

Actividad RT-like en el elemento móvil L1Tc

Reverse transcriptase-like activity in the mobile element L1tc

GONZÁLEZ, C. I.; THOMAS, M.^a C.; MARTÍN, F. y LÓPEZ, M. C.

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. CSIC. Ventanilla 11. Granada.

RESUMEN

Mediante el uso de homopolímeros sintéticos e inhibidores específicos se ha demostrado la presencia de una actividad RT-like en *Trypanosoma cruzi*, parásito responsable de la enfermedad de Chagas. Además se ha mostrado que éste parásito presenta en su genoma un elemento móvil del tipo no-LTR, denominado L1Tc. La proteína recombinante obtenida a partir del ORF2 del referido elemento muestra actividad transcriptasa inversa. Esta actividad enzimática codificada por el elemento L1Tc, unida al hecho de que L1Tc fuese aislado a partir de un mensajero, evidencia que el mismo es funcional como elemento móvil por retrotransposición.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*. Polimerasa ARN-dependiente. Homopolímeros ARN. Inhibidores RT.

ABSTRACT

By using synthetic homopolymers and specific inhibitors the presence of a RT-like activity was revealed to be present in *Trypanosoma cruzi*, the parasite responsible for the Chagas' disease. We show, moreover, that this parasite has in its genome a non-LTR type mobile element, denominated L1Tc, and that the recombinant protein obtained from translation of the ORF2 of this element exhibits retretranscriptase activity. The presence of a RT-like activity in the nuclear fraction of the parasite, the fact that the L1Tc element was isolated as a cDNA and that the ORF2 derived protein has RT-like activity strongly suggest that L1Tc may well be responsible for the detected nuclear RT-like activity and that it functions as an active mobile element for retrotransposition.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. RNA-dependent polymerase. RNA homopolymers. RT-like inhibitors.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 221-227]

INTRODUCCIÓN

Usualmente, el genoma es visto como algo estático que cambia muy lentamente a lo largo de la evolución, la recombinación permite el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos generando nuevas combinaciones de alelos. Esta estabilidad se puede ver en la retención de ligamiento que se conserva aún después de procesos de especiación, como ocurre en el caso del hombre y el mono. La diferencia en tiempos de generación entre procariotas y eucariotas hace que la escala evolutiva también sea diferente en términos de tiempo real, pero aún así, los cambios en los procariotas se dan muy lentamente; ejemplo de ello, es la similitud del mapa genético entre dos especies bacterianas diferentes como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Contrastando con ésta estabilidad global hay diferencias significativas a nivel molecular entre individuos, éstas son dadas por diversos mecanismos y uno de ellos es la presencia de elementos móviles. Estos elementos son áreas del genoma que tienen la capacidad de moverse directamente de un sitio a otro, codificando la mayoría de ellos las proteínas necesarias para su propia transposición.

La primera descripción de elementos móviles de ADN fue hecha por Bárbara MacClintock en 1951 cuando estudiaba la distribución de la pigmentación en el maíz, desde ese momento se han descrito numerosos transposones tanto en procariotas como en eucariotas. Estos elementos, en general, se pueden dividir en dos grandes grupos, aquellos que existen como secuencias de ADN y se transponen en el genoma y los que hacen copias de ADN a partir de sus transcritos de ARN que son los llamados retrotransposones. De acuerdo a su estructura, éstos últimos a su vez se han clasificado en dos grupos: los LTR (Long Terminal Repeat) y los no-LTR. Los LTR son tipo retrovirus con largas repeticiones directas en los extremos, las cuales son las encargadas de regular la transposición y los no-LTR que están flanqueados por secuencias directas de tamaño pequeño (1). Este grupo incluye las secuencias SINE (Short Interspersed Nucleotide Elements) y las LINE (Long Interspersed Nucleotide Elements) ó L1; las SINE tienen tamaños menores de 1 kilobase, se repiten más de 10^5 veces en el genoma y se encuentran dispersas en él. Se han encontrado en regiones intergénicas, en intrones y en el ADN satélite, se sabe que tienen un promotor interno funcional en su extremo 5', una cola de poliA en 3' y duplicaciones en los sitios de inserción. Prototipo de éstas secuencias son las Alu de primates y las B1 de roedores. Las LINE ó L1 comprenden los elementos mayores de 5 kilobases de longitud, están presentes en un número de copias mayor de 10^4 por genoma y tienen características similares con las SINE en cuanto a promotor, poli A y repeticiones. Algunas de las primeras en ser descritas fueron KpnI de primates y MIF de roedores, pero cuando se estudiaron más en detalle se vio que pertenecían a una misma

familia que estaba presente en mamíferos, a la que se llamó LINE ó L1 (2). Para unificar la nomenclatura se propuso una terminación de dos letras especificando el origen del elemento e indicando así el género y la especie. En nuestro laboratorio se ha descrito un elemento móvil perteneciente al grupo de los no-LTR LINE, dicho elemento está presente en el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas y se denominó L1Tc (3). Este tipo de elementos han sido descritos en organismos tan distantes en la escala evolutiva como protozoos, insectos, levaduras, hongos, aves, plantas, anfibios y moluscos (4).

Respecto a la importancia biológica de estos elementos ha habido mucha controversia; para algunos investigadores es un ADN egoísta que codifica las proteínas implicadas en su propia transposición. Sin embargo, cada vez hay más evidencias y consenso de que representan una ruta dinámica en el proceso evolutivo. Las dos características principales de éstos elementos son: su alta representatividad en el genoma y su capacidad de transponerse. Respecto a la primera, pueden participar en procesos de reordenamiento del genoma, como por ejemplo, translocaciones e inserciones; también pueden participar en el apareamiento de cromosomas homólogos. A nivel de replicación de ADN pueden estar actuando como cebadores, de hecho hay una correlación directa entre número de orígenes de replicación y el número de repeticiones de una familia determinada. Por su característica de elemento móvil pueden participar en procesos de especiación. Se cree que son los responsables de la gran mayoría de los seudogenes y genes sin intrones, por lo tanto, son responsables indirectos de un mecanismo de diversidad genética inmenso, habiéndose descrito casos de nuevos genes con éste origen, como el gen de la insulina I de rata (5), o el gen de la fosfoglicerato kinasa (6). Además, pueden llevar nuevos elementos reguladores a genes existentes, por ejemplo, actuando como enhancers o inactivando o modificando un promotor. También pueden actuar a nivel post-transcripcional introduciendo nuevos sitios de poliadenilación, como es el caso del gen de la timidilato sintasa de ratón (7). Además tienen un papel muy importante como potenciales mutágenos. Se han detectado varias enfermedades en humanos como resultado de una inserción de un elemento LINE en un gen determinado sin que estuviera presente en los progenitores, tal como ocurre con el gen del factor VIII de la coagulación en pacientes hemofílicos tipo A (8). En carcinoma humano de mama está ligado a una reorganización específica que se ha encontrado en el tumor maligno pero que no ha podido ser descubierta en los tejidos peritumorales sanos (9). Usando anticuerpos frente a una proteína codificada por el ORF1 del L1 de humanos, se ha detectado su presencia en 5% de tumores ováricos, 30% de tumores extragonales (10) y en el 10% de cánceres de célula germinal de testículo (11), también se ha comprobado que la proteína manifiesta variables niveles de expresión en tumores metastásicos. Por ello, se postula que las

mutaciones originadas por la inserción del elemento L1 pueden jugar un papel importante en la iniciación o en el devenir de algunos procesos neoplásicos.

Respecto al origen evolutivo y organización genómica de éstos elementos, Xiong y Eickbush sugieren que los retroelementos descienden de un ancestro común y comparten 2 marcos de lectura abiertos, el primero codifica para una proteína de unión a ácidos nucleicos y el segundo codifica para una ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa inversa (RT) (4). Dentro de los retroelementos los no-LTR parecen ser los más antiguos evolutivamente, seguidos de los LTR y los retrovirus. Al hacer un análisis comparativo de éstos elementos, observamos que el L1Tc presenta algunas diferencias con respecto a los otros retrotransposones no-LTR descritos, como es el hecho de codificar en el ORF1 para una nucleasa y los genes *gag* estar presentes en el ORF3 (3). La presencia de la transcriptasa inversa define a los retroelementos y ésta enzima fue descrita simultáneamente por Baltimore y Temin en 1970, como una enzima retroviral que cataliza la replicación de ADN a partir de un molde de ARN(12), desde entonces se han descrito secuencias que codifican para proteínas similares en virus ADN como hepadnavirus, caulimovirus, elementos transposones tipo LTR y no-LTR. En 1981 Doolittle y colaboradores (13) compararon el dominio RT de 31 transposones de orígenes muy diversos y basados en la estructura y organización los dividieron en 4 grupos: retrovirus, LTR, grupo Ty-copia, gypsi y no-LTR. Posteriormente Xiong y Eickbush estudiando 82 retroelementos identificaron 7 dominios que se conservan a lo largo de 180 aminoácidos, al dominio invariable lo denominaron caja YXDD y al hacer una comparación de retrovirus, LTR, no-LTR y el L1Tc se observa la conservación no sólo del dominio YXDD sino de los otros 7 dominios (3). Dado que la presencia de la actividad transcriptasa inversa define la actividad del retroelemento y ya que muchos de ellos, a pesar de la homología en secuencia pueden ser defectivos, en nuestro laboratorio se decidió analizar su presencia en el elemento L1Tc.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la determinación de la actividad RT en L1Tc se hicieron dos abordajes, el primero más general consistió en estudiar dicha actividad en homogenizados de *Trypanosoma cruzi* y el segundo en clonar el ORF2 del L1Tc, expresar y purificar la enzima y analizar su actividad. Para lograr el primer objetivo se trabajó con un lisado total de parásitos y se utilizó la prueba de rutina empleada en la detección de actividad RT en retrovirus especialmente HIV. Esta técnica usa como molde un homopolímero de ribonucleótidos al cual se halla unido un oligo de deoxinucleótidos de 12-18 nucleótidos de longitud que actúa como cebador suministrando el extremo 3'OH necesario para la

elongación, a la muestra problema se le adiciona el deoxinucleótido trifosfato (dNTP) marcado con ^{32}P o ^3H y la enzima a probar obteniendo como resultado un híbrido ADN-ARN que será detectado mediante placa radiográfica. El producto puede ser precipitado para eliminar el dNTP marcado libre o se puede recoger en un filtro que se lava y se expone para la cuantificación de la radiactividad.

Es importante resaltar que entre las RTs hay diferencias en cuanto al molde que prefieren, ya que son capaces de usar tanto moldes de ADN como de ARN, por ello usamos en nuestros análisis homopolímeros poli(rA), poli(dA), poli(rC) y poli(dC). El comportamiento observado de la RT de *Trypanosoma cruzi* es similar al de la enzima control (RT de retrovirus de leucemia murina), prefiriendo el homopolímero de ribonucleótidos poli(rA)/oligo(dT) sobre el de deoxinucleótidos poli(dA)/oligo(dT), sin embargo prefiere el de deoxinucleótidos poli(dC)/oligo(dG) sobre poli(rC)/oligo(dG) (14). Por otra parte, muestra preferencia por el molde poli(rCm)/oligo(dG) que es un ribonucleótido modificado, descrito como específico de las RTs (15). Su localización a nivel celular es mayoritariamente en núcleo, en una proporción 7:1, aunque también se detecta a nivel citoplasmático. Se han visto claras diferencias en las condiciones del ensayo en cuanto al requerimiento iónico de las diferentes enzimas, a éste respecto utiliza preferencialmente Mg en concentración de 20 mM (14). Para descartar que la actividad detectada fuera debida a la presencia de una ADN polimerasa contaminante, ya que han sido descritas algunas capaces de usar como molde homopolímeros de ribonucleótidos, se usó afidicolina, el inhibidor clásico de las ADN polimerasas, no afectándose la actividad polimerasa detectada en *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, cuando usamos actinomicina D como droga, la cual ha sido descrita como inhibidora de la actividad polimerasa ADN dependiente de la transcriptasa inversa, observamos que inhibe considerablemente la actividad detectada con el homopolímero poli(dC)/oligo(dG). Además se emplearon inhibidores específicos de las RTs, como el AZT un análogo nucleosídico usado en el tratamiento contra el SIDA por inhibir la actividad RT del virus (16). La actividad detectada en el lisado de *Trypanosoma cruzi* es inhibida al igual que la enzima control, aunque necesita concentraciones superiores en un orden de magnitud. El uso de otras sustancias identificadas como inhibidores de diferentes RTs, como el caso de la novobiocina que inhibe a la transcriptasa reversa del retroelemento jockey de *Drosophila* y la rifamicina que además de la RT del elemento jockey, inhibe RTs de virus de aves (17), muestran un comportamiento similar sobre la actividad RT de *Trypanosoma cruzi* que sobre la enzima control. Para conocer la longitud del híbrido sintetizado por la RT de *Trypanosoma cruzi*, se precipitó el producto de la reacción y se sometió a análisis de secuencia observándose que la longitud alcanzada fue de aproximadamente 110 nucleótidos (14).

Con el fin de expresar la proteína codificada por el ORF2 del elemento L1Tc, la secuencia completa del referido ORF2 fue clonada, en un vector de expresión llamado pTrCHis (Qiagen) cuya característica principal es que tras el ATG de iniciación tiene insertada una secuencia que codifica para 6 histidinas, que funcionan como dominio de unión a metal y permiten la purificación de la proteína de fusión mediante columnas de afinidad. La inducción de la proteína recombinante se hizo con IPTG y se comprobó mediante Western blot usando un anticuerpo policlonal producido en conejos, frente a un péptido que mapea en la región aminoterminal de la proteína codificada por el ORF2 del L1Tc. La purificación de la proteína recombinante se hizo usando una resina de nitrilo tri-ácido acético (NTA), ligando que tiene cuatro sitios quelantes que pueden interactuar con iones metálicos, en éste caso níquel; el NTA ocupa 4 de los 6 sitios de unión a níquel dejando los otros dos para que interactúen con las histidinas. Para la elución de la proteína en su forma nativa usamos el imidazol el cual compite con la histidina por la unión a metal. Como control, en paralelo se purificó bacteria con plásmido sin inserto y se determinó la actividad de las fracciones donde eluía la proteína, así se observó actividad RT en las fracciones que eluían a 150 mM de imidazol en las bacterias transformadas con el vector recombinante y no en las transformadas con el plásmido vector sin clonar. Con esta proteína purificada se hicieron ensayos con diferentes condiciones de buffer obteniéndose una mejor actividad a 2mM de Mg, 1 mM de Mn y 80 mM de KCl. El análisis con diferentes inhibidores específicos mostró resultados similares a los descritos para la actividad detectada en el lisado total de *Trypanosoma cruzi*, permitiéndonos concluir que la polimerasa codificada en el ORF2 del L1Tc es una enzima RT-like dependiente de ARN y ADN. Estos resultados presentan una cierta relevancia, dado que según lo publicado por Gabriel (18), la presencia de actividad RT en un elemento no-LTR le confiere funcionalidad al menos en lo que a movilidad por retrotransposición se refiere. Por otra parte, es posible que la actividad detectada en la fracción nuclear del lisado del cultivo de parásito, sea en parte debida a la propia del retroelemento L1Tc. La actividad móvil de un elemento no-LTR puede tener múltiples implicaciones en la biología del organismo en el que está presente, tal como ya mencionamos anteriormente en el apartado de introducción. En *Trypanosoma cruzi* además, puede representar un importante mecanismo de diversidad y de control genético, implicándose en el mecanismo de adaptación del parásito al hospedador.

Con el fin de expresar la proteína codificada por el ORF2 del elemento L1Tc, la secuencia completa del referido ORF2 fue clonada, en un vector de expresión llamado pTrCHis (Qiagen) cuya característica principal es que tras el ATG de iniciación tiene insertada una secuencia que codifica para 6 histidinas, que funcionan como dominio de unión a metal y permiten la purificación de la proteína de fusión mediante columnas de afinidad. La inducción de la proteína recombinante se hizo con IPTG y se comprobó mediante Western blot usando un anticuerpo policlonal producido en conejos, frente a un péptido que mapea en la región aminoterminal de la proteína codificada por el ORF2 del L1Tc. La purificación de la proteína recombinante se hizo usando una resina de nitrilo tri-ácido acético (NTA), ligando que tiene cuatro sitios quelantes que pueden interactuar con iones metálicos, en éste caso níquel; el NTA ocupa 4 de los 6 sitios de unión a níquel dejando los otros dos para que interactúen con las histidinas. Para la elución de la proteína en su forma nativa usamos el imidazol el cual compite con la histidina por la unión a metal. Como control, en paralelo se purificó bacteria con plásmido sin inserto y se determinó la actividad de las fracciones donde eluía la proteína, así se observó actividad RT en las fracciones que eluían a 150 mM de imidazol en las bacterias transformadas con el vector recombinante y no en las transformadas con el plásmido vector sin clonar. Con esta proteína purificada se hicieron ensayos con diferentes condiciones de buffer obteniéndose una mejor actividad a 2mM de Mg, 1 mM de Mn y 80 mM de KCl. El análisis con diferentes inhibidores específicos mostró resultados similares a los descritos para la actividad detectada en el lisado total de *Trypanosoma cruzi*, permitiéndonos concluir que la polimerasa codificada en el ORF2 del L1Tc es una enzima RT-like dependiente de ARN y ADN. Estos resultados presentan una cierta relevancia, dado que según lo publicado por Gabriel (18), la presencia de actividad RT en un elemento no-LTR le confiere funcionalidad al menos en lo que a movilidad por retrotransposición se refiere. Por otra parte, es posible que la actividad detectada en la fracción nuclear del lisado del cultivo de parásito, sea en parte debida a la propia del retroelemento L1Tc. La actividad móvil de un elemento no-LTR puede tener múltiples implicaciones en la biología del organismo en el que está presente, tal como ya mencionamos anteriormente en el apartado de introducción. En *Trypanosoma cruzi* además, puede representar un importante mecanismo de diversidad y de control genético, implicándose en el mecanismo de adaptación del parásito al hospedador.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por BIO93-0043 del Plan Nacional I + D (CICYT). C.I.G. es financiada por beca predoctoral MUTIS-ICI y Universidad Industrial de Santander-Colombia. Drs M.C.T. y F.M. fueron financiados por becas PAI y CICYT respectivamente. Agradecemos a la Fundación Wellcome por suministrar el AZT trifosfato (356U84).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HUTCHINSON, C. A., HARDIES, S. C., LOEB, D. D., SHEHEE, W. R., EDGELL, W. H.: *In mobile DNA* (1989), 593-617. (Berg, D. E. & Howe, M. M., eds). *Am Soc Microbiol*, Washington, DC, USA.
- (2) BURTON, F. H., LOEB, D. D., VOLIVA, C. F., MARTÍN, S. L., EDGELL, M. H., HUTCHINSON, C. A.: *J Mol Biol* (1986), **187**:291-304.
- (3) MARTÍN, F., MARAÑÓN, C., OLIVARES, M., ALONSO, C., LÓPEZ, M. C.: *J Mol Biol* (1995), **247**:49-50.
- (4) XIONG, Y., EICKBUSH, T. H.: *The EMBO J* (1990), **9(10)**:3353-3362.
- (5) WEINER, A. M., DEININGER, P. L., EFISTRATIADIS, A.: *Annu Rev Biochem* (1986), **55**:631-661.
- (6) BOER, P. H., ADRA, C. N., LAU, Y. F., MCBURNEY, M. W.: *Mol Cell Biol* (1987), **7**:3107-3113.
- (7) HARENDZA, C. J., JOHNSON, F. L.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1990), **87**:2531-2535.
- (8) KAZAZIAN, H. H. JR., WONG, C., YOUSOUFIAN, H., SCOTT, A. F., PHILLIPS, D. G., ANTONARAKIS, S. E.: *Nature* (1988), **332**:164-166.
- (9) MORSE, B., ROTHERG, P. G., SOUTH, V. J., SPANDORFER, J. M., ASTRIN, S. M.: *Nature*.(1988). **333**:87-90.
- (10) BRATTHAUER, G. L., FANNING, T. G.: *Cancer* (1993), **71**:2383-2386.
- (11) BRATTHAUER, G. L., FANNING, T. G.: *Oncogene* (1992), **7**:507-510.
- (12) KATZ, R. A., SKALKA, A. M.: *Annu Rev Biochem* (1994), **63**:133-173.
- (13) DOOLITTLE, R.: *Science* (1981), **214**:149-159.
- (14) GONZÁLEZ, C. Y., THOMAS, M. C., MARTÍN, F., ALCAMI, J., ALONSO, C., LÓPEZ, M. C.: *Acta Tropica* (1997), en prensa.
- (15) GERARD, G. F., ROTTMAN, F., GREEN, M.: *Biochemistry* (1974), **13**:1632-1640.
- (16) REARDON, J. E., MILLER, W. H. J.: *Biol Chem* (1990), **265**:20302-20307.
- (17) IVANOV, V.A., MELNIKOV, A. A., SIUNOV, A. V., FODOR, Y. Y., ILYIN, Y. V.: *The EMBO J* (1991), **10**:2489-2495.
- (18) GABRIEL, A., BOEKE, J. D.: *Reverse Transcriptase* (1993), 275-327. Cold Spring Harbor Laboratory Press.