2003). "trans and cis splicing in *trypanosomatids*: mechanism, factors, and regulation." Eukaryot Cell **2(5)**: 830-40.
- Liu, B., Liu, Y., *et al.* (2005). "Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA." Trends Parasitol **21(8)**: 363-9.
- Lukes, J., Hashimi, H., *et al.* (2005). "Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates." Curr Genet **48(5)**: 277-99.
- Lunde, B. M., Moore, C., *et al.* (2007). "RNA-binding proteins: modular design for efficient function." Nat Rev Mol Cell Biol **8(6)**: 479-90.
- Madison-Antenucci, S., Grams, J., *et al.* (2002). "Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing." Cell **108(4)**: 435-8.
- Mahmood, R., Hines, J. C., *et al.* (1999). "Identification of cis and trans elements involved in the cell cycle regulation of multiple genes in *Crithidia fasciculata*." Mol Cell Biol **19(9)**: 6174-82.
- Mahmood, R., Mitra, B., *et al.* (2001). "Characterization of the *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding proteins." Mol Cell Biol **21(14)**: 4453-9.
- Mair, G., Shi, H., *et al.* (2000). "A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA." RNA **6(2)**: 163-9.
- Manger, I. D. y Boothroyd, J. C. (1998). "Identification of a nuclear protein in *Trypanosoma brucei* with homology to RNA-binding proteins from cis-splicing

- systems." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 1-11.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., *et al.* (2003). "Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-1299.
- Matsushima, Y., Sugiura, R., *et al.* (2007). "Studies on Fungal Pumilio Gene Family through Mining Multiple Genome-Scale Data Sets." Kobe J Med Sci **53**(4): 163-9.
- Matthews, K. R., Tschudi, C., *et al.* (1994). "A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes." Genes Dev **8**(4): 491-501.
- Mayer, B. J., Jackson, P. K., *et al.* (1991). "The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(2): 627-31.
- Mayho, M., Fenn, K., *et al.* (2006). "Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements." Nucleic Acids Res **34**(18): 5312-24.
- McCarthy, J. E. (1998). "Posttranscriptional control of gene expression in yeast." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1492-553.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., *et al.* (2000). "The PSIPRED protein structure prediction server." Bioinformatics **16**: 404-405.
- Menon, K. P., Sanyal, S., *et al.* (2004). "The translational repressor Pumilio regulates presynaptic morphology and controls postsynaptic accumulation of translation factor eIF-4E." Neuron **44**(4): 663-76.
- Miller, J. y Staglijar, I. (2004). "Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins." Methods Mol Biol **261**: 247-62.
- Miller, M. T., Higgin, J. J., *et al.* (2008). "Basis of altered RNA-binding specificity by PUF proteins revealed by crystal structures of yeast Puf4p." Nat Struct Mol Biol.
- Morgenstern, B. (1999). "DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment." Bioinformatics **15**(3): 211-8.
- Morking, P. A., Dallagiovanna, B. M., *et al.* (2004). "TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 169-77.
- Muraro, N. I., Weston, A. J., *et al.* (2008). "Pumilio binds para mRNA and requires Nanos and Brat to regulate sodium current in *Drosophila* motoneurons." J Neurosci **28**(9): 2099-109.
- Myler, P. J., Audleman, L., *et al.* (1999). "*Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2902-6.
- Nicholas, K. y Nicholas, H. (1997). "GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments."
- Nolde, M. J., Saka, N., *et al.* (2007). "The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1." Dev Biol **305**(2): 551-63.
- Notredame, C., Higgins, D. G., *et al.* (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." J Mol Biol **302**(1): 205-17.
- Opperman, L., Hook, B., *et al.* (2005). "A single spacer nucleotide determines the specificities of two mRNA regulatory proteins." Nat Struct Mol Biol **12**(11): 945-51.
- Page, R. D. (1996). "TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers." Comput Appl Biosci **12**(4): 357-8.
- Palenchar, J. B. y Bellofatto, V. (2006). "Gene transcription in trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **146**(2): 135-41.
- Parisi, M. y Lin, H. (2000). "Translational repression: a duet of Nanos and Pumilio." Curr Biol **10**(2): R81-3.

- Paterou, A., Walrad, P., *et al.* (2006). "Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development." *J Biol Chem* **281**(51): 39002-13.
- Perez-Diaz, L., Duhagon, M. A., *et al.* (2007). "*Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of an RNA binding protein differentially expressed in the parasite life cycle." *Exp Parasitol* **117**(1): 99-105.
- Portal, D., Espinosa, J. M., *et al.* (2003). "An early ancestor in the evolution of splicing: a *Trypanosoma cruzi* serine-arginine-rich protein (TcSR) is functional in cis-splicing." *Mol Biochem Parasitol* **127**(1): 37-46.
- Portal, D., Lobo, G. S., *et al.* (2003). "*Trypanosoma cruzi* TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases." *Mol Biochem Parasitol* **127**(1): 9-21.
- Puig, O., Caspary, F., *et al.* (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." *Methods* **24**(3): 218-29.
- Ratner, D. (1974). "The interaction bacterial and phage proteins with immobilized *Escherichia coli* RNA polymerase." *J Mol Biol* **88**(2): 373-83.
- Rice, P., Longden, I., *et al.* (2000). "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite." *Trends Genet* **16**(6): 276-7.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., *et al.* (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nat Biotechnol* **17**(10): 1030-2.
- Robello, C., Navarro, P., *et al.* (1997). "A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*." *Mol Biochem Parasitol* **90**(2): 525-35.
- Robles, A. y Clayton, C. (2008). "Regulation of an amino acid transporter mRNA in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **157**(1): 102-6.
- Rochette, A., McNicoll, F., *et al.* (2005). "Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp." *Mol Biochem Parasitol* **140**(2): 205-20.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. (2003). "MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models." *Bioinformatics* **19**(12): 1572-4.
- Ruan, J. P., Arhin, G. K., *et al.* (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**(21): 9610-8.
- Saas, J., Ziegelbauer, K., *et al.* (2000). "A developmentally regulated aconitase related to iron-regulatory protein-1 is localized in the cytoplasm and in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **275**(4): 2745-55.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., *et al.* (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schimanski, B., Klumpp, B., *et al.* (2003). "The second largest subunit of *Trypanosoma brucei*'s multifunctional RNA polymerase I has a unique N-terminal extension domain." *Mol Biochem Parasitol* **126**(2): 193-200.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N., *et al.* (2005). "Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination." *Eukaryot Cell* **4**(11): 1942-50.
- Schwede, A., Ellis, L., *et al.* (2008). "A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells." *Nucleic Acids Res* **36**(10): 3374-88.
- Shaw, J. M., Feagin, J. E., *et al.* (1988). "Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons." *Cell* **53**(3): 401-11.
- Smith, D. F. y Parsons, M. (1996). *Molecular biology of parasitic protozoa*. Oxford ; New York, IRL Press at Oxford University Press.
- Sonoda, J. y Wharton, R. P. (1999). "Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio." *Genes Dev* **13**(20): 2704-12.
- Sonoda, J. y Wharton, R. P. (2001). "*Drosophila* Brain Tumor is a translational

- repressor." Genes Dev **15**(6): 762-73.
- Spassov, D. S. y Jurecic, R. (2003). "The PUF family of RNA-binding proteins: does evolutionarily conserved structure equal conserved function?" IUBMB Life **55**(7): 359-66.
- Stewart, M. S., Krause, S. A., *et al.* (2007). "Mpt5p, a stress tolerance- and lifespan-promoting PUF protein in *Saccharomyces cerevisiae*, acts upstream of the cell wall integrity pathway." Eukaryot Cell **6**(2): 262-70.
- Stuart, K. D., Schnauffer, A., *et al.* (2005). "Complex management: RNA editing in trypanosomes." Trends Biochem Sci **30**(2): 97-105.
- Teixeira, S. M. (1998). "Control of gene expression in *Trypanosomatidae*." Braz J Med Biol Res **31**(12): 1503-16.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., *et al.* (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.
- Thomson, E., Rappsilber, J., *et al.* (2007). "Nop9 is an RNA binding protein present in pre-40S ribosomes and required for 18S rRNA synthesis in yeast." RNA **13**(12): 2165-74.
- Tschudi, C. y Ullut, E. (2002). "Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in *trypanosomatids*." Gene Expr **10**(1-2): 3-16.
- Tucker, M., Staples, R. R., *et al.* (2002). "Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **21**(6): 1427-36.
- Tyler, K. M. y Engman, D. M. (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." Int J Parasitol **31**(5-6): 472-81.
- Ulbricht, R. J. y Olivás, W. M. (2008). "Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability." RNA **14**(2): 246-62.
- Vanhamme, L. y Pays, E. (1995). "Control of gene expression in trypanosomes." Microbiol Rev **59**(2): 223-40.
- Vassella, E., Den Abbeele, J. V., *et al.* (2000). "A major surface glycoprotein of *trypanosoma brucei* is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia." Genes Dev **14**(5): 615-26.
- Vazquez, M., Atorrasagasti, C., *et al.* (2003). "Unique features of the *Trypanosoma cruzi* U2AF35 splicing factor." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 77-81.
- Walgraffe, D., Devaux, S., *et al.* (2005). "Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **139**(2): 249-60.
- Wang, X., McLachlan, J., *et al.* (2002). "Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain." Cell **110**(4): 501-12.
- Wang, X., Zamore, P. D., *et al.* (2001). "Crystal structure of a Pumilio homology domain." Mol Cell **7**(4): 855-65.
- Webb, H., Burns, R., *et al.* (2005). "Developmentally regulated instability of the GPI-PLC mRNA is dependent on a short-lived protein factor." Nucleic Acids Res **33**(5): 1503-12.
- Webb, H., Burns, R., *et al.* (2005). "A novel strategy to identify the location of necessary and sufficient cis-acting regulatory mRNA elements in trypanosomes." RNA **11**(7): 1108-16.
- Wen, L. M., Xu, P., *et al.* (2000). "PPB1, a putative spliced leader RNA gene transcription factor in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **110**(2): 207-21.
- Wharton, R. P. y Aggarwal, A. K. (2006). "mRNA regulation by Puf domain proteins." Sci STKE **2006**(354): pe37.
- Wharton, R. P., Sonoda, J., *et al.* (1998). "The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator." Mol Cell **1**(6): 863-72.

-
- WHO (1998). "Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee." World Health Organ Tech Rep Ser **881**: I-VI, 1-114.
- WHO (2002). "Control of Chagas disease." World Health Organ Tech Rep Ser **905**: i-vi, 1-109, back cover.
- Wickens, M., Bernstein, D. S., *et al.* (2002). "A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life." Trends Genet **18**(3): 150-7.
- Worthey, E. A., Martinez-Calvillo, S., *et al.* (2003). "Leishmania major chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene." Nucleic Acids Res **31**(14): 4201-4210.
- Wreden, C., Verrotti, A. C., *et al.* (1997). "Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA." Development **124**(15): 3015-23.
- Wu, Y., El Fakhry, Y., *et al.* (2000). "A new developmentally regulated gene family in Leishmania amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins." Mol Biochem Parasitol **110**(2): 345-57.
- Xu, P., Wen, L., *et al.* (2001). "Identification of a spliced leader RNA binding protein from *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **112**(1): 39-49.
- Ye, B., Petritsch, C., *et al.* (2004). "Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in Drosophila peripheral neurons." Curr Biol **14**(4): 314-21.
- Zamore, P. D., Williamson, J. R., *et al.* (1997). "The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins." RNA **3**(12): 1421-33.
- Zhang, B., Gallegos, M., *et al.* (1997). "A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line." Nature **390**(6659): 477-84.
- Zhang, X. F., Settleman, J., *et al.* (1993). "Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1." Nature **364**(6435): 308-13.

Agradecimientos

A Verónica por estar siempre conmigo con todo lo que eso implica.

Al resto de mi familia que siempre me ha apoyado sin siquiera saber para que servía pasar tantas horas en facultad

A Beatriz quien ha posibilitado que disfrute de todos los momentos en el laboratorio al cual me abrió las puertas. Por guiarme en todos los pasos de la realización de este trabajo y por su compromiso con mi formación. Por sus consejos y ayuda en los momentos difíciles.

A Bruno por sus grandes aportes al desarrollo de este trabajo y por su manera de dar ánimo en todas las circunstancias.

A todos los integrantes del LIM con quienes tengo el placer de trabajar, por el compañerismo que se siente en el día a día y por todas las veces que me sacaron las papas del fuego.

A los compañeros de genética por ayudarme durante estos años con la difícil tarea de trabajar en dos lugares físicos separados una hora en el 370.

A los compañeros de la sección bioquímica por el tiempo compartido estos años.

A toda la gente que pude conocer en Curitiba y Rosario que hicieron que las pasantías en estas ciudades valieran la pena por encima de lo académico.

A los miembros del tribunal que accedieron a leer y comentar este trabajo.