

~~J. Brown 22/40~~

+ 10/43

T. Prov. 22/40

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE PARASITOLOGIA Y BIOMEDICINA
"LOPEZ-NEYRA" C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 3-7-98
ENTRADA NUM. 2235

**ANALISIS FUNCIONAL DE UN ELEMENTO NO
LTR RETROTANSPONON DE
Trypanosoma cruzi: L1Tc**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 61337715X
N.º Copia 16348278

Director de Tesis:
Dr. Manuel Carlos López López

Clara Isabel González Rugeles
Memoria presentada por la Licenciada
CLARA ISABEL GONZALEZ RUGELES
Para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas

Granada, Junio de 1998

UNIVERSIDAD DE GRANADA
25 JUN. 1998
COMISION DE DOCTORADO

1. INTRODUCCION

- 1.1. Elementos móviles o elementos transponibles (ETs)
- 1.2. Evidencia de transposición e importancia biológica
 - 1.2.1. Elementos transponibles como parásitos genómicos
 - 1.2.2. Coadaptación para disminuir los efectos deletéreos del hospedador
 - 1.2.2.1. Inserción en zonas no codificantes
 - 1.2.2.2. Inserción en elementos preexistentes
 - 1.2.2.3. Procesamiento de los transcritos de pre-ARNm
 - 1.2.2.4. Especificidad de tejidos
 - 1.2.2.5. Regulación del número de copias de ET por parte del hospedador
 - 1.2.2.6. Regulación del número de copias por parte del mismo ET
 - 1.2.2.7. Regulación en la expresión de los fenotipos mutantes
 - 1.2.3. Caracteres inducidos por ET con efecto benéfico sobre el hospedador
 - 1.2.3.1. Inserciones con funciones reguladoras
 - 1.2.3.2. Nuevos patrones de expresión en tejidos específicos
 - 1.2.3.3. Como mecanismo reparador del ADN
 - 1.2.3.4. Actuar como telómeros
- 1.3. Mecanismos de integración
- 1.4. *Trypanosoma cruzi*
 - 1.4.1. Generalidades
 - 1.4.2. Patogenia
 - 1.4.3. Filogenia
 - 1.4.4. Aspectos moleculares
 - 1.4.5. Cariotipo y tamaño molecular
 - 1.4.6. Estructura genética de las poblaciones de *T. cruzi*
 - 1.4.7. Transcripción policistrónica
 - 1.4.8. Edición del ARNm
 - 1.4.9. Regulación de la expresión génica
- 1.5. Elementos móviles en tripanosomátidos

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

- 3.1.1. Productos químicos
- 3.1.2. Medios de cultivo
- 3.1.3. Tampones
- 3.1.4. Soluciones
- 3.1.5. Patrones de peso molecular
 - 3.1.5.1. Geles de ADN
 - 3.1.5.2. Geles de ARN
 - 3.1.5.3. Geles de proteínas
- 3.1.6. Parásitos
- 3.1.7. Cepas bacterianas
- 3.1.8. Vectores de transformación
- 3.1.9. Péptidos

3.2. Métodos

- 3.2.1. Cultivos "in vitro" de *Trypanosoma cruzi*
 - 3.2.1.1. Cultivo de formas epimastigotas
 - 3.2.1.2. Cultivo de formas tripomastigotas y amastigotas
- 3.2.2. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos
 - 3.2.2.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico
 - 3.2.2.2. Aislamiento y purificación de ADN de plásmidos
 - 3.2.2.3. Aislamiento y purificación de ARN
- 3.2.3. Separación de ácidos nucleicos según su tamaño
 - 3.2.3.1. Separación y visualización de moléculas de ADN
 - 3.2.3.2. Separación y visualización de moléculas de ARN
- 3.2.4. Análisis de ácidos nucleicos
 - 3.2.4.1. Inmovilización de ácidos nucleicos
 - 3.2.4.1.1. Transferencia e inmovilización de ADN a soportes sólidos, "Southern-blot"
 - 3.2.4.1.2. Transferencia e inmovilización de ARN a soportes sólidos, "Northern-blot"
 - 3.2.4.2. Marcaje de fragmentos de ADN con isótopos radiactivos
 - 3.2.4.2.1. Marcaje de ADN de cadena doble

- 3.2.4.2.2. Marcaje de ADN de cadena simple
- 3.2.4.2.3. Marcaje de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa
- 3.2.4.3. Detección de secuencias específicas sobre soportes sólidos
 - 3.2.4.3.1. Con sondas de ADN de cadena doble
 - 3.2.4.3.2. Con oligonucleótidos
- 3.2.5. Clonaje de fragmentos de ADN
 - 3.2.5.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción
 - 3.2.5.2. Elución de ADN de geles de agarosa
 - 3.2.5.3. Defosforilación de los extremos 5'
 - 3.2.5.4. Rellenado de los extremos 5' protuberantes
 - 3.2.5.5. Fosforilación de los extremos 5'-OH
 - 3.2.5.6. Ligación de fragmentos de ADN
- 3.2.6. Transformación con los plásmidos recombinantes
 - 3.2.6.1. Transformación por choque térmico
 - 3.2.6.2. Transformación por electroporación
- 3.2.7. Selección de las colonias recombinantes
- 3.2.8. Secuenciación de ácidos nucleicos
- 3.2.9. Mutagénesis dirigida
- 3.2.10. Obtención de proteínas recombinantes
 - 3.2.10.1. Clonaje
 - 3.2.10.2. Expresión
 - 3.2.10.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida
 - 3.2.10.2.2. Inmovilización de proteínas "Western-blot"
 - 3.2.10.2.3. Obtención de anticuerpos policlonales
 - 3.2.10.3. Purificación de las proteínas recombinantes
 - 3.2.10.3.1. Extracción de la proteína soluble
 - 3.2.10.3.2. Extracción de los cuerpos de inclusión
 - 3.2.10.3.3. Purificación de la proteína en columna de níquel
- 3.2.11. Determinación de la actividad transcriptasa inversa
 - 3.2.11.1. Homopolímeros sintéticos
 - 3.2.11.2. RT-PCR
- 3.2.12. Determinación de la actividad ARNasa H
 - 3.2.12.1. Homopolímeros sintéticos
 - 3.2.12.2. Ensayo de complementación
- 3.2.13. Análisis por ordenador

- 3.2.13.1. Búsqueda de homologías en las bases de datos
- 3.2.13.2. Análisis de las homologías encontradas
- 3.2.13.3. Búsqueda de motivos conservados entre diferentes secuencias
- 3.2.13.4. Análisis filogenético

4. RESULTADOS

- 4.1. Determinación de la actividad transcriptasa inversa en *Trypanosoma cruzi*
- 4.2. Características de la actividad RT de *Trypanosoma cruzi*
- 4.3. Clonaje de la transcriptasa inversa-ARNasa H de L1Tc
- 4.4. Expresión de la proteína recombinante transcriptasa inversa-ARNasa H de L1Tc
- 4.5. Purificación de la proteína recombinante transcriptasa inversa-ARNasa H de L1Tc
- 4.6. Clonaje de la transcriptasa inversa de L1Tc
- 4.7. Expresión y purificación de la proteína recombinante transcriptasa inversa de L1Tc
- 4.8. Actividad transcriptasa inversa de la proteína recombinante L1TcRTRN
 - 4.8.1. Homopolímeros sintéticos
 - 4.8.2. RT-PCR
- 4.9. Mutagénesis dirigida de la proteína recombinante L1TcRTRN
- 4.10. Expresión y purificación de los mutantes transcriptasa inversa
- 4.11. Determinación de actividad transcriptasa inversa de los mutantes
- 4.12. Otras actividades asociadas a la transcriptasa inversa
- 4.13. Clonaje de la ARNasa H de L1Tc
- 4.14. Expresión y purificación de la proteína recombinante ARNasa H de L1Tc
- 4.15. Determinación de actividad ARNasa H de la proteína recombinante L1TcRN
 - 4.15.1. Homopolímeros
 - 4.15.2. Ensayo de complementación
- 4.16. Mutagénesis dirigida de la proteína recombinante ARNasa H de L1Tc
- 4.17. Expresión y purificación de los mutantes ARNasa H de L1Tc
- 4.18. Determinación de la actividad ARNasa H de los mutantes
- 4.19. Redefinición del ORF2 de L1Tc
- 4.20. Determinación de la actividad promotora de la secuencia 5' de L1Tc

- 4.20.1. Construcción de los vectores
- 4.20.2. Análisis de la transcripción

5. DISCUSION

- 5.1. Actividad transcriptasa inversa en *T. cruzi*
- 5.2. Actividad transcriptasa inversa codificada por el L1Tc
- 5.3. Actividad ARNasa H asociada a la RT de L1Tc
- 5.4. Actividad promotora de la zona 5' de L1Tc
- 5.5. Implicaciones biológicas de la actividad del retrotransposon no-LTR en el *Trypanosoma cruzi*

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La existencia de mecanismos naturales para ajustar el contenido del genoma parece contradictoria con la noción general de que su organización es relativamente estable, siendo alterada solamente por la recombinación genética a nivel de la línea germinal y no a nivel somático. A lo largo del proceso evolutivo, los cambios se dan lentamente, lo cual no es extraño porque permite mantener la viabilidad de los individuos y de las especies. La escala evolutiva en términos de tiempo real, entre eucariotas y procariotas es distinta dada la diferencia en tiempos de generación, pero aún a pesar de ello, los cambios en el genoma de éstos últimos son relativamente lentos, un ejemplo de ello es la similitud del mapa genético entre dos especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. En los eucariotas ésta estabilidad también se puede observar en las retenciones de ligamiento que persisten aún después de procesos de especiación como es el caso del hombre y los primates.

Los mecanismos naturales que llevan a la evolución del genoma se dan, ya sea por la adquisición de secuencias nuevas o por el rearrreglo de las ya existentes. La introducción de secuencias nuevas es el resultado de la capacidad de los vectores para llevar información entre genomas.

Los elementos extracromosomales mueven la información horizontalmente mediando la transferencia de segmentos (usualmente cortos) de material genético. En las bacterias los plásmidos se mueven por conjugación, mientras que los fagos se propagan por infección. Ocasionalmente, tanto plásmidos como fagos, transfieren genes del hospedador unidos a su propio replicón. La transferencia directa de ADN ocurre entre algunas bacterias por medio de la transformación; en eucariotas algunos virus pueden transferir información genética durante un ciclo infectivo.

Los rearrreglos pueden llevar a la creación de secuencias nuevas o a cambiar la función de las ya existentes, algunos de ellos, involucran el movimiento de segmentos de ADN desde sus posiciones originales a sitios diferentes, ó la duplicación de segmentos de ADN contenidos en un locus particular dando origen a repeticiones en tándem, en otros casos, los segmentos de ADN se duplican y se desplazan a posiciones distantes en el genoma (elementos transponibles), utilizando mecanismos basados en reacciones que afectan al ADN, o bien pasando por intermediarios de ARN y por reacciones de transcripción inversa. Finalmente, las copias adicionales de segmentos esenciales pueden mutar y adaptarse para desempeñar funciones nuevas o modificadas. En conjunto, todas éstos mecanismos llevan a un aumento del genoma no sólo en su tamaño sino en su capacidad fenotípica, lo cual combinado con la selección natural le proporcionan flexibilidad y capacidad evolutiva.

1.1.Elementos móviles o elementos transponibles (ETs)

Una poderosa fuente de cambio tanto en los genomas eucarióticos como procarióticos está dada por los elementos móviles o elementos transponibles (ETs) (Weiner y col., 1986; Schmid y Marais, 1992; Okada y Ohshima, 1995). A diferencia de los otros procesos involucrados en la reestructuración del genoma, la transposición no cuenta con ninguna relación entre las secuencias donadoras y receptoras, ya que los elementos transponibles se limitan a moverse por sí mismos, algunas veces con secuencias auxiliares del genoma, a nuevos sitios dentro del mismo genoma. La primera descripción de éstos elementos fue hecha por Bárbara McClintock en los años 40 (MacClintock, 1948), estudiando la herencia del color y distribución de la pigmentación del maíz, ella observó que la regulación de la activación y desactivación de ciertos genes podía alterarse como consecuencia de la acción de distintas unidades genéticas con capacidad de transposición, a las cuales llamó elementos

controladores. Estos elementos son por lo tanto, áreas del genoma que tienen la capacidad de moverse por sí mismas y directamente de un sitio a otro del genoma codificando las proteínas necesarias para su transposición. Los elementos transponibles tienen una amplia distribución en la naturaleza y han sido identificados en virtualmente todos los organismos examinados. Ellos constituyen el principal componente del ADN repetido del genoma de animales y plantas, estando presentes en un número de copias que va desde un par o diez, hasta cientos o miles por genoma. Recientemente, se ha estimado que representan más del 50% del genoma del maíz (SanMiguel y col., 1996), en *Drosophila*, del 10 – 15% del genoma está formado por ETs, la mayoría de las cuales se encuentran en distintas regiones de la heterocromatina céntrica (Pimpinelli y col., 1995).

Clasificación de los elementos móviles

La clasificación de éstos elementos móviles ha estado basada en el tipo de hospedador (procariótico o eucariótico), en las estructuras (repeticiones terminales invertidas o repeticiones terminales directas), en la similitud en secuencias (genes homólogos, como transposasas) y se pueden distinguir en general dos clases principales, de acuerdo a sus diferentes modos de transposición (Finnegan., 1992). Los elementos clase I que son retroelementos que usan la transcriptasa inversa para transponerse a partir de un ARN intermediario. Ellos incluyen los LTR-retrotransposones o *like-retrovirus* y los no-LTR o secuencias LINE "*long interspersed nucleotide elements*" y SINE "*short interspersed elements*".

Los elementos clase II se transponen directamente de ADN a ADN e incluyen transposones como la familia del *Activator-Dissociation* (Ac-Ds) del maíz, el elemento *Tam* en *Antirrhinum*, el elemento P en *Drosophila*, y el elemento *Tc1* en el *Caenorhabditis elegans*. Recientemente, se ha descubierto

una categoría de ETs cuyo mecanismo de transposición no se conoce todavía (Wessler y col., 1995). Estos ETs con repeticiones invertidas mínimas (MITEs) tienen propiedades de las dos clases de elementos. Son secuencias cortas (100-400 pb) y a ninguna se le ha encontrado capacidad codificante. Están presentes en un alto número de copias (3000 – 10000) por genoma y tienen preferencia como sitio blanco, en plantas por TAA o TA. MITEs como el elemento *Tourist* en el maíz y el elemento *Stowaway* en el sorgo (Wessler y col., 1995) se encuentran frecuentemente en las regiones 5' y 3' no codificantes de los genes y están asociadas con frecuencia a las regiones reguladoras de los genes de distintas plantas florales. También se han descrito, ETs con propiedades similares en *Xenopus* (Unsal y col., 1995), humanos (Morgan., 1995; Smit y col., 1996) y en el mosquito de la fiebre amarilla, *Aedes aegypti* (Tu., 1997). Un genoma puede contener elementos tanto funcionales como no funcionales (defectivos), a menudo, la mayoría de los elementos en los genomas eucarióticos son defectivos y han perdido la habilidad para transponerse independientemente, aunque pueden ser reconocidos como sustratos para transposición por las enzimas producidas por los transposones funcionales.

Retrotransposones

Dentro de los retrotransposones y basándose en su estructura y en la similitud de secuencia de sus transcriptasas inversas, se pueden distinguir dos clases de elementos, los clase I con simetría terminal o LTR-retrotransposones que incluyen los elementos copia de *Drosophila*, los elementos Ty de levadura o el elemento THE 1 de humanos. Estos elementos presentan una elevada similitud con los retrovirus de mamíferos y aves (McClure., 1993), el elemento *gypsy* de *Drosophila* es un ejemplo de un tipo raro de retrotransposón que puede comportarse en algunos casos como un retrovirus (Bucheton., 1995). Estos LTR-retrotransposones poseen en sus extremos 5' y 3' secuencias largas

de repetición (LTR) simétricas, las cuales juegan un papel relevante en el mecanismo de transposición (Eichinger y col., 1990). El segundo grupo más heterogéneo denominado retrotransposones no-LTR, presentan en su extremo 3' una cola de adeninas y están flanqueados por secuencias directas de tamaño pequeño (7 a 20 nucleótidos). En éste grupo, como se mencionó anteriormente están tanto las secuencias SINE como las LINE, dentro de ellos se denominan retrotransposones aquellos que contienen las secuencias que codifican las proteínas necesarias para la transposición, llamándose retrogenes al resto de los elementos. La mayor parte de las secuencias de ADN moderadamente repetidas en mamíferos pertenecen al grupo de elementos SINE. Estos, son elementos cortos y repetidos de aproximadamente 80 - 400 pb que se presentan a menudo en más de 10^5 copias por genoma. Hasta la actualidad, casi todos los SINE reportados, de fuentes tan diversas como mamíferos y plantas se derivan de ARNt (Okada, 1991; Ohshima y col., 1993; Okada y Ohshima, 1995), con la excepción de las conocidas secuencias Alu de primates y B1 de roedores, las cuales se derivan de ARN 7SL (Ullu y Tschudi, 1984; Weiner, 1980). Alu es un dímero de dos secuencias homólogas, conteniendo una de ellas un promotor funcional de la polimerasa III (Rogers, 1985).

Las secuencias LINE o retrotransposones no- LTR poseen un tamaño entre 4 a 6 kb y están presentes de forma dispersa en un número de copias mayor de 10^4 por genoma, habiéndose descrito en organismos tan distantes como mamíferos, insectos, protozoos, plantas y anfibios (Hutchison, 1989; Xiong y Eickbush, 1990), dentro de los más estudiados están los L1 de humanos (Boeke y Corces, 1989), factor I de *Drosophila melanogaster* (Bucheton y col., 1984) y R2Bm de *Bombyx mori* (Luan y col., 1993). Los elementos LINE, al contrario de los SINE, son capaces de codificar las proteínas involucradas en el proceso de su propia retrotransposición, aunque, últimamente se han descrito algunos ejemplos donde los productos de traducción de los elementos LINE son utilizados en trans por los SINE para su transposición (Okada, y col., 1997).

Los retrotransposones no-LTR o elementos poli(A), como también son conocidos, se pueden a su vez subdividir en dos tipos: los secuencia específica, los cuales se localizan en determinados sitios del cromosoma y los no secuencia específica que se distribuyen al azar en el genoma. Dentro del primer grupo estarían los elementos R1 y R2 presentes en insectos (Jakubczak y col., 1991); CRE1, SLACS y CZAR en tripanosomátidos (Gabriel y col., 1990; Aksoy y col., 1990 y Villanueva y col., 1991); TRAS1 y SART1 de *B. mori* (Okasaki y col., 1995 y Takahashi y col., 1997) y entre los no específicos el más importante sería el L1 de humanos cuyas inserciones se encuentran distribuidas en todos los cromosomas, con aproximadamente 100000 copias, representando el 5% del ADN nuclear (Fanning y Singer, 1987)

Estructura de los retrotransposones no-LTR

Una comparación de la organización básica de los retrotransposones no-LTR, retrotransposones LTR y retrovirus se muestra en la figura 1. La mayoría de los retrotransposones no-LTR ó elementos LINE contienen dos marcos de lectura abiertos (ORF), situados en fases diferentes y solapando en un corto segmento. En algunos están en la misma fase de lectura, separados por un codón de terminación (Fawcett y col., 1986; Skowronski y col., 1988) o los dos marcos están fusionados en uno más grande (Burke y col., 1987; Gabriel y col., 1990). El primer ORF de los no-LTR tiene un tamaño entre 300-500 aminoácidos, contiene algunos motivos de cisteínas cerca de su extremo carboxi-terminal con una separación de residuos cisteínas e histidinas similar al encontrado en los genes *gag* de los retrovirus. Se cree, por analogía, que éste ORF codifica para una proteína de unión a ácidos nucleicos la cual estaría actuando en la unión del ARN intermediario en el proceso de transcripción inversa. El segundo ORF tiene alrededor de 1000 aminoácidos presentando homología con los genes *pol* de retrovirus, especialmente en lo que respecta al dominio transcriptasa inversa (RT), dominio conservado en todos los

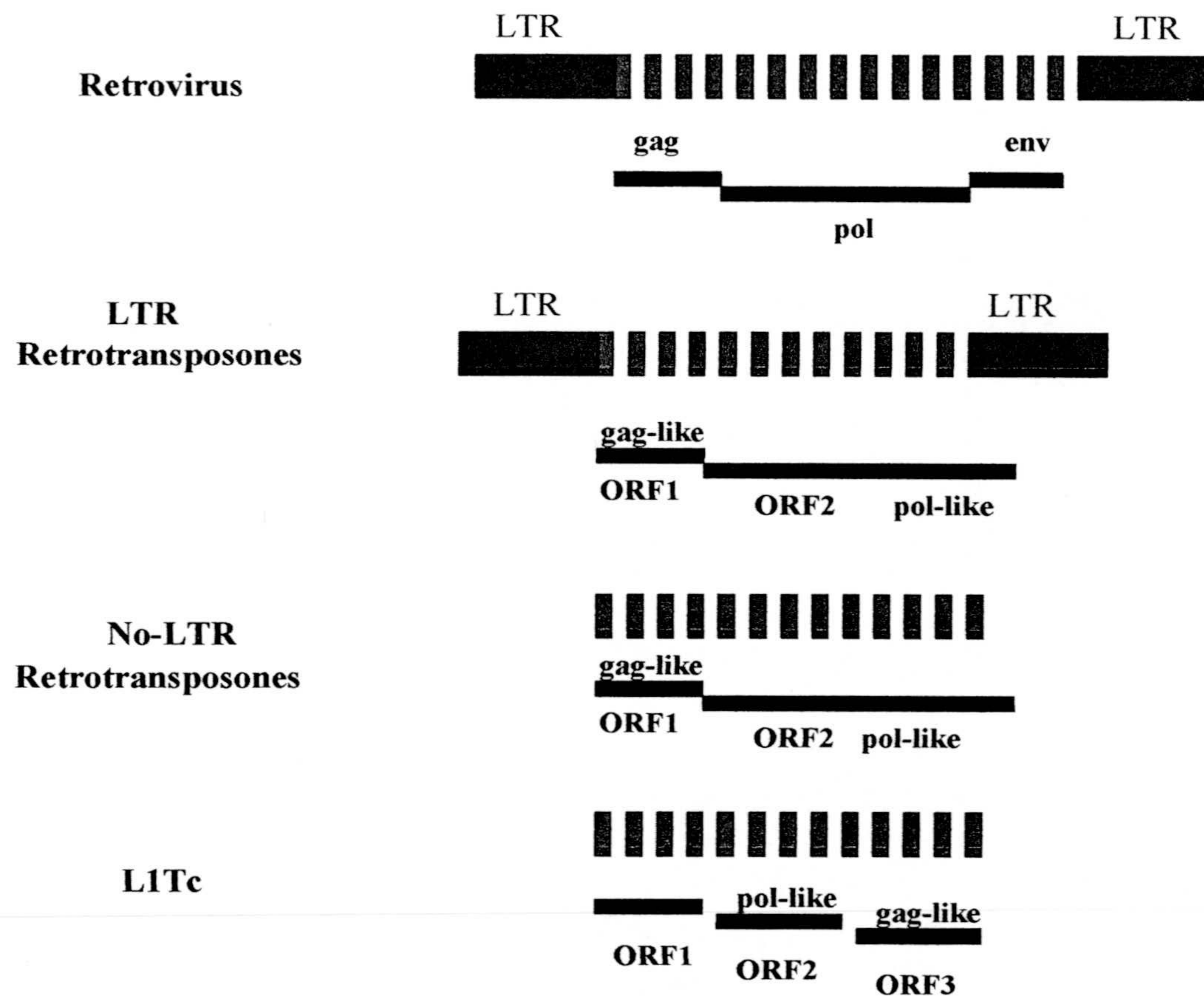


Fig 1. Esquema comparativo de la estructura de L1Tc con los diferentes retroelementos.

retroelementos desde retrovirus a secuencias internas del grupo II de intrones (Michel y Lang, 1985). En la mayoría de los casos éste dominio está localizado en la zona central del ORF, pero en algunos elementos puede estar cerca de la zona amino-terminal (Kimmel y col., 1987) o en la carboxilo-terminal (O'Hare y col., 1991).

A pesar de éstas semejanzas estructurales que sugieren una capacidad de retrotransposición propia, sólo, recientemente se ha podido demostrar

A pesar de éstas semejanzas estructurales que sugieren una capacidad de retrotransposición propia, sólo, recientemente se ha podido demostrar experimentalmente ésta capacidad. La actividad transcriptasa inversa de los no-LTR, codificada por el ORF similar a *pol*, ha sido descrita para el elemento jockey de *Drosophila melanogaster* (Ivanov y col., 1991), CRE1 de *Crithidia fasciculata* (Gabriel y Boeke, 1991) y L1 de humanos (Mathias y col., 1991). La evidencia directa de que éstos elementos se replican mediante un ARN intermediario se ha obtenido para algunos elementos, el I de *D. melanogaster* (Jensen y Heidmann, 1991; Pelisson y col. 1991), en L1 de ratón (Evans y Palmiter, 1991) y más recientemente el L1 de humano (Moran y col., 1996). Estos resultados no dejan duda de que los elementos no-LTR representan una clase de elementos transponibles activos.

En el segundo marco de lectura abierto de los retrotransposones LTR además de la actividad transcriptasa inversa, se ha encontrado una homología en secuencia con los dominios retrovirales que codifican para otras tres actividades enzimáticas como son la ARNasa H, proteasa e integrasa (Doolittle, 1989). Sin embargo, en el caso de los no-LTR no se ha descrito la presencia de dominios proteasa y sólo en un pequeño número de elementos se han encontrado pequeñas homología con integrasa (Gabriel y col., 1990; Villanueva y col., 1991) ó ARNasa H (Fawcett y col., 1986; McClure, 1991). Esto probablemente, no sea debido a una baja conservación de éstos dominios con respecto a los de la RT, ya que se han detectado motivos ARNasa H y proteasa conservados entre las enzimas retrovirales y bacterianas (Doolittle y col., 1989).

Existe evidencia directa de una actividad enzimática diferente a la transcriptasa inversa, codificada por los no-LTR en la región 5' del ORF2 y es una actividad endonucleasa, el motivo se describió primero en el elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi* (Martín y col., 1995), luego se identificó en varios retrotransposones no-LTR (Martín y col., 1996) y posteriormente se demostró

su actividad en el L1 de humano (Feng y col., 1996) y en L1Tc de *Trypanosoma cruzi* (Olivares y col., 1997), éste dominio endonucleasa se encuentra solamente en la mitad de los elementos secuencia específica y en la mayoría de los no secuencia específica, localizándose hacia la zona amino terminal del ORF2, el único elemento poli(A) no secuencia específica que lo pierde es el elemento Dong, el cual contiene el primer motivo (QET) de la zona N-terminal, pero pierde los demás motivos, sugiriendo que la copia secuenciada de Dong representa una mutación con una delección interna del ORF2 (Feng y col., 1996).

Distribución y filogenia

Los retroelementos se han encontrado en una amplia variedad de organismos que van desde mamíferos, anfibios, plantas, insectos, hongos y protistas. La mayoría de los elementos no-LTR se insertan en diferentes localizaciones a lo largo del genoma del hospedador. Sin embargo, hay un número significativo de elementos que se encuentran localizados en sitios específicos del cromosoma, como se mencionó anteriormente. R1 y R2 se encuentran en sitios específicos en una fracción de los genes rARN 28S de la mayoría de los insectos (Jakubczak y col., 1991), también lo hace el R4 en nemátodos (Burke y col., 1995). Tx1 de *Xenopus laevis* se inserta en un segundo elemento móvil, Tx1d, presente en la misma especie (Garret y col., 1989). CRE1, SLACS y CZAR se encuentran en el exon del spliced leader (SL) de especies de *Trypanosomatidae* (Gabriel y col., 1990; Aksoy y col., 1990 y Villanueva y col., 1991). DRE de *Dictyostelium discoideum* se inserta adyacente a los genes ARNt (Marschalek y col., 1992) al igual que Ty1 y Ty3 en levaduras (Chalker y Sandmeyer, 1990). Recientemente se han descrito nuevos retrotransposones no-LTR de *Bombyx mori* TRAS1 (Okasaki y col., 1995) y SART1 (Takahashi y col., 1997) y HetA de *Drosophila melanogaster* (Biessmann y col., 1990) insertados en las secuencias repetidas del telómero.

Comparando la secuencia de aminoácidos del dominio transcriptasa inversa Eickbush estableció una probable relación filogenética de los retroelementos (Eickbush, 1992). Además de los retrotransposones y retrovirus, el análisis incluye un número de elementos genéticos adicionales que codifican para transcriptasas inversas. Estos elementos incluyen los virus ADN, hepadnavirus de animales y caulimovirus de plantas (Toh y col., 1983), un número de intrones mitocondriales grupo II de hongos (Michael y Lang, 1985) y elementos de inserción bacterianos los cuales producen multicopias de ADN de sencilla cadena (Inouye y col., 1989; Lim y Maas, 1989). Basado en la similitud de secuencia de siete dominios conservados de más de 80 RTs y tomando como raíz del árbol filogenético las ARN polimerasas dependientes de ARN, todos los retroelementos se dividieron en dos grandes grupos (Fig. 2). Un grupo contiene los retrotransposones no-LTR y elementos de bacterias y organelos, todos ellos han perdido las repeticiones terminales directas ó invertidas. Localizados en el segundo grupo están los retroelementos cuya replicación involucra las repeticiones terminales, incluyendo las tres clases de virus (retrovirus, caulimovirus y hepadnavirus) y los retrotransposones LTR. Los retrotransposones LTR se dividen a su vez en dos grupos: el grupo de los Ty1 - copia y el grupo de los Ty3 - gypsy. La principal diferencia estructural entre éstos dos grupos es el orden de los dominios transcriptasa inversa e integrasa en sus genes *pol* (Mount y Rubin, 1985). El grupo Ty3 - gypsy al igual que los retrovirus tiene el dominio integrasa corriente abajo del dominio RT, mientras que el grupo Ty1 - copia lo tiene corriente arriba.

La localización de todos los retrotransposones no-LTR en la misma rama del árbol filogenético de los retroelementos sugiere que ellos tienen un origen común, por lo tanto, ninguno de los ya caracterizados parece originarse a partir de un retrotransposón LTR que haya perdido recientemente sus repeticiones terminales. Los miembros más divergentes del grupo no-LTR son CRE1, SLACS y CZAR. Con la excepción de cuatro elementos de *D. melanogaster* (Doc, F, G y jockey) la relación filogenética de los no-LTR no muestra una

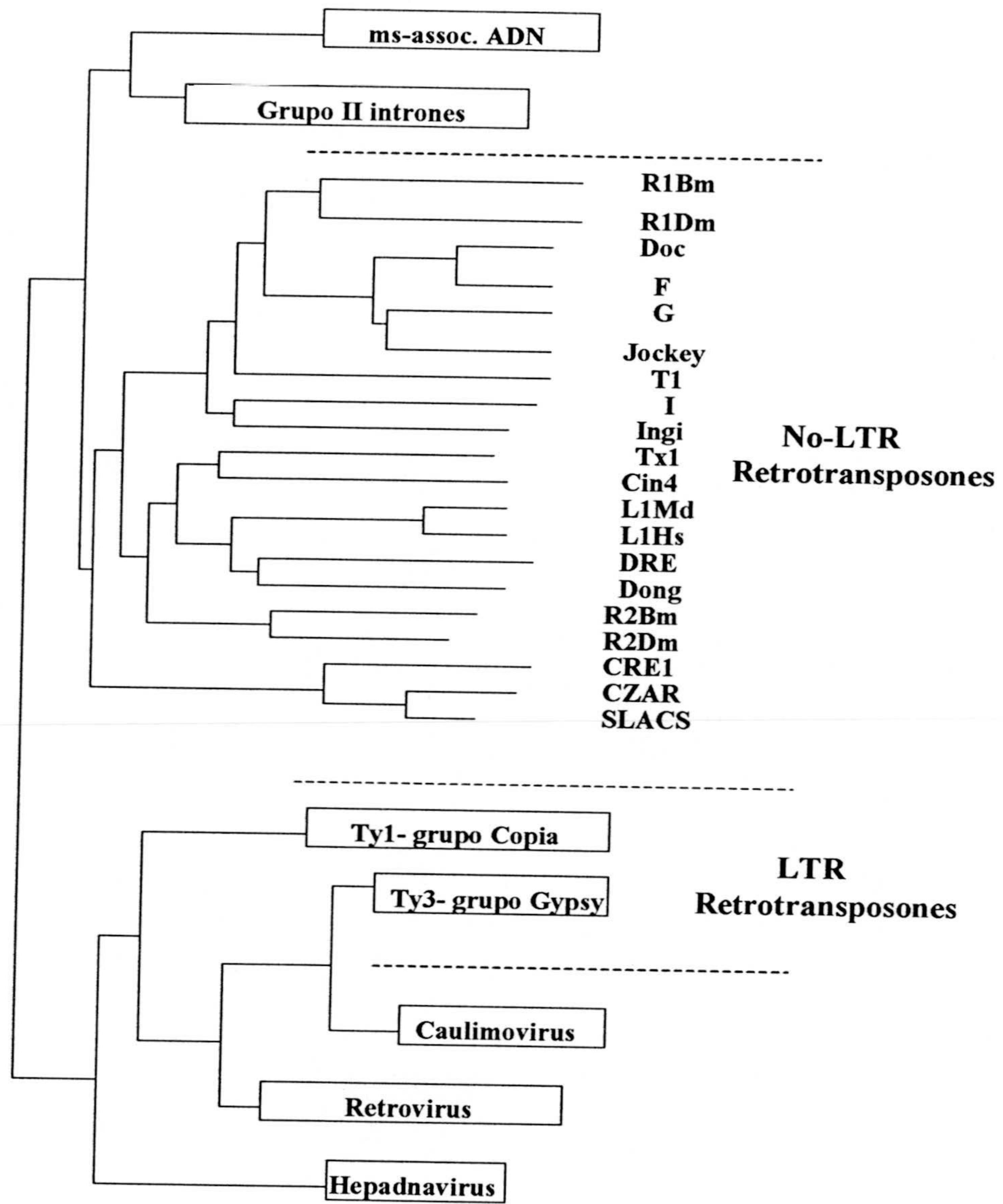


Fig 2. Arbol filogenético de los retroelementos basado en la comparación de secuencias de aminoácidos de transcriptasas inversas.

correlación con las relaciones filogenéticas de los organismos en los cuales se encuentran. Por ejemplo, I de *D. melanogaster* está más relacionado con ingi de *T. brucei* ó Tx1 de *X. laevis* con Cin4 del maíz. Esta relación de secuencia, aparentemente al azar entre elementos de origen muy diferente, indica o que los retrotransposones (o sus transcriptasas inversas) se han dispersado horizontalmente entre los principales grupos taxonómicos o que el origen de los retrotransposones no-LTR precede a la evolución de los metazoarios.

Transcripción

Los LTRs tanto de los retrovirus como de los retrotransposones LTR juegan un papel crítico en la transcripción del ARN, la transcripción reversa y la integración. El hecho de que los no-LTR no los posean sugiere que ellos utilizan un mecanismo diferente para éste proceso. Los retrovirus y los retrotransposones LTR contienen promotores convencionales ARN polimerasa tipo II localizados en el LTR del extremo 5', iniciando la transcripción en un sitio corriente abajo (Varmus y Brown, 1989). Los elementos del promotor corriente arriba de dicho sitio, los cuales no están presentes en la zona 5' del ARNm resultante, son regenerados durante la transcripción reversa del ADN intermediario por la secuencia LTR del extremo 3'. Para los retrotransposones no-LTR esto representa una paradoja, porque si la transcripción está controlada por un promotor Pol II, ¿ cómo se puede regenerar éste promotor a partir del ARN cuando no hay una duplicación de él en la zona 3' del ARNm?.

Una solución al problema de reestablecer el promotor en la ausencia de LTR explicaría el alto número de elementos no-LTR sitio específico, en contraste con lo observado para los LTR (Sandmeyer y col., 1990). R1 y R2 en los genes 28S de los insectos y CRE1, SLACS y CZAR en los exones del SL de los tripanosomátidos están en la orientación adecuada para ser cotranscritos por el promotor del gen donde se insertan. Así, que una posible

explicación de por qué éstos elementos no-LTR han evolucionado hacia una especificidad de sitio y orientación en su inserción en genes particulares, es que de ésta forma se aseguran que las nuevas copias siempre estén localizadas corriente abajo de un promotor apropiado.

Probablemente, el uso de un promotor externo, no soluciona el problema de reestablecer el promotor luego de la retrotransposición para los elementos que no son sitio específicos. Los retrotransposones no-LTR, transcripcionalmente activos que se han encontrado en diferentes sitios dentro del genoma y sin promotor conocido, probablemente tengan un promotor interno (Fawcett y col., 1986; Mizrokhi y col., 1988; Drombroski y col., 1991).

La demostración directa de un promotor interno para los elementos no-LTR fue sugerida primero para el elemento jockey de *D. melanogaster* (Mizrokhi y col., 1988) y el elemento L1 de *Rattus norvegicus* (Nur y col., 1988). Usando ensayos de transfección transitoria Mizrokhi y colaboradores fueron capaces de demostrar que se requerían solamente algunos nucleótidos para la transcripción del elemento jockey y que estaban localizados corriente abajo del sitio de iniciación. Los primeros trece nucleótidos de jockey eran esenciales para el inicio correcto de la transcripción. Experimentos posteriores con el elemento L1 (Swergold, 1990), el elemento I (Mclean y Finnegan, 1991) y el elemento F de humanos (Minchiotti y Di Nocera, 1991) indican que su transcripción también está controlada por un promotor interno localizado cerca al extremo 5' del elemento. Para L1, I y F1 los componentes críticos del promotor se localizan en las primeras 100 pb del elemento, sin embargo toda la región controladora de la transcripción se distribuye en algunos cientos de pares de bases del extremo 5'. El inicio de la transcripción corriente arriba del promotor en los elementos no-LTR les permite conservar los promotores luego de la replicación vía la transcripción inversa. La presencia de un promotor interno en éstos elementos podría ser un argumento a favor de que la transcripción está dada por la ARN polimerasa III, pero la ausencia de las secuencias correspondientes a las cajas A y B de los promotores Pol III, la

sensibilidad de los promotores a la α -amanitina y la poliadenilación del ARNm son argumentos a favor de una ARN polimerasa tipo II (Mizrokhi y col., 1988).

La localización de componentes críticos de un promotor tipo Pol II corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción no tiene precedentes. En *Drosophila melanogaster* se ha visto que algunos genes del desarrollo tienen secuencias controladoras esenciales corriente abajo del sitio de iniciación (Thummel, 1989; Winslow y col., 1989). Sin embargo, en ningún caso todas las secuencias necesarias para la transcripción in vivo están localizadas corriente abajo del sitio de inicio. Esto lleva a la pregunta de si los factores de transcripción de éstos elementos estarán codificados por ellos mismos y serán específicos, siendo capaces de esta inusual iniciación corriente arriba.

1.2. Evidencia de transposición e importancia biológica

Los retrotransposones clase I más ampliamente estudiados han sido los Ty de levadura, en parte, por la facilidad de manipulación genética y molecular de las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es el primer organismo eucariótico para el cual se ha determinado la secuencia entera de su genoma. Contiene 51 retrotransposones que se pueden dividir en 4 clases diferentes desde Ty1 a Ty4. El elemento Ty5 identificado en el cromosoma III y los otros siete Ty5 de la cepa α S288C se han considerado copias incapaces de transposición, en contraste, se han encontrado elementos Ty5 competentes en *S. paradoxus* (Zou y col., 1995, 1996). Los elementos Ty juntos ocupan 300 kb de la secuencia, equivalente al 2,4% del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Hani y Feldmann, 1998). Desde muy temprano se ha mostrado una asociación bastante estrecha entre los elementos Ty y los genes ARNt (Eigel y Feldmann, 1982 y Sandmeyer y col., 1982), basado en el análisis de una gran cantidad de locus de genes ARNt, mostrando que el sitio preferido para la transposición de Ty eran las regiones 5' flanqueantes de dichos genes (Warmington y col., 1987). Mientras Ty1, Ty2 y Ty4 se integran de una manera región específica,

Ty3 lo hace de una manera específica a distancia, 16 a 19 pb corriente arriba de los genes ARNt (Sandmeyer y col., 1982). En un análisis realizado por Hani y Feldmann, encontraron que el 26% de los genes ARNt están asociados estrechamente con un solo elemento, mientras que 34% están localizados en “puntos calientes” de transposición, en los cuales se acumulan cerca de 10 elementos con patrones muy complejos.

Mucho menos estudiados son los elementos *copia*, ellos están presentes en aproximadamente 60 copias por genoma haploide de *Drosophila* y éste número aumenta tres veces en algunos tejidos (Potter y col., 1979), el ARN de *copia* está entre los más abundantes en las células de *Drosophila* (Finnegan y col., 1978). Un estudio de Yoshioka y colaboradores mostró evidencias de transposición del elemento *copia* (Yoshioka y col., 1991). El número de los elementos de la clase Ty-*copia* ha aumentado considerablemente en los últimos años y se han descrito elementos Ta1 a Ta10 en *Arabidopsis thaliana* (Voytas y Ausubel, 1988; Konieczny y col., 1991), Tnt1 en el tabaco, el cual junto con Bs1 de maíz es uno de los dos retrotransposones en plantas en los cuales se ha demostrado actividad (Johns y col., 1985 y Grandbastien y col., 1989). Tnt1 está presente en más de 100 copias por genoma haploide y se vió que era capaz de inactivar por inserción el gen de la nitrato reductasa en cultivos de líneas celulares de protoplastos de hojas del tabaco. También se ha descrito el elemento Tp1 del *Physarum polycephalum* (Rothnie y col., 1991).

Los miembros de la familia *gypsy* tampoco han sido estudiados tan intensivamente como los Ty, probablemente, porque son menos activos transcripcionalmente o por su número (más de 10 familias en el genoma de *Drosophila*). De todas formas, algunos de éstos elementos son capaces de transposición, lo cual se deduce de la variación cepa a cepa en la organización genómica o en las consecuencias fenotípicas de su transposición (Smith y Corces 1991). Esta familia también incluye el elemento *del* de *Lilium henryi* (Smyth y col., 1989), Tf1 y Tf2 de *S. pombe* (Levin y col., 1990) y SURL del erizo de mar (Springer y col., 1991).

A pesar de que hasta el momento han sido descritos elementos LINE o no-LTR en una gran variedad de organismos, sólo recientemente ha podido ser demostrado que éstos elementos son capaces de transposición, desconociéndose el mecanismo mediante el cual un transcrito completo de un elemento LINE puede ser retrotranscrito e integrado en otro lugar del genoma que lo hospeda. Hasta 1991 no se demostró experimentalmente que dicha transposición ocurre vía ADN-ARN-ADN en *Drosophila* y en humanos (Jensen y Heidmann, 1991; Pelisson y col., 1991 y Dombroski y col., 1991). Análisis de la frecuencia de elementos transponibles en el genoma humano evidencian que durante la evolución deben haber ocurrido más de 500.000 integraciones aisladas en la línea germinal. La mayoría de elementos L1 (10^5) están truncados y han perdido secuencias que presumiblemente se requieren para la transposición, pero recientemente se han encontrado elementos completos que se han insertado como en el caso de genes del Factor VIII en pacientes con hemofilia A (Kazazian, Jr y col., 1988; Woods-Samuels y col., 1989), en el gen APC de células tumorales de un paciente con cáncer de colon (Miki y col., 1992) y el gen distrofina de un paciente con distrofia muscular (Holmes y col., 1994), éstos datos sugieren que la transposición no sólo puede ocurrir en células germinales sino también en células somáticas.

Se ha descrito la presencia del elemento L1 en tumores de células germinales de testículo humano, observándose su expresión también en células metastatizadas (Bratthauer y Fanning, 1992). Estudios epidemiológicos muestran que al menos el 10% de los cánceres de células germinales de testículo expresan el elemento LINE1. Asimismo éste elemento se expresa en un 5% de células de tumor ovárico y en un 30% de tumores extragonales (Bratthauer y col., 1993). Por ello se postula, que la inserción de los elementos móviles L1 originan mutaciones que pueden jugar un papel importante en la etiología de algunas neoplasias. Además existen claras evidencias de que la expresión de éstos elementos, puede contribuir al origen y progresión de algunos cánceres humanos de mama (Asch y col., 1993). Recientemente, se ha publicado el primer ejemplo de una mutación debida a la recombinación no homóloga entre elementos LINE1 en el gen que codifica la subunidad β de

la fosforilato kinasa (PHKB), lo cual ha llevado a la deleción de 7574 nucleótidos incluyendo el exon 8, lo cual dio lugar a la enfermedad de almacenamiento de glucógeno por la deficiencia de la fosforilato kinasa (Burwinkel y Kilimann, 1998).

Si bien es cierto que la inserción de un elemento transponible puede tener efectos perjudiciales para el hospedador como se refleja en muchos de los ejemplos anteriores, cada día va en aumento la lista de efectos benéficos generados por ellos. Recientemente, Kidwell hace un análisis del efecto de las transposiciones de los elementos móviles sobre los organismos hospedadores desde el punto de vista evolutivo (Kidwell y Lisch, 1997). En éste análisis tiene en cuenta: la selección directa de los elementos transponibles a nivel de la secuencia de ADN (ADN parásito), la coevolución del elemento con el hospedador para evitar o mitigar el efecto deletéreo de las inserciones y la selección positiva de elementos que han evolucionado para dar algún beneficio a su hospedador :

1.2.1. Elementos transponibles como parásitos genómicos

La naturaleza intrínsecamente parasítica de los elementos transponibles activos tiene que ver con su indiscutible capacidad de invadir nuevas especies, aumentando el número de copias y permaneciendo largos períodos de tiempo a lo largo de la evolución. Esto lo pueden lograr porque, su estructura generalmente compacta y la inclusión en ella de la capacidad de transposición les da una ventaja replicativa. La selección natural que actúa sobre los ETs a nivel de la secuencia de ADN es responsable del mantenimiento de sus propiedades parasíticas esenciales. Por ejemplo, los elementos P pueden invadir rápidamente una población vírgen de *Drosophila melanogaster*, a pesar de la selección negativa extremadamente fuerte a nivel del hospedador con altas frecuencias de esterilidad gonadal dependiente de temperatura (Kidwell, 1984).

1.2.2. Coadaptación para disminuir los efectos deletéreos del hospedador

Como ya se dijo, los retrotransposones son elementos genéticos móviles, que han invadido una amplia variedad de organismos y que presentan similitudes tanto a nivel de secuencia como de estructura con los retrovirus, pero a diferencia de ellos han perdido la capacidad de producir partículas infecciosas y por lo tanto de colonizar nuevos hospedadores, estando restringidos a su huésped y a una transmisión vertical. En general, sus inserciones dan como resultado mutaciones, inversiones o rearrreglos en las secuencias del hospedador. Se piensa que todos éstos cambios aumentan la plasticidad del genoma y de ésta forma contribuyen a un avance más rápido en el proceso evolutivo. Sin embargo y dado que la retrotransposición es un evento altamente mutagénico, solamente la existencia de un fuerte mecanismo de control puede permitir a los elementos transponibles activos subsistir en genomas viables, dándose así una verdadera simbiosis, donde el elemento puede persistir en el hospedador si le confiere a éste una ventaja evolutiva. Para ello, los retrotransposones presentan algunas estrategias o una capacidad de adaptación similar a la de los retrovirus para permanecer en el hospedador sin afectar su viabilidad, una de ellas es la especificidad por el sitio de inserción, que además explicaría porque muchos de ellos han evolucionado hacia ser sitio específicos. Otra sería el hecho de que éstos elementos presentan con bastante frecuencia mutaciones en los elementos importantes para su expresión, dando lugar a un gran número de copias defectivas o truncadas, también el hecho de que la estructura de sus elementos reguladores esté en tándem, los hace ser más inestables en el proceso de transposición y su expresión en muchos casos está limitada a ciertas etapas del desarrollo, a determinados tejidos o a condiciones medioambientales muy particulares. Todos éstos mecanismos son los que explican el bajo número de elementos activos identificados en los distintos organismos en los cuales están presentes.

1.2.2.1. Inserción en zonas no codificantes

Un ejemplo de ésta preferencia es el elemento P de *Drosophila* el cual prefiere insertarse en regiones potencialmente reguladoras de los genes hacia la zona 5' (Spradling y col., 1995). Los Ty1 de levaduras también lo hacen, se han observado cerca de 100 inserciones nuevas de éste elemento en el cromosoma III cerca de los genes ARNt o en LTR preexistentes, solamente un 3% se encuentran en zonas codificantes.

1.2.2.2. Inserción en elementos preexistentes

Es claro que una transposición descontrolada sería absolutamente desastrosa para el hospedador. Por ejemplo, en el maíz el número de retroelementos que se encuentran en sus genes puede representar el 50% del genoma (SanMiguel y col., 1996). Las cinco familias más abundantes ocupan cerca del 25% y una sola familia la *Opie* el 10-15% del genoma total, pero la mitad de los elementos analizados están insertados en otros elementos.

1.2.2.3. Procesamiento de los transcritos de pre-ARNm

Se ha sugerido que el procesamiento de los ETs a partir de secuencias exónicas ha evolucionado como un medio para disminuir sus efectos deletéreos en el hospedador. Se han descrito muchos casos en *Drosophila*, *C. elegans* y en plantas donde el procesamiento del ARN lleva a la eliminación del elemento y a una reversión parcial de la mutación causada por la inserción original (Fridell y col., 1990; Purugganan y Wessler, 1992 y Rushforth y Anderson, 1996).

1.2.2.4. Especificidad de tejidos

Un buen ejemplo de una probable adaptación de un ET a su hospedador es la restricción de transposición de los elementos *P* e *I* a la línea germinal (Bregliano y Kidwell, 1983). Es benéfico para un elemento transponerse en aquellos tejidos que le aseguren la transmisión a la siguiente generación del hospedador, pero restringir su actividad a los tejidos somáticos puede resultar en una pérdida de capacidad del hospedador sin ningún beneficio para el transposón. Por lo tanto, la represión de la transposición del elemento *P* en las células somáticas ocurre a nivel del procesamiento del ARNm. Los intrones 2-3 son eliminados solamente en las células germinales, dando como resultado la ausencia de transposasa en las células somáticas. La eliminación del intrón es prevenida en las células somáticas por una proteína de 87 kDa que se une a un sitio en el exon 2 localizado 12-31 bases hacia 5' del sitio de corte (Tseng y col., 1991).

1.2.2.5. Regulación del número de copias de ET por parte del hospedador

En el maíz al igual que en *Drosophila*, se encuentran buenos ejemplos de regulación del número de copias por parte del hospedador. Factores desconocidos del hospedador metilan específicamente *Ac*, *Spm* y *Mutator* en el caso del maíz (Chomet y col., 1987). En el caso de *Mu* hay simultáneamente, una metilación global de docenas de elementos activos en una sola generación. En las hembras de *D. melanogaster* la expresión del gen *envelope* del elemento *gypsy*, está reprimida fuertemente por una copia del alelo de *flamenco*, los efectos de *flamenco* en la expresión de *gypsy* están restringidos a las células somáticas del folículo que rodean la línea germinal materna (Bucheton, 1995).

1.2.2.6. Regulación del número de copias por parte del mismo ET

Si el efecto deletéreo sobre el hospedador es inmediato y ocurre como una consecuencia directa de la transposición en sí misma, puede haber una ventaja selectiva sobre los elementos con tasas de transposición reducidas que les permitan expandirse en el genoma, pero a un costo reducido para su hospedador (Brookfield, 1995). La actividad del elemento P en *D. melanogaster* está regulada por productos represores codificados por el mismo elemento. Estos represores se dividen en dos categorías tipo I y II. Los represores tipo I son responsables de una condición celular conocida como citotope P, la cual depende de una proteína de 66 kDa codificada por el elemento que reprime la transposición y excisión (Robertson y Engels, 1989). Los tipo II usualmente presentan grandes deleciones internas y son sensibles a la localización genómica.

En las plantas, el elemento *Ac* presenta efecto de dosis, un aumento en el número de elementos da como resultado una disminución en el número de transposiciones del elemento (McClintock, 1951).

1.2.2.7. Regulación en la expresión de los fenotipos mutantes

Los fenotipos mutantes asociados con algunas inserciones de los retrotransposones están enmascarados por alelos de genes supresores del hospedador que actúan en trans como reguladores de la expresión de los retrotransposones (McDonald, 1995), hay evidencia de ello en poblaciones naturales de *Drosophila* (Csink y McDonald, 1990).

1.2.3. Caracteres inducidos por ET con efecto benéfico sobre el hospedador

Se ha dado un gran debate sobre los efectos beneficiosos o dañinos de los elementos transponibles y su significado a nivel evolutivo. El principal argumento en contra tiene que ver con la naturaleza impredecible de los movimientos de los elementos transponibles unido a la escasez de los sitios de inserción. Sin embargo, cada día aumenta la lista de ejemplos de ET que han evolucionado hacia funciones altamente sofisticadas.

1.2.3.1. Inserciones con funciones reguladoras

Por algún tiempo se ha especulado que los cambios en las regiones reguladoras en cis de los genes duplicados, pueden ser más importantes a nivel evolutivo que mutaciones en las secuencias codificantes. Recientemente se han obtenido datos que sustentan ésta hipótesis; por ejemplo en *Drosophila* tres genes *paired* (*prd*), *gooseberry* (*gsb*) y *gooseberry neuro* (*gsbn*) han evolucionado de un gen ancestral común, luego de la duplicación del gen, ahora cada uno tiene una función diferente durante la embriogénesis. Las tres proteínas correspondientes PRD, GSB y GSBN son factores de transcripción, Li y Noll demostraron que las tres proteínas son intercambiables con respecto a sus funciones reguladoras y que sus distintas funciones en el desarrollo son consecuencia de cambios en las secuencias reguladoras más que en las proteínas en sí mismas (Li y Noll, 1994). Este efecto también ha sido visto en plantas (Wessler y col., 1995) y más recientemente en el *Aedes aegypti* (Tu, 1997). La inserción de un LTR controla la expresión del gen de la oncomodulina de rata (Britten, 1997). La señal de poliadenilación de la timidilato sintasa de ratón está dada por la inserción de un L1, ésta inserción aparentemente, ocurrió hace 5 millones de años, basados en la divergencia de un pseudogen TS el cual también incluye la inserción L1 (Harendza y Johnson,

1990). La inhibición transcripcional del gen del receptor de la eritropoyetina murina está dada por EpoR (Youssofian y Lodish, 1993).

1.2.3.2. Nuevos patrones de expresión en tejidos específicos

Los ETs pueden contribuir a la diversificación de los genes por suministrar dominios reguladores en cis que alteren los patrones de expresión, por ejemplo se ha descrito que la inserción del elemento *gypsy* en una zona corriente arriba del gen *yellow* de *Drosophila* lleva a una pérdida de expresión de éste gen en ciertos tejidos (Pelisson y col., 1994). La alteración en la expresión en determinados tejidos se debe a la presencia de una secuencia específica de ADN que se une a *Su*, el cual se cree que es un factor de transcripción (Gdula y col., 1996). En *Drosophila* la expresión de un retrotransposón solamente en algunos tejidos se demostró en el desarrollo de la lámina (Mozer y Benzer, 1994). Aparentemente, ésta expresión se requería para el desarrollo apropiado del sistema nervioso de las larvas de tercer estadio. Esta expresión específica es una propiedad intrínseca del elemento, es claro que en las moscas actuales el retrotransposón es necesario para el desarrollo normal del ojo.

1.2.3.3. Como mecanismo reparador del ADN

En las levaduras la mayoría de las roturas cromosómicas son reparadas por un proceso normal que involucra RAD52, cuando éste proceso falla por una mutación o por cualquier otra causa los retrotransposones hacen las reparaciones de forma efectiva (Moore y Haber, 1996 y Teng y Gabriel, 1996). En éste caso como en otros se puede ver la coadaptación, éstas roturas pueden representar un buen sitio para la inserción del ET y éstas a su vez en algunas oportunidades pueden ser una forma de reparación más eficiente para el hospedador.

1.2.3.4. Actuar como telómeros

Algunos retroelementos, tales como HET-A, TART, TRAS1 y SART1 como ya se mencionó, tienen la función de reemplazar las terminaciones dañadas de los cromosomas que en otros organismos es hecho por la telomerasa. La frecuencia de inserción de los ETs se ha adaptado para mantener constante el tamaño del cromosoma, éste es el mejor ejemplo de un ET que cumple una función vital para el hospedador.

1.3. Mecanismos de integración

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de integración de los retrotransposones LTR es conocido y está bastante estudiado, ya que es similar al de los retrovirus en cuanto posee los LTR, secuencias encargadas de la regulación y control de la transposición. El ARN genómico de éstos elementos móviles se convierte a ADN de doble cadena por el proceso de transcripción inversa y éste ADN replicado se integra en el ADN de la célula hospedadora de donde puede ser transcrito nuevamente para producir nuevas moléculas de ARN genómico. La síntesis de cada cadena de ADN del retrotransposón empieza con la síntesis de productos cortos de ADN llamados cadena negativa y un ADN de parada cadena positiva. La síntesis de ADN de la cadena negativa es iniciada a partir del grupo 3'-OH de un cebador ARN_t unido al sitio de unión al cebador (primer binding site ó PBS), localizado justo corriente debajo de la secuencia R-U5 del ARN genómico. La síntesis de la cadena positiva se inicia desde un oligoribonucleótido resistente a la ARNasa H que es una secuencia rica en purinas localizada justo corriente arriba de la secuencia 3' U3-R del ARN. El producto final de la transcripción reversa da como resultado una molécula lineal de ADN de doble cadena más larga que el ARN con dos LTR. Este proceso se lleva a cabo en partículas como virus ("virus-like particles ó VPL) donde ocurre además la recombinación mediada por la RT (Xu y Boeke, 1987).

En el caso de los retrotransposones no-LTR o elementos LINE su estructura y secuencia de nucleótidos sugieren que dichos elementos probablemente usen mecanismos de transposición diferentes a los descritos para los elementos LTR y retrovirus. Las evidencias experimentales, que permiten establecer el mecanismo por el cual el transcrito completo de un elemento LINE puede ser transcrito e integrado en otro lugar del genoma que lo hospeda, son relativamente escasas. Sobre la base de que no se habían descrito, aparte de la RT, otras actividades enzimáticas codificadas por los no-LTR y de que sólo se había observado un bajo nivel de homología en un número pequeño de ellos, con integrasa y/o ARNasa H, Eickbush en 1992, postuló un mecanismo de transposición basado en la existencia de extremos 3'-OH libres en el ADN, generados por roturas creadas ocasionalmente y al azar en el cromosoma. Estos extremos libres, servirían como iniciadores para la síntesis de la primera y segunda cadena de ADN a partir del ARN plantilla. Posteriormente, se observó el mejor modelo de transposición de un no-LTR, en el elemento R2Bm de *Bombyx mori*, éste elemento codifica para una sola proteína con actividad tanto endonucleasa específica como RT (Luan y col., 1993). La proteína corta un ADN blanco, generando un 3'-OH que es usado luego por la RT para la transcripción reversa específicamente del extremo 3' del ARN de R2Bm (Luan y Eickbush, 1995). Este mecanismo se puede aplicar a algunos elementos LINE, pero no a los que no son secuencia específicos, para éstos se propone que usarían cortes hechos por endonucleasas celulares (Branciforte y Martínez, 1994). Recientemente, con la demostración de actividad endonucleasa en varios elementos y la conservación en la mayoría de ellos de los aminoácidos del dominio catalítico implicados en dicha actividad, se ha postulado que la nucleasa generaría los cortes en el ADN, luego éste corte sería usado como un cebador para la transcripción inversa del elemento a partir de su extremo 3'. A diferencia de los retrovirus, el reconocimiento del sitio de corte y la transcripción reversa estarían acoplados en éstos elementos (Feng y col., 1996). Moran y colaboradores demostraron una alta frecuencia de retrotransposición de los elementos L1 en cultivos de células de mamíferos y postulan que el complejo formado por la proteína de unión a ácidos nucleicos

codificada por el ORF1 que colocaliza con el ARN de L1 en un complejo citoplásmico de alto peso molecular sería un intermediario en el proceso de retrotransposición (Moran y col., 1996). Análisis mutacional del ORF2 demostró que por lo menos dos funciones son necesarias para la retrotransposición, la actividad RT y una función asociada al dominio rico en cisteínas.

1.4. Trypanosoma cruzi

1.4.1. Generalidades

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado perteneciente a la familia trypanosomatidae. Es un parásito digénico, con un hospedador vertebrado que puede ser el hombre, animales salvajes o domésticos y otro invertebrado representado por insectos pertenecientes al género *Triatoma* y especies relacionadas, actuando a su vez como vectores.

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* es complejo, con tres estadios morfológicamente diferentes, dependiendo del medio ambiente en el cual viva (Fig. 3), la forma epimastigota que se encuentra en el tracto digestivo del vector diferenciándose a tripomastigotes metacíclicos que representan la fase infectiva y no replicativa del parásito y la forma amastigota que se encuentra en las células del hospedador.

Los insectos ingieren tripomastigotes de sangre periférica de mamíferos infectados, los parásitos se multiplican como epimastigotes en el lumen del tracto medio del vector, esto lleva después de 15-30 días al desarrollo de tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto. Las formas infectivas salen con las heces y los tripomastigotes inician la infección entrando por la herida causada por la picadura o a través de laceraciones de la piel o las mucosas. Esta forma de transmisión se llama contaminativa a diferencia de la de tripanosomiasis africana que es inoculativa. Las formas infectivas entran en las



Fig.3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 1 a 3. Formas epimastigotas que se dividen en el intestino del vector. 4. Tripomastigotes metacíclicos infectivos que son eliminados con las heces del vector. 5. Tripomastigotes penetrando en los diferentes tejidos del hospedador donde se convierten a amastigotes. 6 y 7. Los amastigotes pasan nuevamente a tripomastigotes para ir al torrente sanguíneo y reinvasar nuevos tejidos o ser tomados por el vector.

células de los tejidos, especialmente músculo, allí se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican y forman pseudoquistes, convirtiéndose en tripomastigotes, rompiendo la célula y quedando libres para invadir otra célula o ser ingeridos por el insecto vector, cerrando así el ciclo.

1.4.2. Patogenia

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, una tripanosomiasis humana endémica restringida al continente americano que se presenta principalmente en poblaciones rurales de Centro y Suramérica. Se estima que en el mundo existen unos 16 millones de personas infectadas,

con una población de riesgo de 90 millones y 60000 nuevos casos al año, según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1991) y con una mortalidad aproximada de 50.000 fallecimientos anualmente.

La enfermedad de Chagas involucra cuatro fases distintas : período de incubación con proliferación de amastigotes en el interior de las células , paso célula a célula de tripomastigotes y llegada de éstos al torrente sanguíneo, dando lugar en algunos casos a la fase aguda que se presenta generalmente en niños y se caracteriza por el hallazgo de los tripomastigotes en sangre periférica, en la mayoría de casos hay una fase latente donde no hay sintomatología, cursa con baja parasitemia y en 30% de los casos se desarrolla una fase crónica, la cual dependiendo del tropismo del parásito por el tejido puede presentarse con anomalías electrocardiográficas, arritmias, peristalsis o cardiomegalia o megaesófago y megacolon.

1.4.3. Filogenia

La familia trypanosomatidae a la cual pertenece *Trypanosoma cruzi*, está incluida en el orden Kinetoplastidae, que junto con los euglenoides representan el linaje más antiguo de los organismos eucarióticos que contienen mitocondria (Sogin y col., 1989). Dicha mitocondria es única, presentando una matriz en la que existe una compleja red de minicírculos y maxicírculos de ADN (ADN del kinetoplasto) situada adyacente al cuerpo basal del flagelo (Simpson y col., 1987). Dentro de los kinetoplastidos, se reconocen dos tipos de relaciones parásito-hospedador : i) kinetoplastidos monogénicos, los cuales parasitan un único hospedador invertebrado y ii) kinetoplastidos digénicos, los cuales parasitan a dos hospedadores, generalmente, uno invertebrado y otro vertebrado. Se cree que los géneros digénicos tales como *Leishmania* y *Trypanosoma* provienen de un ancestro monogénico (Lake y col., 1988).

1.4.4. Aspectos moleculares

En un principio el interés en el estudio de los tripanosomas se centró en las implicaciones médicas y veterinarias de éstos organismos. Este interés se amplió a aspectos más básicos de su biología y en especial de su biología molecular, cuando se fueron describiendo aspectos únicos que los diferenciaban de los demás eucariotas. Entre éstos aspectos se encuentran la transcripción policistrónica, el trans-splicing y la edición de ARN mitocondrial. Todos éstos aspectos peculiares de la biología molecular de los tripanosomas los hizo aparecer como uno de los modelos de estudio más atractivos para los biólogos moleculares. Por otra parte, se planteó que éstas características inusuales podrían estar contribuyendo a la flexibilidad bioquímica de los tripanosomas.

1.4.5. Cariotipo y tamaño molecular

Actualmente se acepta que el genoma de *T. cruzi* es diploide (Castro y col., 1981) con una complejidad total de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ pb (Lanar y col., 1981). Los cromosomas de los tripanosomas no se condensan durante la mitosis y como consecuencia de ello resulta difícil estimar el número de cromosomas de éste parásito por las técnicas convencionales (Solari, 1980). Sin embargo, experimentos de electroforesis en campo pulsado han permitido realizar estimaciones acerca de la dotación cromosómica de *T. cruzi*. Los diferentes grupos ofrecen datos que van desde los 20 cromosomas (Henrikson y col., 1990) hasta los 250 cromosomas. Esta última estimación fue obtenida por Gibson y Miles cuando hicieron diferentes geles en condiciones variables que permitían mayor resolución de cada uno de los tamaños (Gibson y Miles, 1986).

1.4.6. Estructura genética de las poblaciones de *T. cruzi*

Se ha demostrado que muchas especies de parásitos protozoarios carecen de un ciclo sexual y las poblaciones observadas en la naturaleza representan linajes clonales (Tibayrenc y col., 1990). Estudios de la estructura genética en poblaciones de *T. cruzi* demuestran fijación de heterocigocidad, ausencia de segregación, desviaciones de equilibrio Hardy-Weinberg, así como predominancia o ausencia de determinados genotipos (De Luca D'oro y col., 1993; Henriksson y col., 1990). Estos datos indican la existencia de un predominio de la reproducción asexual y por lo tanto una distribución de la población de linajes clonales también para *T. cruzi*.

1.4.7. Transcripción policistrónica

Algunos estudios han evidenciado que la mayoría de los genes codificantes de proteínas son sintetizados como parte de un transcrito policistrónico primario (Clayton y col., 1992). Estos genes se encuentran organizados en tándem y no parecen contener promotores ni dentro ni en los extremos de sus secuencias. Por lo tanto, su transcripción parece depender de un promotor localizado normalmente varias kilobases corriente arriba del extremo 5' del mensajero. Este promotor, sería por lo tanto, responsable de la transcripción de un policistrón donde se encuentran numerosos preARNm. Hasta el momento, los requerimientos precisos para la actividad promotora de una secuencia en tripanosomátidos permanecen desconocidos, habiéndose caracterizado promotores pertenecientes a dos familias génicas de *T. brucei*, VSG y PARP (Sherman y col., 1991; Gottesdiener y col., 1991), también se sabe que la transcripción no siempre está dada por la ARN polimerasa II (Zomerdiik y col., 1991), no poseen la caja TATA y otros elementos propios de los promotores eucariotas (Vakaar y col., 1994 y Ajioka y Swindle, 1993).

En *T. cruzi* se ha descrito un putativo promotor responsable de la transcripción del gen del SL ("spliced leader") el cual fue capaz de dirigir la expresión de un gen reportador después de la transfección en epimastigotes (Lu y Buck, 1991). Recientemente, en éste putativo promotor se identificó una secuencia de un elemento proximal (PSE) localizada entre las posiciones -53 y -40, la cual se requiere para la actividad óptima del mismo. Esta secuencia está parcialmente conservada entre las diferentes cepas de *T. cruzi* y se han podido identificar dos subgrupos diferentes de PSEs. Este PSE putativo es reconocido específicamente y se une a un factor de transcripción presente en los extractos nucleares de *T. cruzi* (Nunez y col., 1997). También se ha obtenido actividad promotora con un putativo promotor de ARNr en *T. cruzi* (Tyler-Cross y col., 1995). Y han sido utilizados sistemas similares para definir elementos promotores del gen SL en *Leptomonas* y *Leishmania* (Hartree y Bellofatto, 1995; Saito y col., 1994 y Agami y col., 1994).

Hasta hace un tiempo no se sabía como se especificaba el sitio de poliadenilación en tripanosomas puesto que no se habían encontrado secuencias análogas al hexanucleótido AAUAAA característico de los sitios de poliadenilación en otros eucariotas. En éstos últimos años se ha demostrado que el sitio de poliadenilación de un gen corriente arriba ("upstream") está acoplado funcionalmente al trans-splicing del gen corriente abajo ("downstream") (Matthews y col., 1994; Lebowitz y col., 1993). De hecho la selección del sitio de poliadenilación está especificada por la posición del sitio aceptor de splicing. Por lo tanto, secuencias requeridas para el splicing son también requeridas para la poliadenilación y la reacción ocurre de forma secuencial comenzando por la adición del SL y finalizando con la poliadenilación (Ullu y col., 1993).

1.4.8. Edición del ARNm

El otro gran aspecto que diferencia los tripanosomátidos del resto de los eucariotas es la edición del ARNm mitocondrial (Benne y col., 1986; Simpson y Maslov, 1994 y Stuart, 1991). Esta edición del ARNm crea marcos de lectura abiertos en "criptogenes" (genes inicialmente no funcionales) por inserción o deleción de residuos de uridina (U) en unos pocos sitios específicos dentro de la región codificante de un ARNm (edición 5') o en múltiples sitios a través de todo el ARNm (pan-edición). El número preciso y la localización de las uridinas que van a ser insertadas o deleccionadas son determinadas por apareamiento con residuos de A ó G en ARNs especializados denominados ARNs guías (ARNg). Estos ARNg son codificados por los minicírculos presentes en la matriz de la mitocondria, mientras que los criptogenes se encuentran en los maxicírculos de la misma. El proceso de edición ocurre en complejos ribonucleoprotéicos conteniendo ARNg, ARNms y proteínas.

1.4.9. Regulación de la expresión génica

Existen muy pocos datos acerca de los mecanismos implicados en la regulación génica en tripanosomátidos. La similitud entre las unidades de transcripción policistrónica de éstos parásitos y los operones sugiere un mecanismo de regulación similar en ambos casos. Es decir, los genes presentes en una misma unidad de transcripción estarían regulados coordinadamente. Sin embargo, a pesar de que en algunos casos las unidades de transcripción de tripanosomátidos contienen genes relacionados en varias unidades policistrónicas no existe relación alguna entre los genes que la componen. Además en tripanosomas, al contrario de lo que ocurre en procariotas, existen muy pocas evidencias de que exista regulación de la transcripción de éstos policistrones. Solamente se han descrito algunos casos en los que se ha detectado regulación a nivel del inicio de la transcripción (Urményi y col., 1992) y de la elongación (Pays y Steinert, 1990). A pesar de

esto, existe una gran abundancia de ARNms específicos de estadio , así como ARNms que sólo se expresan en determinadas condiciones. En principio, éstas diferencias en la abundancia de determinados ARNms puede ser regulada por trans-splicing, poliadenilación, transporte al citoplasma ó estabilidad. De hecho se conoce que los ARNs mensajeros de las VSG son desestabilizados durante la transformación de las formas sanguíneas a las formas procíclicas (Pays y col., 1990). Además se han descrito varios casos donde los extremos 3' no traducidos de varios genes participan en la regulación de la estabilidad del mensajero (Jefferies y col., 1991; Bhat y col., 1992) así como en la regulación de la traducción (Hehl y col., 1994; Urményi y col., 1992). Otro tipo de regulación es la detectada en el caso de las VSG de *Trypanosoma brucei* (Pays y Steinert, 1988; Gottesdiener y col., 1991; Lodes y col., 1993), donde la expresión de un nuevo antígeno va precedida de un fenómeno de transposición del gen que va a ser expresado desde un lugar silente del genoma a una localización diferente que permite su expresión.

La generación de un ARNm maduro requiere que las secuencias codificantes y sus regiones no traducidas adyacentes sean separadas del transcrito primario. Este proceso está acompañado de dos reacciones de procesamiento del ARN que se encuentran perfectamente acopladas: trans-splicing y poliadenilación:

Trans-splicing es una reacción de procesamiento del ARN en la cual se produce una unión específica entre exones derivados de transcritos diferentes. Este mecanismo está muy relacionado con el proceso donde los intrones son eliminados de pre-ARNms en otros eucariotas (Hajduk y col., 1992). En la figura 4 puede verse un esquema comparativo de ambos procesos. En ambos casos se requiere de la presencia de los snARNs U2, U4, U5 y U6, sin embargo, en la reacción de trans-splicing el U1 parece ser sustituido por el propio SL ARN. La diferencia fundamental entre ambos procesos reside en el que el sustrato para el trans-splicing no es un único ARN, tal y como ocurre en el cis-splicing sino que son dos, un ARN pequeño no poliadenilado, el ARN

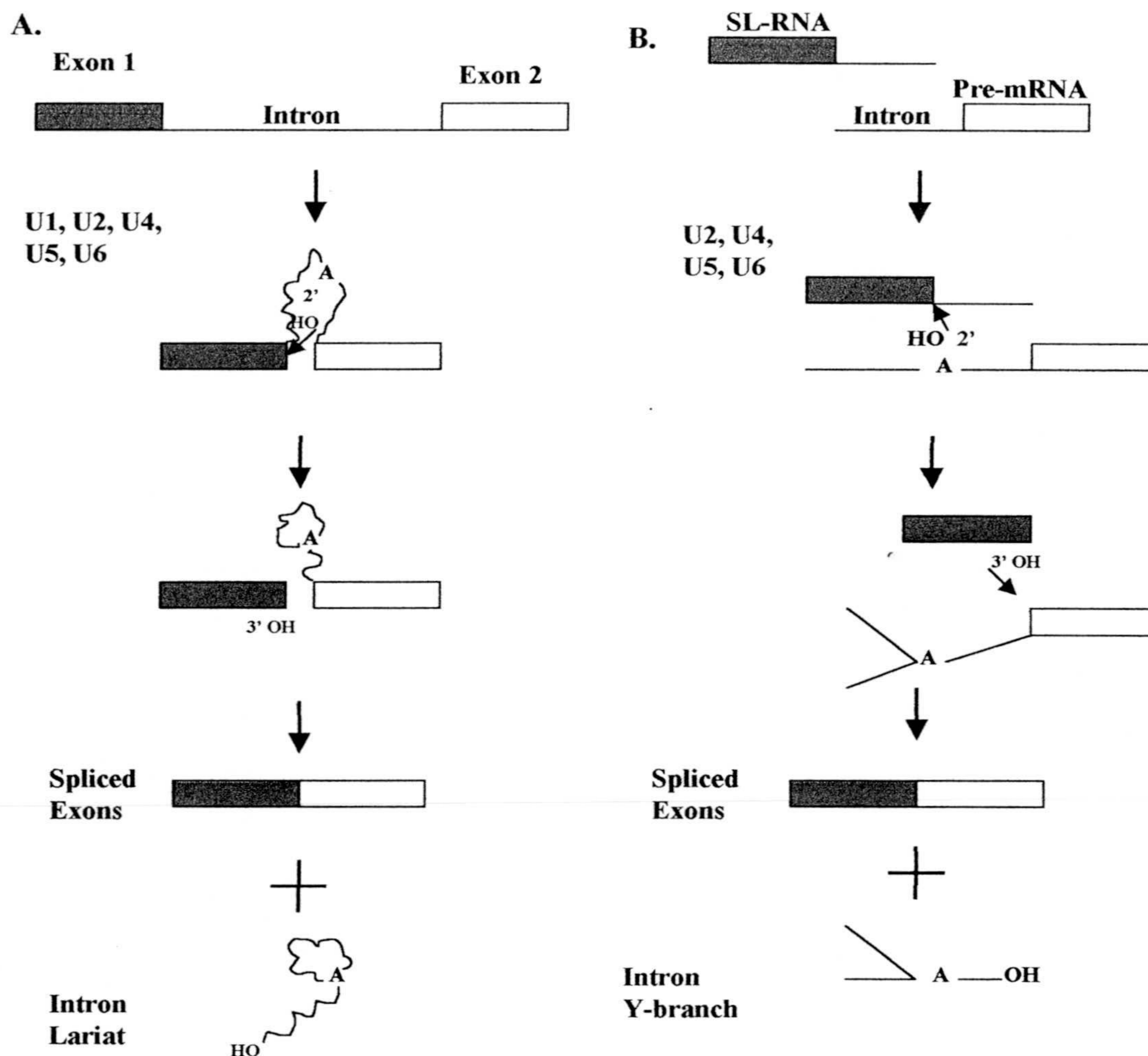


Fig 4. Esquema comparativo de los mecanismos de Cis y trans-splicing. A) El cis-splicing de exones contiguos requiere en la mayoría de los eucariotas del ensamblaje de un spliceosoma conteniendo los ARNsns U1, U2, U4, U5 y U6. Como resultado de la reacción se produce una estructura denominada lariat. B) La reacción de trans-splicing en tripanosomas también requiere la presencia de los ARNsns U2, U4, U5 y U6, mientras que el SL-ARN parece sustituir funcionalmente a U1. La reacción produce como producto secundario una estructura denominada "Y-branch".

spliced leader (codificado por el gen del miniexon), que contiene el exon 5' (SL) además del sitio donante de splicing y el segundo es el pre-ARNm aceptor, el cual contiene el sitio aceptor de splicing y el exon 3'. El ARN SL y el pre-ARNm quedan asociados en el núcleo en un complejo similar al spliceosoma presente en la reacción de splicing de la mayoría de los eucariotas. El SL es entonces añadido al extremo 5' del ARNm. Dado que el ARN SL contiene en 5' una estructura de caperuza ("cap"), los ARNm quedan automáticamente protegidos en su extremo 5' por ésta señal. El procesamiento por trans-splicing parece ser una etapa obligatoria en la maduración de todos los ARNms de tripanosomátidos (Nilsen y col., 1994). Aunque recientemente, se han descrito en *T. brucei* transcritos del retrotransposón *ingi*/RIME que no presentan SL (Vasella y col., 1996)

1.5. Elementos móviles en tripanosomátidos

Se ha reportado la presencia de retrotransposones para algunas especies de tripanosomátidos. Por ejemplo, el elemento RIME en el subgénero *Trypanozoon* representa una familia de secuencias medianamente repetida (Hasan y col., 1984). Las dos mitades del elemento RIME se encuentran flanqueando el elemento *ingi* (también llamado TRS) el cual está ampliamente distribuido en determinados sitios del genoma de *T. brucei* (Kimmel y col., 1987). SLACS está a su vez, presente en el tripanosoma africano, pero a diferencia de RIME, *ingi* y la mayoría de otros retrotransposones parece estar presente en un solo locus, en los genes del ARN SL. El elemento CREI (Gabriel y col., 1990) se integra en el ARN de los genes SL en el tripanosomátido de mosquitos *Crithidia fasciculata*. En *T. cruzi* también se ha caracterizado un retrotransposón, el CZAR en el ARN de los genes SL (Villanueva y col., 1991). A diferencia de RIME e *ingi* los cuales están presentes en cerca de 400 copias, hay solamente de 20 a 30 copias de los elementos asociados al SL por genoma diploide, además es interesante notar que los tres se insertan en el mismo sitio blanco, ya que todos interrumpen la

secuencia codificante entre los nucleótidos 11 y 12. Además, se han encontrado retrotransposones asociados al SL en el tripanosomátido de insecto *Herpetomonas samuelpessoai* y en un tripanosoma de rana el *T. ranarum* (). El análisis cromosómico sugiere que éstos retrotransposones están localizados primariamente en el mismo locus que los genes SL. Así, la organización de la familia de genes SL en los diferentes tripanosomátidos es similar estando las unidades codificantes organizadas en repeticiones en tándem e interrumpidas por 20 a 30 copias de retrotransposones de una forma sitio-específico.

Basados en la organización estructural y en la conservación de dominios específicos estos retrotransposones de tripanosomátidos parecen pertenecer a una misma familia de elementos móviles (Fig. 5). Cada uno de los elementos contiene uno o dos marcos de lectura abiertos, el análisis del ORF2 muestra que además de poseer los ocho dominios conservados de la RT, contienen un motivo conservado cisteína-histidina en la zona 5', similar al identificado para las endonucleasas de retrovirus (Villanueva y col., 1992). Mientras que CRE1 tiene un único marco de lectura abierto similar al 2 de SLACS y CZAR, éstos últimos tienen un ORF adicional que es el ORF1. Este ORF1 tiene un motivo conservado de cisteínas-histidinas diferente al mencionado anteriormente, siendo similar al dominio *gag* de los retrovirus, éste motivo también está presente en el ORF1 de *ingi* (Pays y Murphy, 1987).

A pesar de éstas similitudes que hacen pensar en ellos como una familia de retrotransposones evolutivamente relacionados, SLACS y CZAR son más similares entre ellos que con CRE1, lo cual está de acuerdo con la relación evolutiva que hay entre los organismos en los cuales ellos están presentes, ya que análisis mitocondriales revelan que *T. brucei* y *T. cruzi* están evolutivamente más cercanos que *Crithidia* (Lake y col., 1988). Además ambos tripanosomas son heterogéneos, requiriendo un hospedador vertebrado y un insecto vector, mientras que *Crithidia* es monogénica con todo su ciclo dentro del insecto. Así que los retrotransposones de tripanosomátidos pueden

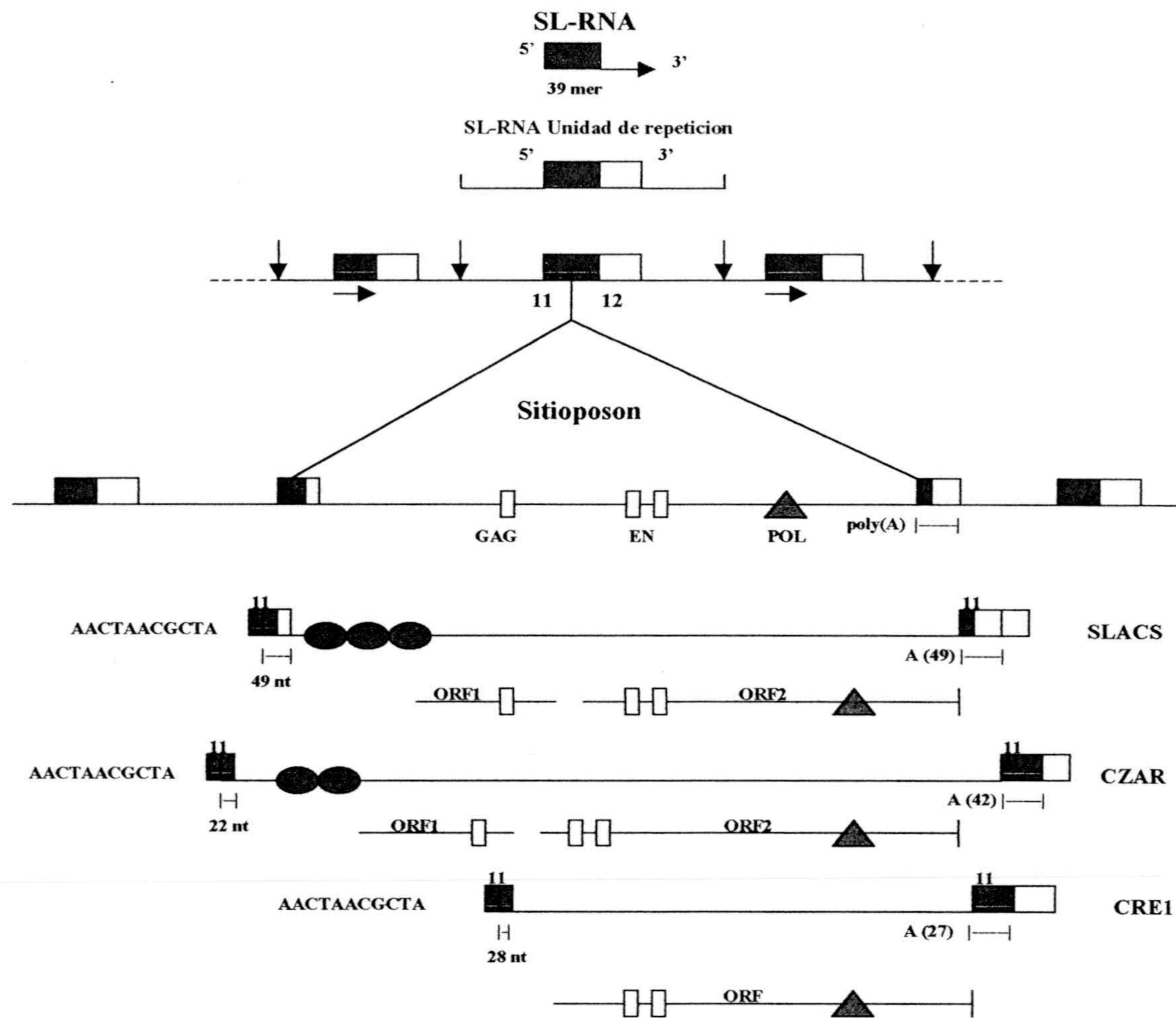


Fig. 5. Transposones no-LTR sitio específico o sitioposones de tripanosomátidos. ■ SL. Los transposones interrumpen en la secuencia conservada del gen SL en el nucleótido 11 de los 39. Las inserciones de los elementos generan abundantes duplicaciones del ADN blanco (denotadas por barras en los extremos: 49 nt en SLACS, 22 en CZAR y 28 en CREI. Todos éstos elementos poseen una cola de poliA en su extremo 3', longitud entre paréntesis. SLACS y CZAR son similares en su organización, presentando un motivo repetido de 185 pb ó en la zona 5' no traducida ● . En *T. brucei*, el ORF1 se separa del 2 por 79 nt y en *T. cruzi* por 78. CZAR y SLACS conservan el motivo *gag* característico de retrovirus. CREI posee solamente el ORF similar al 2 de SLACS y CZAR basado en su tamaño y organización. Los tres presentan alta homología con el dominio *pol*.

ser tan antiguos como sus hospedadores y las diferencias entre éstos retrotransposones reflejarían la evolución de los elementos en cada genoma.

ser tan antiguos como sus hospedadores y las diferencias entre éstos retrotransposones reflejarían la evolución de los elementos en cada genoma.

Elementos móviles en *Trypanosoma cruzi*

En *Trypanosoma cruzi* únicamente se han descrito dos retrotransposones el ya mencionado CZAR (Villanueva y col., 1991) y el L1Tc (Martín y col., 1995). Los dos retrotransposones presentan diferencias en cuanto al sitio de inserción, dado que CZAR es sitio específico mientras L1Tc no lo es, la organización y la secuencia de aminoácidos también es diferente. Como se mencionó anteriormente CZAR presenta dos ORF el primero con homología a *gag* y el segundo con los genes *pol* de retrovirus, está presente en un bajo número de copias y no presenta versiones truncadas del elemento.

L1Tc

Este elemento está presente en un alto número de copias del orden de 2500, distribuidas de forma dispersa en el genoma de *Trypanosoma cruzi* y se expresa únicamente en las formas replicativas del mismo, con un tamaño aproximado de 5 kb y una organización en tándem al igual que el elemento *ingi*, siendo los únicos retroelementos no-LTR que la presentan. El transcrito presenta en su zona 3' una secuencia de ADN altamente repetida llamada E12A (Requena y col., 1994) y en su zona 5' una secuencia con homología con el elemento RIME de *T. brucei* (Hasan y col., 1984) y tres ORFs en diferente fase de lectura (Fig. 1), donde el ORF1 codifica para una proteína con homología a las proteínas AP (nucleasas apurínicas/apirimidínicas de actividad reparadora), conteniendo todos los residuos activos descritos para la exonucleasa III y el 80% de los residuos activos de la ADNasaI humana y bovina (Martín y col., 1995), homologías similares se hacen extensivas a todos los elementos LINE descritos (Martín y col., 1996). La actividad endonucleolítica codificada por el L1Tc ha sido demostrada bioquímica y

biológicamente (Olivares y col., 1997). El ORF2 mantiene conservados los siete dominios consenso de las transcriptasas inversas (RT), siendo el elemento *ingi-3* de *T. brucei* el más relacionado y presentando un residuo de alanina en la posición X del dominio catalítico Y/FXDD similar a los otros no-LTR a diferencia de los aminoácidos hidrofóbicos descritos para los LTR. Otro aspecto que diferencia a L1Tc de los demás no-LTR retrotransposones es su dominio de unión a ácidos nucleicos, presente en el ORF3 a diferencia de los demás que lo presentan en el ORF1. Este dominio posee los *Zinc-finger* en su estructura, pero es C₂H₂ similar a los factores de transcripción del tipo TFIIIA-like (Miller y col., 1985; Berg, 1986) y diferente de los descritos para los retrotransposones, sólo 4 no-LTR presentan éste tipo de *Zinc-finger*, tres de ellos descritos en la familia trypanosomatidae CZAR, SLACS e *ingi* y otro en el R2Bm de *Bombyx mori*. De todos ellos solo *ingi* lo presenta en el extremo 3' al igual que L1Tc.

Como se mencionó anteriormente, la zona 5' del L1Tc presenta homología con el retrotransposón RIME de *Trypanosoma brucei* cuya inserción ha estado implicada en procesos de actividad génica en determinadas regiones (Pays y col., 1989) y dado que L1Tc no presenta *spliced-leader* (SL) en su zona 5' y es un retrotransposon no-LTR no específico de sitio es factible pensar que ésta zona puede estar actuando como un promotor interno. Todas éstas características unidas a los posibles papeles a nivel de regulación génica y las implicaciones biológicas que se han descrito para los elementos móviles hacen importante el análisis funcional del retrotransposón L1Tc, principalmente a nivel de su actividad Transcriptasa inversa la cual determina la funcionalidad de éstos elementos y la posibilidad de que la zona 5' del mismo esté actuando como promotor interno.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El retrotransposón de la clase no-LTR descrito en *Trypanosoma cruzi*, L1Tc fue caracterizado genéticamente en nuestro laboratorio, presentando las secuencias consenso propias de los retroelementos.

Dado que la mayoría de los elementos transponibles son inactivos y la importancia que supondría para *Trypanosoma cruzi* su actividad, el objetivo principal de la presente tesis es:

Caracterizar y analizar en su caso las actividades asociadas al elemento L1Tc necesarias para su transposición y demostrar la actividad promotora de la región 5' del citado elemento.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. Productos químicos

En general se utilizaron reactivos procedentes de las firmas Merck, Sigma, Boehringer, Pharmacia, Carlo Erba, Stratagene, Amersham y Bio-Rad, principalmente. Las membranas de nylon y nitrocelulosa se obtuvieron de Bio-Rad y Millipore respectivamente. Las películas autoradiográficas utilizadas fueron de las casas Kodak y Agfa. Los productos usados con marcaje radiactivo fueron principalmente de la casa Amersham.

3.1.2. Medios de cultivo.

- Medio LB líquido: Bactotripton 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g y agua destilada hasta 1 litro, pH 7,5.
- Medio LB agar: medio LB líquido y agar al 15% (p/v).
- Medio LIT: NaCl 4 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15g, glucosa 2 g, infusión de hígado 3 g, tripton 5 g, hemoglobina 2 g, llevar con H_2O destilada hasta 1 litro.
- Medio DMEN: de la casa comercial GIBCO, suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado.

3.1.3. Tampones

- Tampón de carga 10X : glicerol 70% (v/v), sarcosil 5%, azul de bromofenol (BPB), xilencianol 2% (p/v), EDTA 0,1 M pH 8.

- Tampón fosfato salino (PBS) : NaCl 0,13 M, Na₂HPO₄ 70 mM, NaH₂PO₄ 3 mM pH 7,2.
- Tampón SSC 20X : NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M pH 7,2.
- Tampón TBE 10X : Tris-HCl 89 mM pH 8,3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM
- Tampón TAE 50X : Tris-HCl 2 mM pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8, bromuro de etidio 10 mg/ml, ácido acético hasta pH 7,2 y agua destilada hasta 1 litro.
- Tampón TE : Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM

3.1.4. Soluciones

- Mezcla clorofórmica : Cloroformo : alcohol isoamílico en proporción 24:1
- Fenol : el fenol destilado se saturó y equilibró con Tris-HCl 0,1 M pH 8. En el momento de utilizar se añadió 8-hidroxiquinoleína hasta 0,1% y se almacenó a 4°C.
- Solución Denhardt 50X : Ficoll 5 g, polivinilpirrolidona 5 g, albúmina sérica bovina 5 g y agua destilada hasta 500 ml.
- Formamida : se desionizó por agitación suave durante 20 minutos en presencia de la resina de intercambio iónico AG501-X8, hasta pH 7.

- ADN de esperma de salmón : solución madre 10 mg/ml en agua destilada, se hirvió la solución durante 10 minutos y se fragmentó el ADN por sonicación o pasando por aguja. Se almacenó en alícuotas a -20°C .

- Bromuro de etidio : se preparó una solución madre a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada.

3.1.5. Patrones de peso molecular

3.1.5.1. Geles de ADN

- ADN de fago lambda (c1857, ind1, Sam7) digerido con HindIII (Daniels y col., 1983). Fragmentos obtenidos : 23130, 9416, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

- ADN del fago ϕX174 digerido con HaeIII (Fuchs y col., 1978). Fragmentos obtenidos : 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb.

Todos ellos fueron suministrados por la casa comercial Boehringer.

3.1.5.2. Geles de ARN

RNA markers suministrado por la casa comercial Promega. Los tamaños de los ARN sintéticos son : 9488, 6225, 3911, 2800, 1898, 872, 562 y 363 pb.

3.1.5.3. Geles de proteínas

- Protein MWM Mid range” de Promega : los tamaños de las proteínas son : 97400, 66200, 55000, 42700, 40000, 31000, 21500/19700 y 14400 Daltons.

- “Prestained protein MWM” de Bio-Rad : los tamaños de las proteínas son: 104000, 81000, 47700, 34600, 28300 y 19200 Daltons.

Los pesos moleculares pueden variar ligeramente dependiendo del lote.

3.1.6. Parásitos

Las cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas fueron la Y (Silva y Nussenzweig, 1953) y Tulahuén (de Lange y col., 1984).

3.1.7. Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron:

- XLI-B : *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F' [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)]*
- GM119 : *F⁻ thr-1 leu-6 proA2 his-4 metB1 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 str-31 tsx-33 thi-1 thyA21 dam dcm sup-37.*
- Topp1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 : *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80ΔlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ar, leu)7697 galU galK λ-rpsL(streptomycin^r) endA1 nupG.*
- M15 : *Nal^s Str^s rif^s, lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺.*
- MIC 3001 : *F⁻ supE44 supF58 lacY1 trpR55 galK2 galT22 metB1 hsdR14 (r_k⁻ m_k⁻) rnh-339:: cat recB270*

3.1.8. Vectores de transformación

Los plásmidos utilizados fueron:

- pBluescript : pBSKS (Stratagene), utilizado para clonaje y secuenciación tiene un peso molecular de 2958 pb.
- pTEX : utilizado para transformación de parásitos, tiene un peso molecular de 5600 pb (Kelly y col., 1992).
- pTrcHis (Invitrogen) : utilizado para la expresión de proteínas, tiene un peso molecular de 4400 pb.
- pQE (Qiagen) : usado para la expresión de proteínas, tiene un tamaño de 3462 pb.

3.1.9. Péptidos

Los péptidos sintéticos usados para la obtención de antisueros policlonales producidos en conejos fueron:

- 4998 : SYLCISEPQNNNESAATSTSGSS
- 5001 : SYRPISLTSIVSKVAEKMVLKRLLLWWWT
- 5007 : LLNSFAGVTADMYADDLSIIVK
- 5011 : VDAYTKDYGITESSPREERFFRS

3.2. METODOS

3.2.1. Cultivos “in vitro” de *Trypanosoma cruzi*

3.2.1.1. Cultivo de formas epimastigotas

Para el cultivo de las formas epimastigotas se empleó el medio LIT, suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado a 56°C durante 30 minutos. El cultivo se llevó a cabo en frascos de 25 cm² en 5 ml de medio con un inóculo inicial de 10⁵ - 10⁶ parásitos/ml. Las condiciones de crecimiento fueron agitación suave a 28°C. Con el objeto de mantener los cultivos en fase logarítmica de crecimiento, se realizaron resiembras cada cinco días.

3.2.1.2. Cultivo de formas tripomastigotas y amastigotas

La obtención de formas tripomastigotas se realizó mediante la infección “in vitro” de cultivos de células epiteliales de la línea LLC-MK₂ (Andrews y Colli, 1982). Se partió de cultivos de las células crecidas a 37°C en una atmósfera de un 5% de CO₂ en frascos de 75 cm², con medio DMEN (Gibco) suplementado con un 10% de suero bovino fetal e incubados hasta la formación de una monocapa de células semiconfluentes. Estos cultivos se infectaron con una proporción de tripomastigotes 3:1 por célula. Al cuarto día de incubación se recogieron del sobrenadante las formas tripomastigotas del parásito y se lavaron tres veces con solución salina PBS (0,13 M de NaCl, 70 mM de Na₂HPO₄ y 3 mM de NaH₂PO₄ pH 7,2). La recolección de tripomastigotes se realizó cada 24 horas.

Las formas amastigotas extracelulares se obtuvieron a partir de tripomastigotes. Para ello, se incubaron en medio LIT a 37°C y 5% de CO₂ (Andrews y col., 1987). A las 36 horas de incubación han virado más del 90%

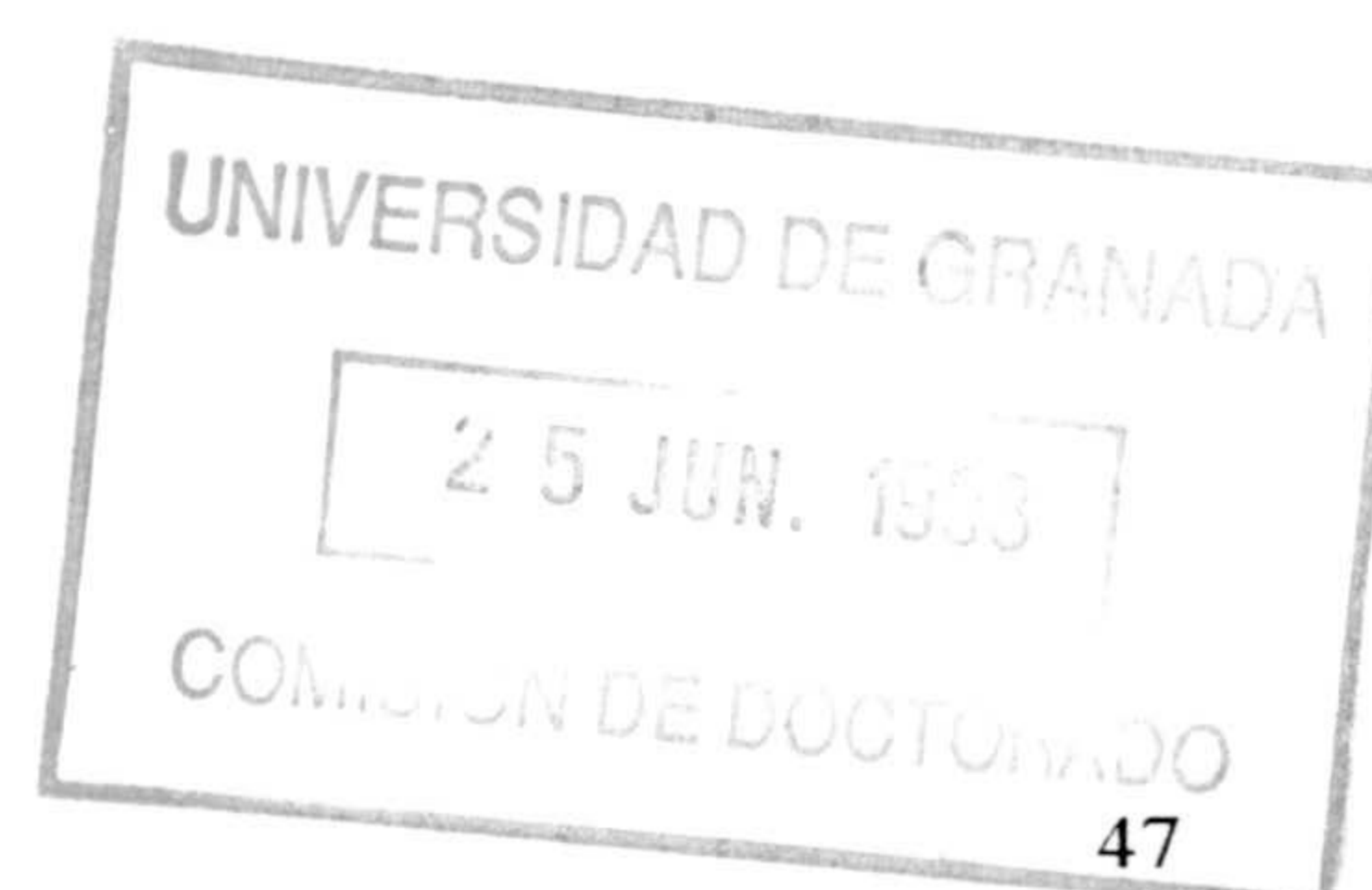
de las formas tripomastigotas a formas amastigotas y es cuando se procedió a recolectarlas.

3.2.2. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.

3.2.2.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico de cultivos de *Trypanosoma cruzi* mantenidos "in vitro" a 28°C, se llevó a cabo a partir de 10⁷ parásitos/ml. Los parásitos se recogieron por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Luego del último lavado, se resuspendieron en 8,5 ml de una solución fría que contenía NaCl 0,15 M y EDTA 0,1M. Inmediatamente se adicionó proteinasa K (0,1mg/ml) y SDS (0,5%) y se incubó durante 30 minutos a 50° C. Transcurrido éste período, las muestras de ADN se extrajeron sucesivamente con fenol, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se precipitó añadiendo 0,1 volumen de acetato sódico 3 M pH 6,25 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. En éstas condiciones el ADN genómico forma una red blanquecina visible. Esta red se recogió con una pipeta pasteur, se lavó con etanol al 70% frío y se secó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 2 horas. El ADN se resuspendió en agua o TE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). El ARN contaminante fue digerido con 20 µg/ml de ARNasa pancreática.

Finalmente, el ADN se extrajo nuevamente con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se precipitó con 0,5 volúmenes de acetato amónico 7,5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Su concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50 µg de ADN/ml.



3.2.2.2. Aislamiento y purificación de ADN de plásmidos

Para la purificación de ADN de plásmidos se siguieron dos métodos, para chequeo de plásmidos recombinantes se utilizó el de lisis alcalina descrito por Sambrook (Sambrook y col., 1989) y para secuenciación el kit Wizard minipreps ADN purification system de Promega. Para la obtención de los plásmidos en grandes cantidades, se utilizó el kit Wizard maxipreps ADN purification system de Promega siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Método de lisis alcalina: se partió de cultivos bacterianos crecidos hasta saturación, durante 16 horas a 37°C con agitación y en un medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Las células se recogieron por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 minutos, se resuspendieron en 1 ml de STE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM y 0,1M de NaCl) frío, se centrifugaron a 6 000 g durante 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió completamente en 250 µl de una solución fría de glucosa 50 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8, incubándose en hielo durante 10 minutos. Las bacterias se lisaron con 500 µl de una solución de NaOH 0,2 N y SDS 1% (p/v), durante 5 minutos en hielo. Se añadieron 750 µl de una solución fría de acetato sódico 4 M y ácido acético 2 M, se agitó vigorosamente y se dejó en hielo durante 10 minutos. El precipitado resultante se eliminó mediante centrifugación a 12000g durante 5 minutos a 4°C. El ADN plasmídico presente en el sobrenadante se precipitó con 700 µl de isopropanol, se centrifugó a 12 000 g durante 10 minutos, se descartó totalmente el alcohol, para la eliminación del ARN bacteriano contaminante el precipitado se resuspendió en 250 µl de TE con 10 µg/ml de ARNasa libre de ADNasa durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plásmido finalmente se precipitó con 300 µl de una solución de isopropanol al 88% y acetato de potasio 0,2 M y con centrifugación a 12 000g

durante 5 minutos, el ADN precipitado se secó al vacío y se resuspendió en H₂O bidestilada.

3.2.2.3. Aislamiento y purificación de ARN

Para la purificación del ARN se partió de un cultivo de parásito en fase logarítmica de crecimiento con una concentración de 10⁷ ó 10⁸ parásitos/ml que se recogieron por centrifugación en frío a 4 000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se lavó con 1 ml de PBS frío, resuspendiéndose en 1 ml de PBS frío con NP40 al 10% hasta una concentración final de 1% de NP40. Se mezcló por agitación y se centrifugó rápidamente a 12 000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los núcleos. El sobrenadante se extrajo sucesivamente con fenol frío, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN se precipitó con acetato sódico 3 M pH 6,25 y etanol absoluto dejándose a -20°C durante por lo menos 30 minutos. Luego se centrifugó a 12 000 g durante 30 minutos a 4°C y se lavó con etanol frío al 70%. Finalmente el ARN se resuspendió en H₂O bidestilada. Todas las soluciones empleadas en ésta purificación se prepararon con H₂O bidestilada estéril y tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1% para la eliminación de ARNasas, además el material utilizado también se trató con DEPC antes de su esterilización.

3.2.3. Separación de ácidos nucleicos según su tamaño.

3.2.3.1. Separación y visualización de moléculas de ADN.

La separación de los fragmentos de ADN se realizó sobre geles de agarosa de una concentración entre 0,7 – 2 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en agua destilada,

calentándola hasta ebullición. Posteriormente se enrasó al volumen final deseado añadiendo agua destilada y TAE 50X para una concentración final de TAE 1X (Tris-HCl 40 mM pH 7,2, EDTA 1 mM pH 8, ácido acético hasta pH 7,2). Por último se añadieron 0,2 mg/ml de bromuro de etidio. Para cargar las muestras en el gel se utilizó como tampón de carga de alta densidad el descrito como de tipo II por Sambrook y colaboradores (Sambrook y col., 1989) que contenía azul de bromofenol 0,25 %, xilenocianol FF 0,25%, Ficoll (tipo 400 de Pharmacia) 15%. Se utilizó como tampón de electroforesis el TAE 1X. Las condiciones de la electroforesis fueron 7V/cm durante 3 horas ó 1,5V/cm durante toda la noche.

La visualización de los ácidos nucleicos se realizó con luz ultravioleta (366 nm). La fotografía del gel se llevó a cabo con una cámara Polaroid con filtro rojo oscuro y naranja y película Polaroid 665 y con el sistema gelprinter (TDI).

3.2.3.2. Separación y visualización de ARN

Para la separación de distintas moléculas de ARN se utilizó la técnica de electroforesis de geles de agarosa-formaldehído, (Sambrook y col., 1989). Como tampón de electroforesis se utilizó ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) 20 mM pH 7, acetato sódico 5 mM pH 6,25, EDTA 1 mM pH 8. Los geles de agarosa se prepararon al 1% (p/v) con el mismo tampón, más la adición de 16,7 ml de formaldehído al 37% por cada 100 ml de solución .

Las muestras se prepararon mezclando en un tubo de microcentrífuga el ARN resuspendido a la concentración deseada, 6 μ l de formaldehído y 15 μ l de formamida desionizada. Las muestras se desnaturalizaron a 65°C durante 10 minutos, inmediatamente se enfriaron en hielo y se les añadieron 3 μ l de tampón de carga (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol

0,4%(p/v), xilencianol 0,4% (p/v) y bromuro de etidio 1 mg/ml). Las condiciones de electroforesis fueron 7V/cm durante 3 horas.

3.2.4. Análisis de ácidos nucleicos

3.2.4.1. Inmovilización de ácidos nucleicos

Con la transferencia del ADN y el ARN separados en los geles de agarosa, a una matriz inmovilizante, se obtienen réplicas exactas inmovilizadas de las macromoléculas separadas y de ésta forma se pueden detectar por hibridización con sondas específicas.

3.2.4.1.1. Transferencia e inmovilización de ADN a soportes sólidos, "Southern blot"

Se siguió el método de Southern (Southern, EM., 1975), para la transferencia de ADN tanto a papel de nitrocelulosa como a nylon. Previo a la transferencia y una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en HCl 0,25 M durante 20 minutos, con agitación suave, ésto con la finalidad de producir una fragmentación de las moléculas que mejore la eficiencia de la transferencia. A continuación, el ADN se desnaturalizó sumergiendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M con agitación suave durante 30 minutos. Finalmente, se lavó ligeramente con agua destilada y se neutralizó con una solución de NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M pH 8.

La transferencia se realizó utilizando como tampón SSC 10X (NaCl 1,5 M y citrato trisódico 0,15 M), durante 4 a 12 horas, según el tamaño de los fragmentos a transferir y el porcentaje de agarosa del gel. El montaje de la transferencia es tal y como se describe en Sambrook y colaboradores (Sambrook, y col., 1988). Una vez finalizada la transferencia, se lavó el filtro

con SSC 2X y se dejó secar primero al aire y luego durante 2 horas en un horno a vacío y 80°C. De ésta manera, el ADN quedó unido al filtro y se guardó hasta su uso.

3.2.4.1.2. Transferencia e inmovilización de ARN a soportes sólidos “Northern blot”

El método empleado en la transferencia del ARN a soportes sólidos, fue el método alcalino. Una vez realizada la electroforesis de ARN se dejó el gel unos minutos en la solución de transferencia (NaOH 50 mM), posteriormente se montó la transferencia usando una membrana de nylon sin tratamiento previo solamente humedecida en agua bidestilada. Una vez finalizada la transferencia la membrana se lavó en SSC 2X, dejándose secar al aire, el ARN se fijó a 80°C durante 2 horas.

3.2.4.2. Marcaje de fragmentos de ADN con isótopos radiactivos

3.2.4.2.1. Marcaje de ADN de cadena doble

El ADN se marcó mediante la técnica de hibridización de los cebadores al azar (“random primer”) usando como precursor radiactivo dCTP α -³²P y la enzima KLenow polimerasa del kit de la casa comercial Boehringer, el protocolo seguido es el suministrado por dicha casa. Una vez finalizada la reacción, para separar los nucleótidos radiactivos no incorporados al ADN marcado, la mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-50. El ADN marcado y libre de nucleótidos se eluyó en 100 μ l en un tubo de microcentrífuga. Con 1 μ l del eluido se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido Packard 1900.

3.2.4.2.2. Marcaje de ADN en cadena simple

El marcaje de oligonucleótidos se llevó a cabo mediante la transferencia de grupos γ fosfato del ATP a su extremo 5'-OH. Esta reacción está catalizada por la enzima Polinucleótido Kinasa del fago T4. La fosforilación del extremo 5'OH de los oligonucleótidos se realizó usando $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10 mCi/ml, 200 μCi totales) en presencia del tampón suministrado por la casa comercial, más 10 mM de ATP, 100 ng de oligonucleótido y 10 U de la enzima, la reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C. El ADN marcado se separó de los nucleótidos libres mediante el uso de columnas de Sephadex G-25. Finalmente se midió la incorporación de radiactividad en 1 μl del eluido.

3.2.4.2.3. Marcaje de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Basándonos en la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), se utilizó un método que permite el marcaje de ADN de doble cadena usando la Taq ADN polimerasa (Boehringer)

La reacción se llevó a cabo usando:

ADN	10 ng
dNTPs	25 μM c/u
Tampón de la reacción 10x	10 μl
Cebadores	50 pmoles c/u
(α - ^{32}P)dCTP 3000 Ci/mmol	100 μCi
Agua destilada hasta	100 μl
Taq ADN polimerasa	5 U

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400 y se usaron 30 ciclos, donde el tiempo de unión dependió de los cebadores utilizados. Una vez finalizados los ciclos, las muestras fueron purificadas por columnas de Sephadex G-50 y se midió la cantidad de ^{32}P incorporado utilizando un contador de centelleo. Las bandas se visualizaron tanto por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio como por autoradiografía.

3.2.4.3. Detección de secuencias específicas sobre soportes sólidos

3.2.4.3.1. Con sondas de ADN de cadena doble

Después de secar los filtros durante dos horas a 80°C y vacío, éstos fueron prehibridados al menos durante dos horas a 42°C en una solución de 50% de formamida, SSC 6X, Solución de Denhardt's 5X, tampón fosfato 50 mM pH 6,8 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado. Posteriormente los filtros se hibridaron con la sonda radiactiva correspondiente, previamente desnaturalizada por calor, en la misma solución anterior, la hibridación se llevó a cabo a 42°C con agitación suave durante al menos 18 horas.

Transcurrido el tiempo de hibridación, los filtros se lavaron 2 veces , durante 10 minutos en solución SSC 2X y SDS 0,1% a 42°C , a continuación se hicieron dos lavados a 65°C de 15 minutos cada uno, en una solución de SSC1X - SDS 0,1%, y SSC 0,1X – SDS 0,1% respectivamente.

Finalmente los filtros se colocaron en plástico y se expusieron con una placa radiográfica a -70°C y después de diferentes tiempos dependiendo del marcaje de la sonda y de lo esperado se revelaron en un revelador Curix 60 de Afga.

3.2.4.3.2. Con oligonucleótidos

La prehibridación de las membranas se llevó a cabo en 10 ml de una solución de 5X SSC, 20 mM NaH₂PO₄ pH 7, 7% SDS (p/v), 10X Denhardt's, 10% dextran sulfato y 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado, el tiempo de prehibridación fue de al menos 4 horas a 50°C.

Los filtros se hibridaron posteriormente, en la misma solución anterior a 50°C durante 24 horas, con la sonda radiactiva correspondiente, previamente desnaturalizada por calor.

Transcurrida el tiempo de hibridación, las membranas se lavaron a 50°C primero en una solución de 3X SSC, 10X Denhardt's, 5% SDS (p/v) y 25 mM NaH₂PO₄ pH7,5 durante 30 minutos y finalmente en una solución de 1X SSC y 1% SDS (p/v), durante 30 minutos más.

Posteriormente los filtros se expusieron en instantimager (H. Packard) o con placa radiográfica como se indica en el apartado anterior.

3.2.5. Clonaje de fragmentos de ADN

El clonaje de fragmentos concretos de ADN se realizó aislando el fragmento deseado mediante el uso de enzimas de restricción y tratándolo luego con otras enzimas dependiendo de cada caso como se describe a continuación:

3.2.5.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones del ADN con enzimas de restricción se llevaron a cabo según las condiciones especificadas por el fabricante en cada caso (tampón de

reacción y temperatura), siendo la relación unidades de enzima/ μg de ADN a digerir generalmente mayor de 2, el volumen de reacción osciló entre 10 y 20 μl y el tiempo de incubación entre 1 a 3 horas.

En el caso de digestiones dobles, si las condiciones de incubación eran compatibles se añadieron las enzimas conjuntamente, en caso contrario, tras la primera digestión del ADN y previa comprobación de una alícuota mediante electroforesis en agarosa, del grado de digestión logrado con la primera enzima, se hizo una extracción con fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitó con etanol y se procedió a la siguiente digestión.

3.2.5.2. Elución de ADN de geles de agarosa

Los distintos fragmentos requeridos para su posterior clonaje u otra utilización, una vez separados en geles de agarosa e identificados, se recuperaron mediante corte de la banda correspondiente, elución y unión a un intercambiador aniónico en una matriz sólida (kit de gen-clean, Stratagene).

3.2.5.3. Defosforilación de los extremos 5'

Los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos usados en el clonaje se eliminaron por tratamiento del ADN con fosfatasa alcalina de intestino de ternera, la reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C, en el mismo tampón en que se realizó la digestión. Las endonucleasas de restricción se inactivaron previamente a 70°C durante 5 minutos. Una vez defosforilado el ADN se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior elución del fragmento. Este tratamiento previene la recircularización de los extremos del plásmido cuando se ha digerido con una sola enzima.

3.2.5.4. Rellenado de los extremos 5' protuberantes

Se utilizó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, ésta enzima consta de una cadena polipeptídica simple obtenida por la ruptura de la ADN polimerasa I, ésta unidad conserva la actividad polimerasa 5' → 3' y exonucleasa 3' → 5' de la ADN polimerasa intacta de *E. coli*, pero carece de la actividad exonucleasa 5' → 3', por lo tanto, se usa para rellenar los extremos 3' recesivos, creados por tratamiento con enzimas de restricción que producen extremos 5' protuberantes.

La reacción se llevó a cabo en el tampón de la polimerasa (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, 50 µg/ml BSA. Se añadieron 2 µl de una mezcla de nucleótidos a una concentración de 2,5 mM cada uno y 1 U de la enzima Klenow. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta reacción da como resultado extremos romos y nos permite ligar ADNs con extremos 5' protuberantes no compatibles.

3.2.5.5. Fosforilación de los extremos 5'-OH

La fosforilación de los fragmentos de ADN a ser clonados, se realizó con la enzima T4 polinucleótido Kinasa (Biolab). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo fosfato en posición gamma del ATP al extremo 5'-OH del ADN. Esta fosforilación mejora el rendimiento durante la reacción de ligación. La reacción se realizó en el siguiente buffer: 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 7 mM MgCl₂, 5 mM DTT y una proporción ATP/extremos 5'-OH de 5:1.

3.2.5.6. Ligación de fragmentos de ADN

Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-OH y 5'-P de ADNs adyacentes.

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos se realizaron empleando 1U de enzima ADN ligasa del fago T4 y el tampón de la reacción suministrado por la casa comercial para ésta enzima (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM ATP). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl y la proporción ADN inserto: ADN vector, fue de 2:1 ó 1:1 en concentración molar, dependiendo del tamaño del inserto. En el caso de ligación de fragmentos con extremos incompatibles, se procedió en primer lugar al relleno de los mismos con la enzima Klenow y purificación del producto obtenido. Los extremos 5' – OH se fosforilaron por tratamiento con la T4 polinucleótido kinasa y el producto purificado se incubó a 14°C durante 4 horas para su ligación.

Pasado éste tiempo, los productos de la reacción se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli*.

3.2.6. Transformación con los plásmidos recombinantes

3.2.6.1. Transformación por choque térmico

Se utilizaron las diferentes cepas de *E. coli* ya mencionadas y se hicieron competentes siguiendo el protocolo descrito por Morrison (Morrison, DA. y col., 1979). Este método se basa en el tratamiento con CaCl₂. Se partió de un cultivo bacteriano en LB repartido en dos alícuotas de 500 ml e incubados en matraces de 2 litros, crecidos a 37°C y con agitación. Cuando los cultivos alcanzaron la densidad óptica a 600 nm de 0,5-0,8, se enfriaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 4°C, 8 000 rpm durante 5 minutos. Las bacterias se resuspendieron suavemente en un total de 250 ml de MgCl₂ 0,1 M frío. Las células se volvieron a centrifugar y se resuspendieron ésta vez en 250 ml de CaCl₂ 0,1M frío. Las células se suspendieron violentamente y se dejaron en hielo durante 20 minutos. Transcurrido éste tiempo, se volvieron a centrifugar y finalmente, se resuspendieron en 43 ml de CaCl₂ 0,1 M mezclado

con 7 ml de glicerol estéril. Esta suspensión de células competentes se distribuyó en tubos de congelación en alícuotas de 0,5 ml y se guardaron a -80°C .

Para la transformación de las bacterias competentes, se descongeló una alícuota a 0°C , se le adicionó el ADN plasmídico a transformar y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se sometieron a un choque térmico 2 minutos a 42°C , se incubaron otros 5 minutos en hielo, se pasaron a un 1 ml de LB a 37°C mínimo durante 1 hora, se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos y se resuspendieron en 200 μl de LB y se plaquearon en LB agar con el antibiótico al cual confiere resistencia el plásmido.

3.2.6.2. Transformación por electroporación

La preparación de las células electrocompetentes se realizó como sigue: se creció un cultivo de la bacteria en 20 ml de LB durante toda la noche en agitación y a 37°C , con éste cultivo como inóculo se creció 1 litro hasta una densidad óptica de 0,6-0,9. Se enfrió en hielo y se centrifugó a 4 000g, 15 minutos a 4°C . El pellet se resuspendió en 1 volumen de H_2O bidestilada estéril a 4°C . Este proceso se repitió 4 veces disminuyendo paulatinamente el volumen de H_2O utilizada en la resuspensión. Finalmente, las células se resuspendieron en 0,002-0,003 volúmenes de H_2O bidestilada estéril con un 10% de glicerol estéril preenfriado a $0-4^{\circ}\text{C}$ y se alicuotearon en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para su congelación a -80°C . La transformación se realizó añadiendo 1-3 μl de ADN resuspendido en H_2O bidestilada ó 1-3 μl de la mezcla de ligación, a 40 μl de bacterias electrocompetentes. La mezcla se colocó en cubetas BTX P/N 620 (2mm gap) pre-enfriadas y se dio un pulso en un electroporador Electro Cell Manipulator 600 de BTX, en las siguientes condiciones:

Choose Mode	T	2,5 kV/ Resistance High Voltage (HV)
Resistencia	R	R5 (129 ohm)
Voltaje	S	2,45 kV
Tiempo de pulso	t	5-6 msec

Inmediatamente dado el pulso se añadió 1 ml de LB precalentado a 37°C. El procedimiento de cultivo es similar al utilizado en la transformación por choque térmico.

Por éste método de electroporación se realizó también la transformación transitoria de parásitos de *Trypanosoma cruzi*. Esta transformación se hizo con el plásmido pTEX (Kelly y colaboradores, 1992), para ello se tomó un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica de crecimiento, los cuales se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de 5×10^7 parásitos, en tampón de electroporación estéril (132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 1,5 mM acetato de Mg, 90 μM de diacetato de Ca, pH 7). Luego de 10 minutos en hielo se adicionaron 100 μg de ADN resuspendido en agua bidestilada estéril. Las células se electroporaron en el electroporador ECM 600-BTX Inc. a 450V/12ms, se dejaron entre 10-20 minutos en hielo y luego se pasaron a 5 ml de LB con 10% de suero bovino fetal.

Posteriormente, se incubaron 24 horas a 28°C sin agitación, al cabo de éste tiempo y dependiendo de su vitalidad se les adicionaron 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antibiótico G-418 y se pasaron a agitación. Luego de 3 a 5 días, las células fueron subcultivadas manteniendo la concentración de antibiótico. A los 15 días se hicieron subcultivos y se fue aumentando paulatinamente la concentración de geneticina hasta llegar a 3 mgr/ml. Los análisis no se realizaron hasta pasadas 4 a 6 semanas de mantenimiento del cultivo a la misma concentración de antibiótico.

3.2.7. Selección de las colonias recombinantes

La selección de los transformantes se basó en cada caso en la particularidad del vector de transformación empleado. Por una parte, el plásmido pBluescript contiene un gen de resistencia a la ampicilina que permite crecer a las bacterias transformadas en un medio que contenga éste antibiótico. Por otro lado, contiene también un marcador genético de inserción, el gen de la β -galactosidasa de *E.coli*, de manera que al transformar bacterias lac^- con pBS éstas pasan a ser lac^+ y las colonias toman un color azulado cuando el medio contiene el cromógeno 5-Bromo,4-Cloro,3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) y el inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Si el plásmido contiene el inserto, se altera la pauta de lectura del gen de la enzima, ya que el punto de inserción del fragmento se encuentra dentro de la fase de lectura de la proteína y las colonias aparecen blancas, en lugar de la coloración azul que toman cuando se expresa el gen de la β -galactosidasa, por lo tanto, las colonias blancas se cultivaron en LB líquido con la finalidad de extraer el ADN plasmídico correspondiente y verificar la presencia del inserto en ellos.

En el caso de los plásmidos que carecían de éste sistema de selección, los clones recombinantes se detectaron por transferencia a nitrocelulosa de las colonias crecidas e hibridización posterior con la sonda específica.

La selección de los parásitos transfectados se basó en el hecho de que el plásmido pTEX contiene un gen *neo* de resistencia al antibiótico G-418, el cual permite crecer sólo a los parásitos con el plásmido, cuando se usan concentraciones relativamente altas del mismo.

3.2.8. Secuenciación de ácidos nucleicos

El método usado para secuenciar ADN utiliza reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, de Perkin Elmer, éste kit utiliza una polimerasa amplitaq FS, que es una mutante de la Taq ADN polimerasa, sin actividad nucleasa 5' --- 3', con una drástica reducción en la discriminación entre los dideoxynucleótidos, lo cual permite utilizar niveles bajos de terminadores en las reacciones, simplificando la eliminación de los no incorporados, además usa terminadores los cuales están marcados, siendo detectados por el secuenciador ABI 373, de ésta forma el crecimiento de cada cadena se detiene específicamente en el terminador que corresponde a la base y como cada uno emite a diferente longitud de onda cuando es excitado por la luz láser, los cuatro colores pueden ser detectados en una línea.

La purificación post – PCR se lleva a cabo en minicolumnas de Sephadex G – 50.

3.2.9. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida se utilizó para generar las mutaciones de los aminoácidos conservados, presentes en los sitios catalíticos de las diferentes enzimas.

La mutagénesis se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediada por los oligonucleótidos (Higuchi y col., 1988), los dos oligonucleótidos contenían la mutación y eran solapantes pero con orientación contraria (figura 6), lográndose así la amplificación de la zona 5' de la secuencia blanco. Estos productos primarios solapantes en la zona de la mutación, se purificaron y sus extremos 3' se completaron haciendo una segunda amplificación únicamente, con los oligonucleótidos externos (derecho e izquierdo), de ésta forma se

Mutagénesis dirigida por PCR

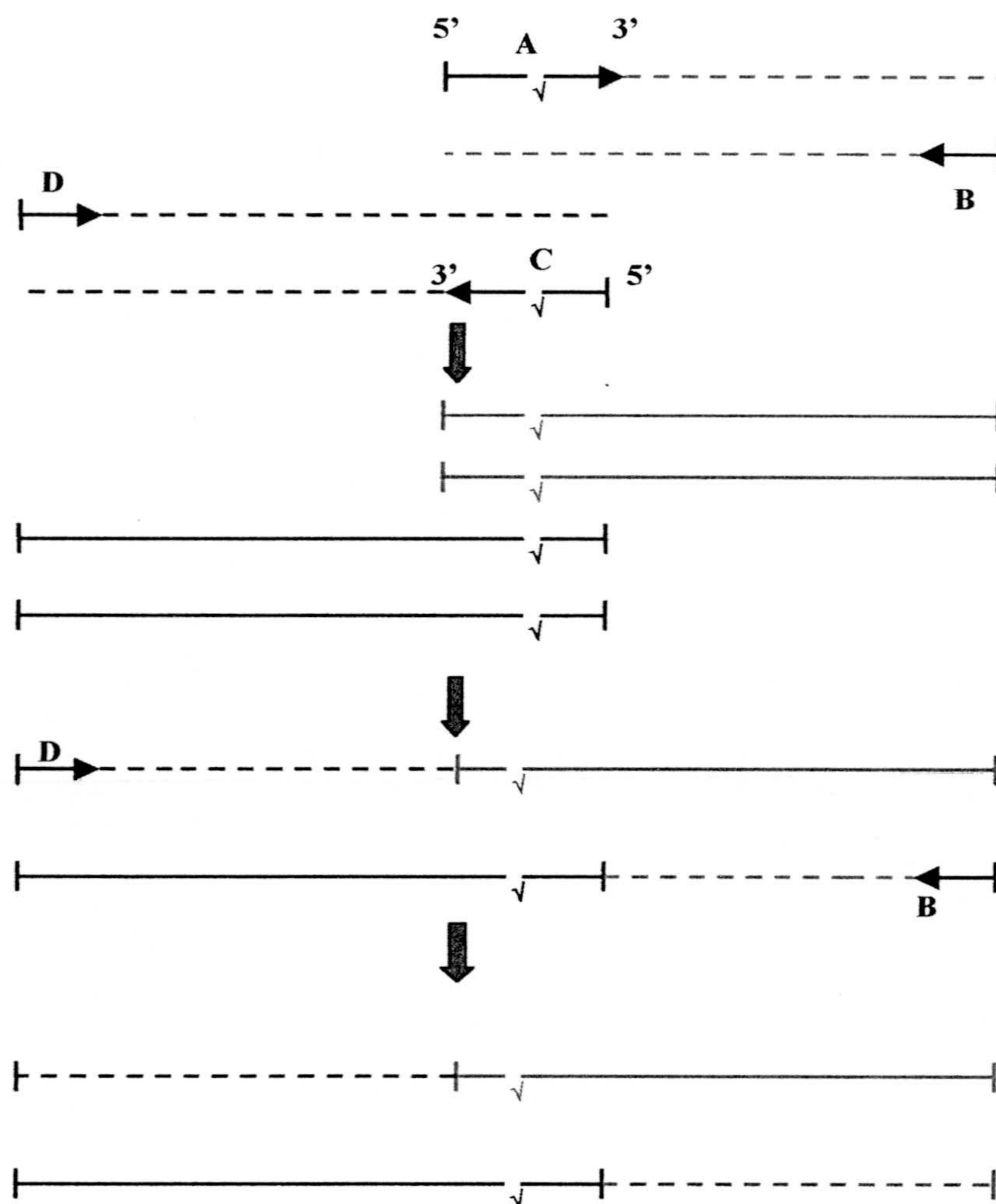


Fig.6. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida por PCR con oligonucleótidos. A, B, C y D representan los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones.

obtuvo el fragmento completo de doble cadena con la mutación central. Finalmente, éste fragmento fue digerido con las enzimas de restricción necesarias en cada caso y clonado en el plásmido, en reemplazo de la secuencia no mutada.

3.2.10. Obtención de proteínas recombinantes

3.2.10.1. Clonaje

Para la obtención de las proteínas recombinantes se utilizó un sistema de expresión que incluye en la zona aminoterminal de la proteína una extensión de polihistidinas (6) que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad a un ión metálico (IMAC) (LeGrice, y col., 1991).

Se utilizaron como vectores de expresión los plásmidos pTrcHis (Invitrogen) y pQE (Qiagen), el clonaje se realizó usando los métodos necesarios en cada caso, ya descritos anteriormente. La selección de los plásmidos recombinantes se hizo en algunos casos usando la sonda radiactiva ó en otros usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el motivo de las Histidinas (Clontech). La comprobación definitiva se hizo por secuenciación del plásmido recombinante.

3.2.10.2. Expresión

Para la expresión de las proteínas recombinantes se hicieron varios cultivos de 10 ml en LB ampicilina, hasta una DO 1 a 600 nm , luego se tomó una alícuota de 1 ml para el tiempo 0', la inducción de la expresión se hizo con diferentes concentraciones de IPTG desde 0,2 mM hasta 1 mM. Los cultivos se llevaron nuevamente a 37°C con agitación y se tomaron alícuotas a los 30 minutos, 1, 2, y 3 horas para seleccionar las mejores condiciones de expresión.

También se ensayaron diferentes medios más enriquecidos, 2% de glucosa, mayor concentración de antibióticos, diferentes temperaturas y la presencia de cofactores como Mg.

3.2.10.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para el análisis de las proteínas, se utilizó la electroforesis de proteínas en miniprotean (Biorad), con geles de poliacrilamida y SDS con tinción de azul de Coomasie. Dependiendo del tamaño predicho de la proteína, se hicieron los geles a las diferentes concentraciones 8, 10 o 12% de acrilamida. El tampón de electroforesis contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 3,46 mM SDS. Las muestras se resuspendieron en 50 µl de un tampón Laemli 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM ditiotreitól, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 10% de glicerol, se calentaron a 80°C durante 10 minutos antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante aproximadamente 1,30 horas. Los geles se colorearon con una solución de azul de Coomasie al 0,1% en solución fijadora con 50% de metanol y 10% de ácido acético durante 15 minutos. La decoloración se llevó a cabo con una solución de metanol al 10% y ácido acético al 10% con cambios sucesivos. Finalmente, el gel se secó en membrana de celofán (Biorad) durante 2 horas a 80°C en un Slab Gel Dryer SGD4050.SAVANT.

3.2.10.2.2. Inmovilización de proteínas “Western blot”

Para comprobar que la proteína inducida correspondía realmente con la proteína clonada, se transfirieron las proteínas de los geles de poliacrilamida a una membrana de inmobilon P (Millipore). La transferencia se llevo a cabo en cámara fría, durante 2 horas a 70V y con agitación constante en un tampón 25 mM Tris, 192 mM glicina y 15% de metanol. Una vez ocurrida la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución de TBS (0,9% NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4) con 1% de Tween-20, 1% de suero de cabra y 5% de leche descremada liofilizada. Luego, se lavó 2 veces durante 10 minutos en agitación con una solución de TBS-Tween20 y se incubó durante 1-2 horas con el anticuerpo mono o policlonal correspondiente, diluído en la solución bloqueadora. Transcurrido éste tiempo, la membrana se lavó nuevamente 3 veces y se incubó durante 1-2 horas con el anti-anticuerpo unido a fosfatasa

alcalina diluído igualmente en la solución bloqueadora. Nuevamente se lavó la membrana y se reveló con una solución de sustrato que contenía 0,56 mM BCIP (5-Bromo,4-Cloro, 3-Indolil fosfato), 0,48 mM de azul de tetrazolio y 10 mM de tampón de fosfatasa alcalina (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 100 mM de Tris-HCl pH 9,5). Se dejó unos minutos en oscuridad hasta ver aparecer las bandas, la reacción se paró con agua bidestilada.

3.2.10.2.3. Obtención de Anticuerpos policlonales

Para la obtención de los anticuerpos policlonales se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes a las diferentes zonas antigénicas de las proteínas, éstos se disolvieron en agua destilada o se acoplaron a KLH y se inocularon en conejos de 12 semanas, usando el siguiente protocolo de inoculación:

Día 0 1 mg/ml péptido con adyuvante completo de Freund

Días 15, 30, 40 y 60 - 1 mg/ml péptido con adyuvante incompleto de Freund

La primera inoculación se hizo en los ganglios, en diferentes zonas del lomo, las otras inoculaciones se hicieron intramusculares, en dos sitios diferentes de las patas traseras. Las sangrías se hicieron de la venas de la oreja en los días 0, 15 días post-tercera inoculación, 15 días post-cuarta y 15 días post-quinta.

La determinación de los títulos de anticuerpos se hizo mediante la técnica de FAST-ELISA (Falcon – Assay – Screening – test, Enzyme – Linked – Immunoabsorbent Assay), (Patarroyo y col., 1991).

3.2.10.3. Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes se hizo siguiendo dos métodos básicos de extracción dependiendo de la solubilidad de la misma.

3.2.10.3.1. Extracción de la proteína soluble

Las células se resuspendieron en dos volúmenes ó 5 ml/g de tampón de resuspensión (10 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 mM PMSF, 6 mM MgCl₂), dejándose en agitación durante 10 minutos en hielo, luego se trataron con 2mg/ml de lisozima recién preparada, también se adicionaron 10 µg/ml de ADNasa y se dejaron nuevamente en agitación durante 30 minutos en baño de hielo. Pasado éste tiempo se sonicó durante 8', el extracto obtenido se centrifugó a 30 000 rpm durante 20 minutos a 4°C usando un rotor Sorvall SS34. El sobrenadante obtenido contenía la proteína soluble y se purificó en la columna de níquel.

3.2.10.3.2. Extracción de los cuerpos de inclusión

El precipitado obtenido luego de la centrifugación se resuspendió en un tampón 0,8 mM de NaCl, 12 mM MgCl₂, 2% de Triton X-100 (5 ml para un precipitado de un litro) más 16% de glicerol, se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se añadieron 0,5 volúmenes de 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 y 0,5 volúmenes de 6 M de hidrocloreuro de guanidina para una concentración final de 1,5 M. Esta suspensión se agitó vigorosamente y se incubó a 30°C durante 30 minutos, luego de ésta incubación se centrifugó a 30 000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante contenía la proteína soluble pero parcialmente desnaturalizada, para renaturalizarla se disolvió rápidamente el cloruro de

guanidina, agregando 20 V de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 8, 0,3 M NaCl, 20% de glicerol y 0,01% de Triton X-100. Esta solución se filtró y se purificó utilizando la columna de níquel.

3.2.10.3.3. Purificación de la proteína en columna de níquel

El sobrenadante obtenido conteniendo la proteína soluble, se pasó varias veces por 4ml de resina /litro de cultivo (Ní-NTA nitrilo-triacético. Qiagen), preequilibrada con tampón fosfato 50 mM pH 8, 0,3 M NaCl, 5% de glicerol, 1% de Triton X-100 e imidazol 40 mM. La columna se lavó sucesivamente con 20 V del tampón anterior, 80 V de tampón fosfato 50 mM pH 6, 0,5 NaCl, 5% de glicerol, 1% de Triton X-100 e imidazol 40 mM. La proteína se eluyó con 30 ml en un gradiente de imidazol desde 50 mM hasta 0,5 M, el tampón de elución sólo difería del anterior en la concentración de Triton que fue de 0,05%. Se recogieron fracciones de 2 ml para ser analizadas posteriormente por electroforesis en geles de poliacrilamida, Western y actividad transcriptasa inversa.

Las fracciones que contenían la proteína se unieron y se dializaron contra un tampón 50 mM de Tris-HCl pH 7, 25 mM de NaCl, 1 mM ditioneitol (DTT) y 10% de glicerol. Finalmente el dializado se concentró en Centriprep-30 y Centricon-30 a <0,5ml y se guardó a -20°C . Todos los pasos cromatográficos se realizaron a 4°C y los tampones se esterilizaron antes de usar.

3.2.11. Determinación de la actividad transcriptasa reversa

3.2.11.1. Homopolímeros sintéticos

La actividad transcriptasa reversa se determinó en 100 μl de una mezcla de reacción estándar conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM de DTT, 10 mM

MgCl₂, 7,5 mM KCl, 10% NP40 y 1 mM EGTA. Los ensayos se llevaron a cabo usando diferentes homopolímeros a una concentración de 20 µg/ml: poli(rA)-oligo(dT)₁₂₋₁₈, poli(rC)-oligo(dG), poli(rCm)-oligo(dG), poli(dA)-oligo(dT), poli(dC)-oligo(dG) (Pharmacia) y 10 µCi [α³²P]dNTP (Amersham). La reacción se inició por la adición de 10 µl de enzima y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La cantidad de deoxinucleótido trifosfato polimerizado se determinó recogiendo la muestra en papel de filtro Whatman DE81 utilizando un slot-blot, el filtro se lavó tres veces durante 10 minutos en agitación suave con SSC 2X. La radiactividad retenida se midió en un sistema Instantimager (H.Packard).

La transcriptasa reversa de Mo-MuLV (Boehringer-Mannheim), diluída 1:50 se usó como control positivo en todos los ensayos y como control negativo se usó solución estándar. Los requerimientos iónicos de la enzima fueron determinados por el uso de diferentes concentraciones de los iones a analizar, al igual que el efecto de los inhibidores.

La caracterización de los productos de la reacción se analizó por electroforesis siguiendo el protocolo descrito por Gabriel (Gabriel y col., 1991). Los productos marcados se visualizaron por autoradiografía. La naturaleza de éstos productos se analizó por tratamiento con ARNasa H y nucleasa S1. Una alícuota del producto de reacción obtenido después de la reacción de polimerización con poli(rA)-oligo(dT) y poli(dA)-oligo(dT) se purificó con fenol-cloroformo y precipitó con isopropanol. El precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón de ARNasa H (40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT) y se adicionó 1U de la enzima. Luego de 20 minutos de incubación a 37°C se repitió el tratamiento con fenol-cloroformo seguido de la precipitación con isopropanol. Este precipitado se resuspendió en 100µl de tampón S1 (30 mM acetato de sodio pH 4,6, 50 mM NaCl, 1 mM ZnCl₂, 5% glicerol) y se incubó por 10 minutos a 25°C, con 5U de nucleasa S1. Finalmente, el producto de la reacción se sometió a electroforesis siguiendo el mismo protocolo del producto sin tratar.

La determinación de la actividad transcriptasa reversa en los lisados totales, en núcleo y citoplasma del parásito, se realizó mediante el mismo método de homopolímeros sintéticos. Para la obtención del lisado total se tomaron 5×10^7 parásitos en fase logarítmica de crecimiento, los cuales se lavaron cuatro veces con PBS a 4°C. Los parásitos se resuspendieron en el tampón de reacción y se procedió a determinar la actividad RT como se describió anteriormente.

La separación de las fracciones nuclear y citoplasmática se realizó siguiendo la metodología descrita por Martín (Martín y col., 1993). Se lavaron con PBS por tres veces, 2×10^8 parásitos, se resuspendieron en 100 μ l de un tampón que contenía 140 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,5 mM PMSF, 0,1% NP40 a 4°C. Los núcleos fueron recolectados por centrifugación a 400 x g por 15 minutos, mientras las proteínas citoplasmáticas permanecieron en el sobrenadante. Un test de citrato sintasa (Sheperd y col., 1973) se usó para monitorear la contaminación mitocondrial en la fracción nuclear. Esta fracción se lavó una vez más en el mismo tampón y se lisó por la adición de 100 μ l de una solución de Hepes pH 7,9, 25% glicerol, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF y 300 mM NaCl. El lisado nuclear se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 25 000 x g por 10 minutos a 4°C. 10 μ l del lisado nuclear y de la fracción citoplasmática se adicionaron a 90 μ l del tampón RT. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.11.2. RT-PCR

En éste ensayo se determinó la actividad transcriptasa del L1Tc, usando cantidades adecuadas de un molde de ARN exógeno, del virus del mosaico del tabaco (BMV) y un oligonucleótido de ADN específico para dicho molde. El ADNc se amplificó posteriormente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un par de cebadores específicos para el molde de BMV. La

sensibilidad se aumentó por hacer una hibridación usando como sonda un oligonucleótido interno marcado. Dado que algunas ADN polimerasas son capaces de amplificar sobre molde de ARN, se adicionó un exceso de ADN activado (Aposhian, y col., 1962), como competidor en la reacción RT para evitar amplificaciones inespecíficas (Lugert, y col., 1996).

La actividad RT se detectó utilizando como molde 21 ng de ARN de BMV, 18 nM de cebador BMV 5'-GGTCTCTTTTAGAGATTTACAGTG-3', 8 U de ARNsin, 5 µg de ADN activado y 10 µl de la RT de L1Tc purificada. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl en un tampón 16 mM Tris-HCl pH 8,3, 83 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 0,1% NP40 y 0,16 mM de la mezcla de dNTPs. Se incubó a 37°C durante 1 hora y posteriormente 1 minuto a 94°C para desnaturalizar el ARN. Después de la síntesis del ADNc, se realizó la PCR con los cebadores BMV1, 5'-CGTGGTTGACACGCAGACCTCTTAC-3' y BMV2, 5'-TCAACACTGTACGGCACCCGCATTC-3' durante 40 ciclos de 94°C 15 s, 56°C 15 s y 72°C 15 s seguidos de 72°C 5 minutos. El producto de la amplificación se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nylon y se hibridó con un oligonucleótido interno marcado con ³²P cuya secuencia era 5'-GCCTTTGAGAGTTACTCTTTG-3'.

3.2.12. Determinación de la actividad ARNasa H

3.2.12.1. Homopolímeros sintéticos

La actividad ARNasa H se determinó usando como sustrato [³H]poli (rA)-poli(dT) a una concentración de 6,5 µM. El sustrato se preparó agregando a 50 µCi de [³H]poli(rA).poli(dT) disueltos en agua bidestilada, 2,65 ml de (dT)₁₈₉ que contenía 0,5 U/ml A₂₆₀. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardó en alícuotas a -20°C hasta su uso. El ensayo de la actividad se hizo con 30 µl de un tampón 25 mM Tris-HCl pH

8,5, 5 mM MgCl₂, 1,5% glicerol, 50 µg/ml BSA, 0,01 NP-40, 10 µl de sustrato y 10 µl de la enzima purificada que se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La reacción se terminó con la adición de 150 µl de ácido tricloroacético frío y 10 µl de 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón. Las muestras se dejaron en hielo durante 10 minutos y a continuación se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 minutos. 75 µl de cada sobrenadante se agregaron en duplicado a viales Omni (Wheaton) que contenían 3 ml de líquido de centelleo Ultima Gold y se contaron en un contador de centelleo líquido Packard 1900.

3.2.12.2. Ensayo de complementación

Los plásmidos conteniendo los genes RTRN, RN, RT y como control el plásmido pQE30, sin inserto fueron transformados en la cepa de *E. coli* MIC3001, la cual necesita una actividad RNasa H para crecer a la temperatura restrictiva de 42°C. Luego de la transformación las células se dejaron creciendo durante 1 hora a 32°C y se plaquearon en LB más ampicilina 50 µg/ml incubándose 4 placas toda la noche a 42°C y 1 a 29°C. Las colonias que crecen a 42°C se recogen con 4ml de LB y se dejan crecer hasta una D.O₅₅₀ de 0,5. Se hacen diferentes diluciones en PBS y se plaquean en LB ampicilina más 0,5 mM de IPTG. Se hacen duplicados y se incuban tanto a 42°C, como a 29°C toda la noche. Luego se cuentan las colonias y se determina la eficiencia relativa de plaqueo, por dividir el número de colonias crecidas a 42°C sobre el de colonias a 30°C.

3.2.13. Análisis por ordenador

3.2.13.1. Búsqueda de homologías en las bases de datos

Para el análisis de similitud de secuencia se utilizaron los programas desarrollados por "University of Wisconsin Genetics Computer Group" (Devereux y col., 1984), (GCG), algoritmos contenidos en el programa

PC/Gene y programas de la red de servicios NCBI (Altschul y col., 1990). Los programas FASTA y TFASTA (Lipman y col., 1985) se usaron para la búsqueda de similitud entre L1Tc y las secuencias disponibles en las bases de datos. El programa FASTA permite buscar homologías de una secuencia de ácidos nucleicos con las secuencias descritas en las diferentes bases de datos GENEMBL ó de una proteína, con las proteínas descritas en las bases de datos SWISSprot. Sin embargo, el programa TFASTA es una modificación del anterior que permite buscar homologías entre una proteína determinada y todos los productos de traducción posibles de las secuencias de nucleótidos presentes en las bases de datos GENEMBL. El programa BLASTA se usó para la caracterización de homologías en regiones pequeñas, homologías que no son detectadas por los programas anteriores.

3.2.13.2. Análisis de las homologías encontradas

Una vez conocidas las secuencias potencialmente relacionadas, el análisis de la significancia de tales resultados se determinó mediante diferentes programas (BESTFIT, COMPARE) del paquete GCG, éstos programas permiten comparar dos secuencias potencialmente relacionadas. El programa BESTFIT permite determinar las zonas con una mayor homología, aunque sean motivos de pocos aminoácidos. El programa COMPARE detecta la región con mayor homología pero teniendo en cuenta que dicha región sea lo más representativa posible en relación al total de la proteína comparada. En la utilización de dichos programas se utilizaron dos matrices de comparación diferentes: "default" y "PAM250", obteniéndose mayores resultados cuando se usó ésta última.

3.2.13.3. Búsqueda de motivos conservados entre diferentes secuencias

Una vez conocido el grado de significación entre los diferentes grupos de secuencias frente a los que se detectó la homología, se utilizó el programa

PILEUP para determinar motivos conservados entre varios grupos de secuencias. Este programa compara las secuencias introducidas y obtiene un alineamiento múltiple en el que se mantienen en la misma posición los dominios conservados en la mayoría de las secuencias que se comparan. Este mismo programa permite inferir un dendograma, representando la similitud entre las diferentes secuencias.

3.2.13.4. Análisis filogenético

Se utilizó el programa TREECON.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de la actividad Transcriptasa inversa en *Trypanosoma cruzi*

La actividad transcriptasa inversa se determinó por medir la incorporación de $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dNTPs utilizando moldes de poli (rA)/oligo (dT), poli (rC)/oligo (dG) y poli (rCm)/oligo (dG). Como un control de la actividad polimerasa dependiente de ADN se usaron homopolímeros de poli (dA)/oligo (dT) y poli (dC)/oligo (dG). La tabla 1, muestra los datos de la radiactividad incorporada (cpms netas) en los lisados de las cepas de *Trypanosoma cruzi* Tulahuen e Y usando los diferentes moldes. Como se puede observar, el valor promedio de la actividad ARN dependiente para ambas cepas es 1,9 y 1,7 veces más alta respectivamente, cuando se compara con la actividad dependiente de ADN, éstos valores son similares a los obtenidos con la enzima control Mo-MuLV.

Se detectó una mayor incorporación de $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dGTP en el lisado total cuando se usó el molde de poli (dC)/oligo (dG) que cuando se usó el homopolímero poli (rC)/oligo (dG). Para determinar si éste aumento estaba asociado con una actividad transcriptasa inversa, se utilizaron en la reacción inhibidores de la actividad ADN polimerasa. La tabla 2 muestra que la adición de ddTTP, un inhibidor de las ADN polimerasas β y γ (Krokan, y col., 1979), ó afidicolina, la cual inhibe las ADN polimerasas α (Ikegami, y col., 1978) no afectó significativamente la incorporación de $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dGTPs. Se obtuvieron resultados idénticos al agregar afidicolina a la mezcla de reacción cuando los homopolímeros utilizados fueron poli(rA)/oligo(dT) y poli(dA)/oligo(dT). Sin embargo cuando se utilizó actinomicina D, un inhibidor específico de la actividad ADN dependiente asociada con las transcriptasas inversas (Brown y col., 1991; Carstens y col., 1992) se observó una drástica inhibición de la

Tabla 1
Requerimientos de molde/cebador para la actividad RT-like.

	Nucleótidos incorporados ^a (cpm netas)		rAdT/dAdT ^b	Nucleótidos Incorporados ^b (cpm netas)			rCdG/dCdG ^c
	poly(rA)/oligo(dT)	poly(dA)/oligo(dT)		poly(rCm)/oligo(dG)	poly(rC)/oligo(dG)	poly(dC)/oligo(dG)	
Tulahuen	250	130	1.9	380	234	516	0.45
Y	239	137	1.7	247	201	485	0.41
Mo-MuLV	270	103	2.6	326	268	281	0.95

^a Promedio de diez experimentos.

^b Radio de los valores promedio de incorporación de [α -³²P]dTTP usando poly(rA)/oligo(dT) y poly(dA)/oligo(dT).

^c Radio de los valores promedio de incorporación de [α -³²P]dGTP usando poly(rC)/oligo(dG) y poly(dC)/oligo(dG).

Tabla 2.

Especificidad de la actividad "RT-like"

Molde/cebador	Componentes	Actividad relativa*
poli(rC)/oligo(dG)	Condiciones estándar	100
	10 µg/ml afidicolina	118
	38 µg/ml actinomicina D	95
	20 µM ddTTP	88
poli(dC)/oligo(dG)	Condiciones estándar	100
	10µg/ml afidicolina	96
	38 µg/ml actinomicina D	23
	20 µM ddTTP	112
poli(rCm)/oligo(dG)	Condiciones estándar	100
	10 µg/ml afidicolina	117
	38 µg/ml actinomicina D	107
	20 µM ddTTP	96
poli(rA)/oligo(dT)	Condiciones estándar	100
	10 µg/ml afidicolina	135
	1 U ARNasaH + 0.4 U S1	0
poli(dA)/oligo(dT)	Condiciones estándar	100
	10 µg/ml afidicolina	105
	1 U ARNasaH + 0.4 U S1	94

* Los valores corresponden al promedio de tres experimentos.

incorporación de [α - ^{32}P]dGTP en las reacciones con el homopolímero poli(dC)/oligo(dG).

Los productos de las reacciones de los homopolímeros poli(rA)/oligo(dT) y poli(dA)/oligo(dT) se analizaron, tratándolos con ARNasa H y nucleasa S1. La hidrólisis completa, sólo se observó en la mezcla que contenía el homopolímero de ARN (Tabla 2), indicando la formación de un híbrido ARN:ADN. La longitud de los productos de la reacción estuvo alrededor de los 100 nucleótidos como se detectó por electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 7). Estos productos no se observaron en las muestras tratadas con ARNasa H y nucleasa S1.

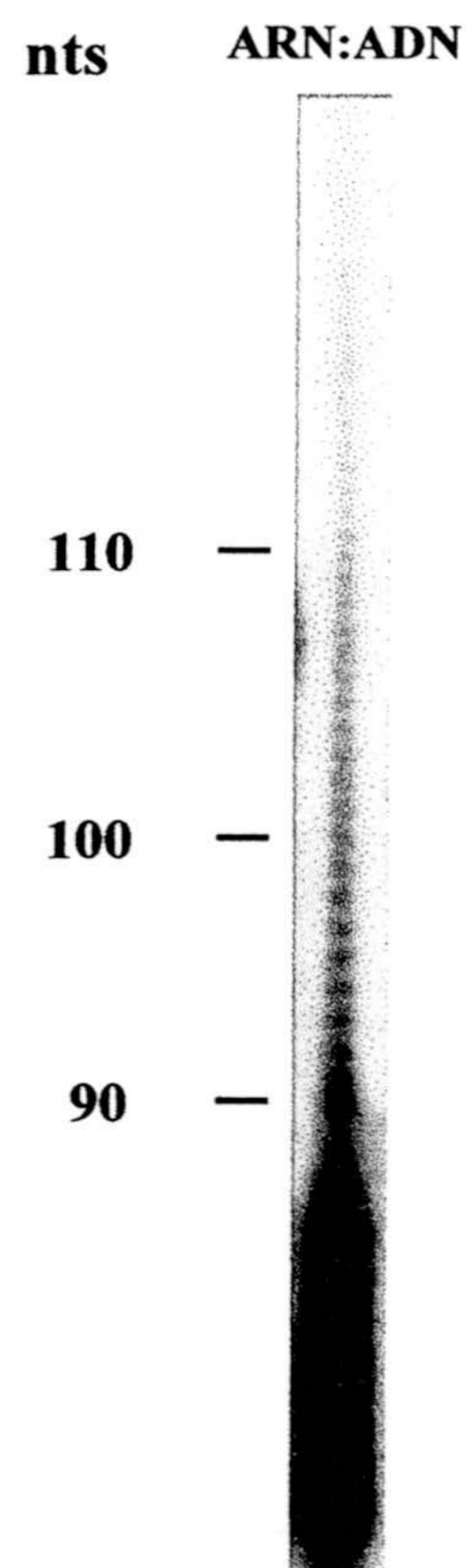


Fig 7. Producto de la extensión de la “RT-like” de *T.cruzi*. Los productos se obtuvieron luego de incubación de núcleos con poli(rA)/oligo(dT) en la presencia de [α - 32 P]dTTP. El precipitado se resuspendió en 90% (v/v) de formamida y se cargó en un gel del 6% de poliacrilamida. Los productos marcados se visualizaron por autoradiografía.

4.2 Características de la actividad RT de *Trypanosoma cruzi*

Para analizar la localización citológica de la actividad dependiente de ARN, se determinó dicha actividad en el núcleo y en el citoplasma. Los resultados que se muestran en la Tabla 3 indican que dicha actividad es 7 veces mayor en el núcleo que en el citoplasma. El análisis de la contaminación mitocondrial dentro de la fracción nuclear fue negativo. También se observó que la actividad del parásito, dependiente de ARN se inhibió en un 40 y 70% con

Tabla 3.
Actividad polimerasa ARN-dependiente en las fracciones nuclear y citoplasmática.

Fracción	Cpm netas ^a	Proteína total (mg)	Actividad Específica ^b (cpm/mg proteína x 10 ⁻³)
Nuclear	278	0.025	11.5
Citoplasmática	66	0.044	1.5

^a Los valores de cpm netas se midieron por el sistema de instantimager (H. Packard).

^b Los valores corresponden al promedio de cinco experimentos (S.D.<11%).

concentraciones de 1 y 5 μ M de AZT, respectivamente (Fig. 8A). La exposición a la rifamicina B (10 mM) también inactivó la actividad enzimática (Fig. 8B). A una concentración de 2 mM de novobiocina la reacción polimerasa se inhibió en un 40% (Fig. 8C). Sin embargo, se observó que la actividad dependiente de ARN del *Trypanosoma cruzi* era dependiente de Mg⁺⁺. El nivel óptimo de actividad, con el homopolímero poli(rA)/oligo(dT), se obtuvo a una concentración de 20 mM Mg⁺⁺ (Tabla 4).

Tabla 4.
Requerimientos iónicos para la RT-like de *T.cruzi*.

Condiciones de Reacción	RT- <i>T.cruzi</i> ^a (% incorporado)	RT-Mo-MuLV ^a (% incorporado)
Condiciones estándar (10mM Mg ⁺⁺)	100	100
Mg ⁺⁺ +0.5 mM Mn ⁺⁺	3	ND
0.1 mM Mg ⁺⁺	37	100
1 mM Mg ⁺⁺	45	140
5 mM Mg ⁺⁺	65	100
20 mM Mg ⁺⁺	125	100
30 mM Mg ⁺⁺	102	96

^a El porcentaje de incorporación se calculó en relación a los valores obtenidos bajo condiciones estándar como el radio Im/Is, donde Im es el porcentaje de incorporación con los ensayos modificados e Is el porcentaje de incorporación bajo condiciones estándar usando el molde poli(rA)/oligo(dT). Los valores de cpm netas se determinaron en un sistema instantimager (H. Packard).

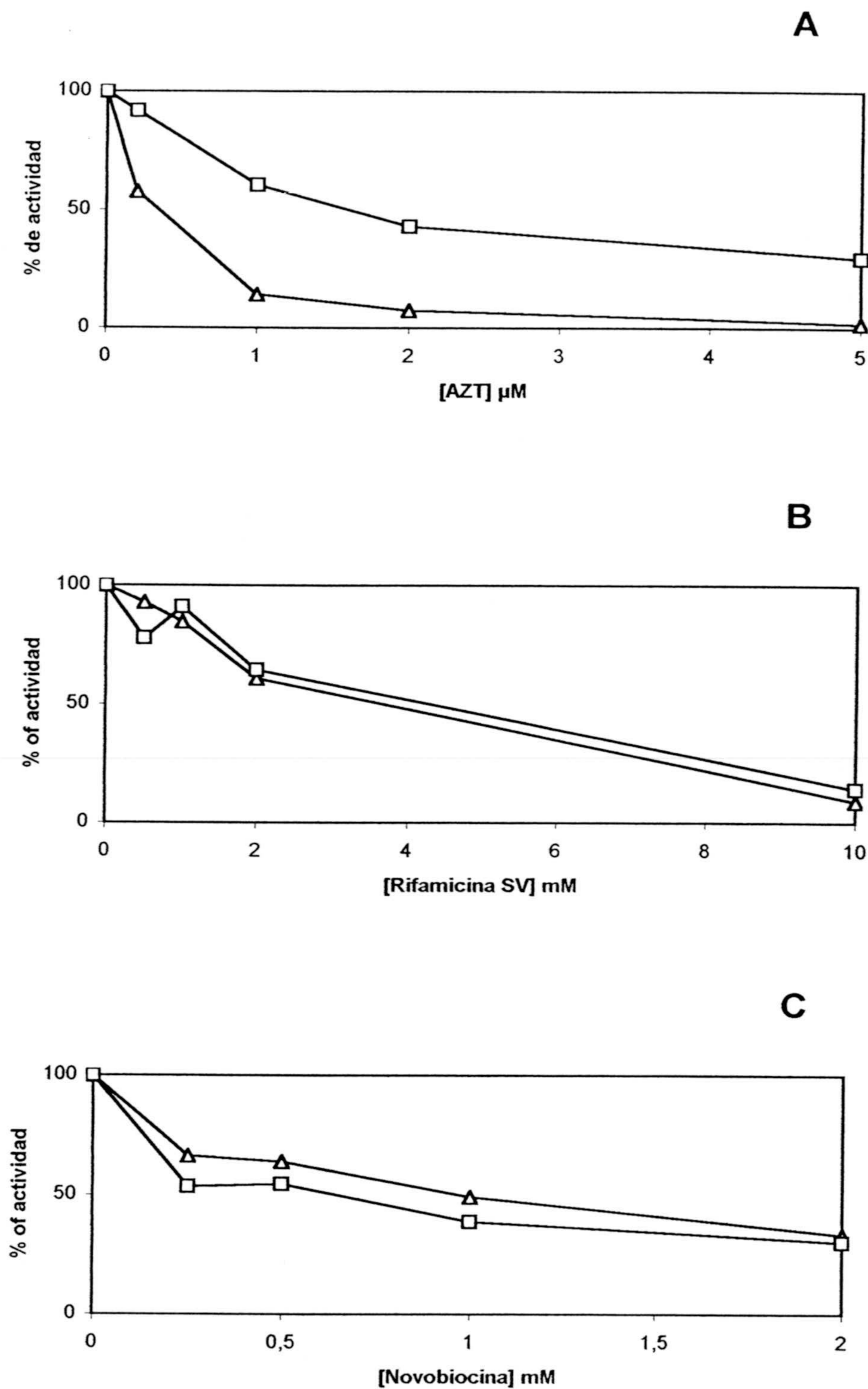


Fig.8. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la polimerasa dependiente de ARN de *T. cruzi*. A. AZT a concentraciones de 0,1 a 5 μM ; B. Rifamicina SV a concentraciones de 0,5 a 10 mM; C. Novobiocina a concentraciones de 0,25 a 2 mM. \square Poli(rA)/oligo(dT). \triangle poli(dA)/oligo(dT).

4.3. Clonaje de la Transcriptasa inversa - ARNasa H de L1Tc

El dominio L1TcRTRN se amplificó a partir del plásmido PSPFM55 que contenía el elemento L1Tc (Martín y col., 1995), por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos L1Tcb 5'AACGAGTCTGCAGCTACATCTAC-3'₍₁₈₄₅₎ que mapea en 5' con un sitio de restricción para PstI y Tcreb4c 5'-AAAGCAGAATTCCAACCCCTGC-3'₍₃₇₂₀₎, que mapea en la zona 3' del dominio, con un sitio de restricción EcoRI. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400 durante 30 ciclos consistentes en 94°C 60s, 57°C 90s y 72°C 90s, luego de un ciclo inicial que incluía un paso de desnaturalización de 3 minutos y que finalizaba con una incubación de 72°C por 5 minutos. El fragmento amplificado de un tamaño de 1869 pb fué analizado en un gel de agarosa, purificado y digerido con las enzimas de restricción PstI y EcoRI. Posteriormente fué clonado en el plásmido pTrcHisB (Invitrogen Corporation), el cual había sido digerido previamente con las mismas enzimas (Fig. 9A); en éste vector de expresión el inserto está corriente abajo y en fase de lectura con una secuencia que codifica un péptido de fusión N- terminal. Esta secuencia codifica para un codón de inicio de la traducción ATG, seis residuos de histidinas en serie que funcionan como un dominio de unión a metal en la proteína traducida y una secuencia de clivaje de enteroquinasa EK. La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* Topp10 para la expresión de la proteína, los transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina, confirmándose la construcción correcta por análisis con enzimas de restricción y secuencia y el plásmido recombinante recibió el nombre de pHisL1TcRTRN. Este plásmido recombinante también fué transformado en las cepas de *E. coli* Topp1, 2, 3, 4, 5 y 6 de Stratagene para buscar la mejor expresión de la proteína recombinante.

El plásmido pHisL1TcRTRN se usó para clonar éstos mismos dominios en el vector de expresión pQE31 de Qiagen, éste clonaje se realizó haciendo la digestión tanto del vector como del plásmido con las enzimas de restricción BamHI y Sall, el plásmido recombinante resultante se transformó en la cepa de

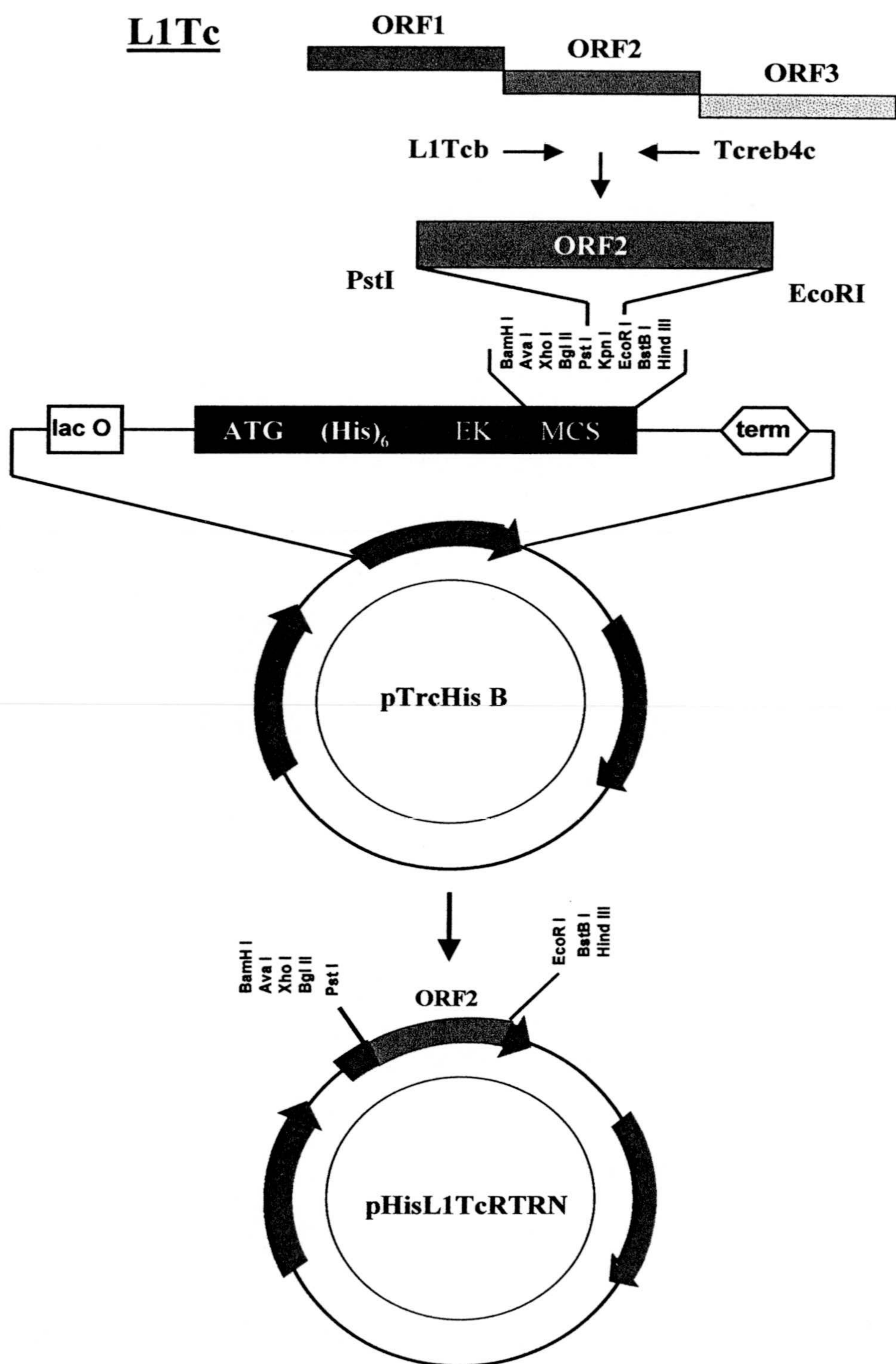


Fig 9A. Representación esquemática de la construcción del pHisL1TcRTRN. El fragmento de ADN del ORF2 de L1Tc se clonó en los sitios PstI y EcoRI de pTrcHisB como se describe en métodos.

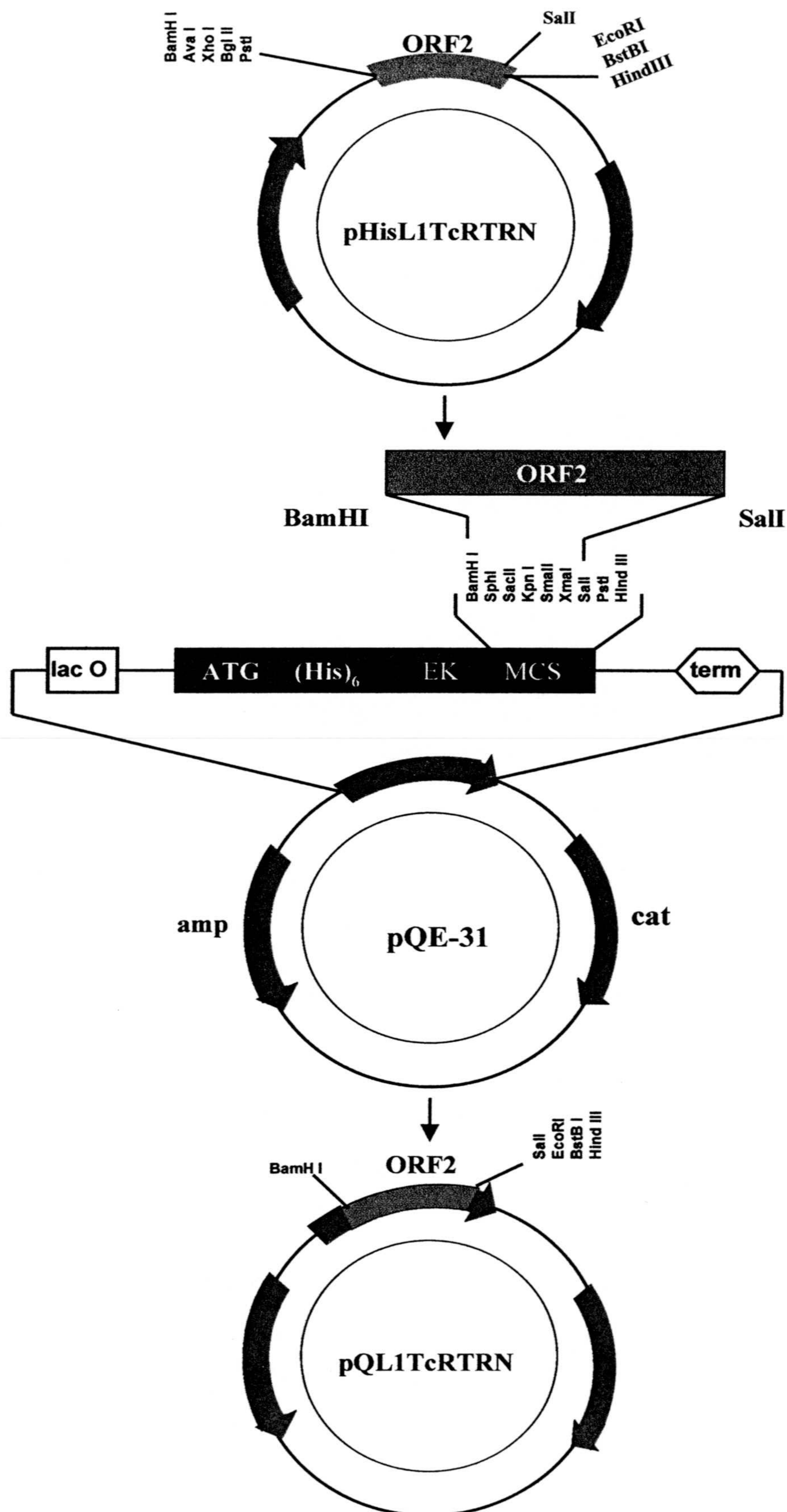


Fig 9B. Representación esquemática de la construcción del pQL1TcRTRN. El fragmento de ADN del ORF2 de L1Tc se clonó en los sitios BamHI y SalI de pQE-31 como se describe en métodos.

E. coli XLI-B confirmando el plásmido recombinante correcto por análisis de restricción y secuencia, luego se transformó en la cepa de *E. coli* M15 la cual posee múltiples copias del plásmido pREP4 que lleva el gen *lac I* que codifica la proteína represora y recibió el nombre de pQL1TcRTRN (Fig. 9B).

4.4. Expresión de la Transcriptasa inversa – ARNasa H de L1Tc

La mejor expresión de la RT- ARNasaHL1Tc se obtuvo con el plásmido recombinante pQL1TcRTRN a una concentración de 0,5 mM de IPTG y fue independiente de la cepa de *E. coli* utilizada, el tiempo de inducción fue de 2 horas y se realizó a 28°C para favorecer la solubilidad de la proteína y en presencia de 2 mM de Mg, con éstas condiciones se obtuvo una proteína de un peso molecular aproximado de 66 kDa, el peso teórico (Fig. 10A), la expresión de la RT- ARNasaH se confirmó por Western – blot usando el anticuerpo policlonal 5001 dirigido contra un dominio que mapea en una de las zonas conservadas de la RT (Fig. 10B).

4.5. Purificación de la Transcriptasa inversa – ARNasa H de L1Tc

La proteína RTRN se purificó mediante las seis histidinas presentes en su zona aminoterminal por el método de cromatografía de afinidad a metales. La proteína se desnaturalizó parcialmente con hidrocloreuro de guanidina, dada su insolubilidad a diferentes concentraciones de detergentes no iónicos ensayados como Triton X-100, NP40, Tween 20, β -mercaptoetanol y diferentes combinaciones de ellos a diferentes pHs y alta fuerza iónica (Fig 11). De ésta forma, se obtuvo una purificación parcial de la proteína, por lo cual, se pasó por una columna de mono S obteniéndose una purificación del 90% (Fig. 12A y 12B).

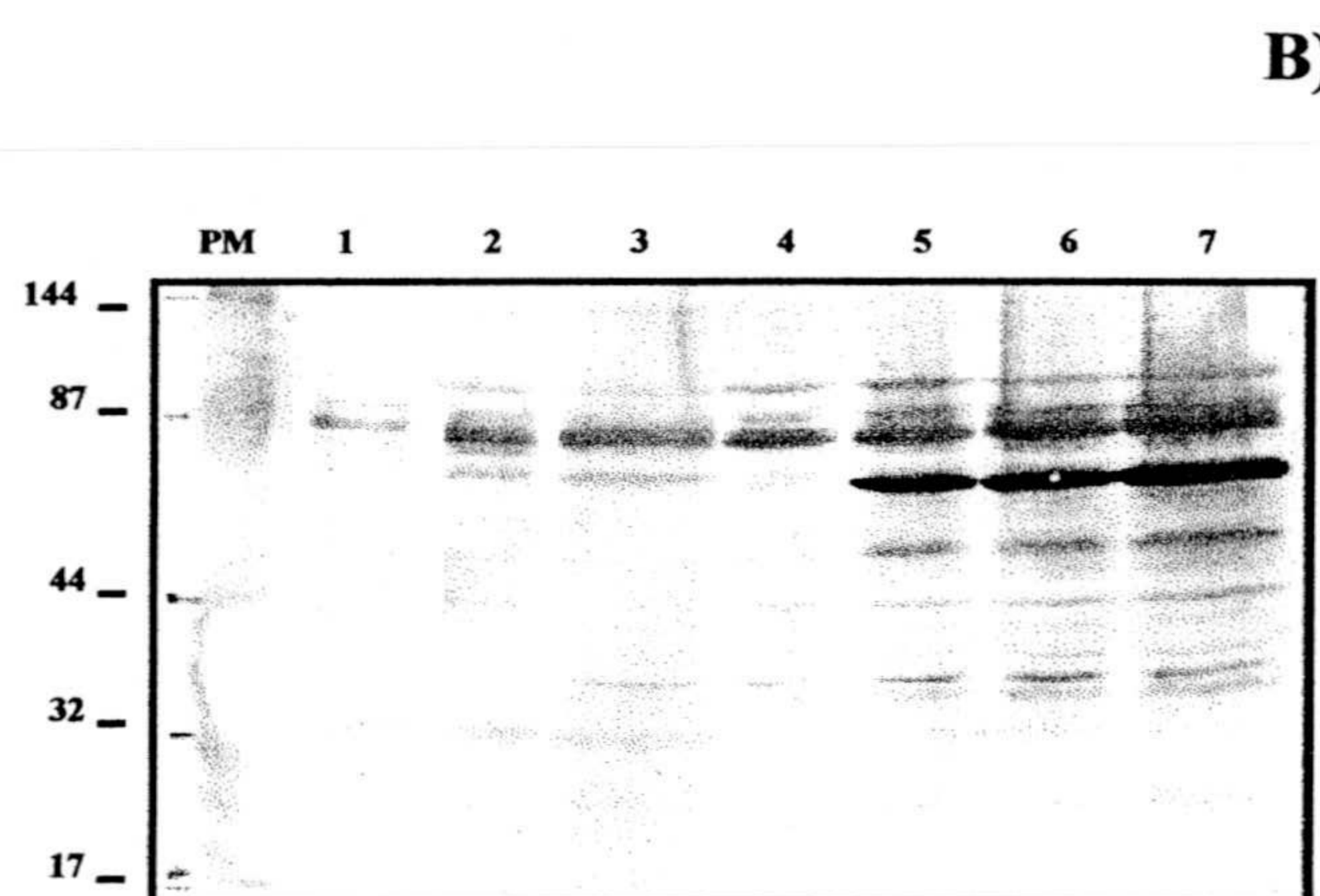
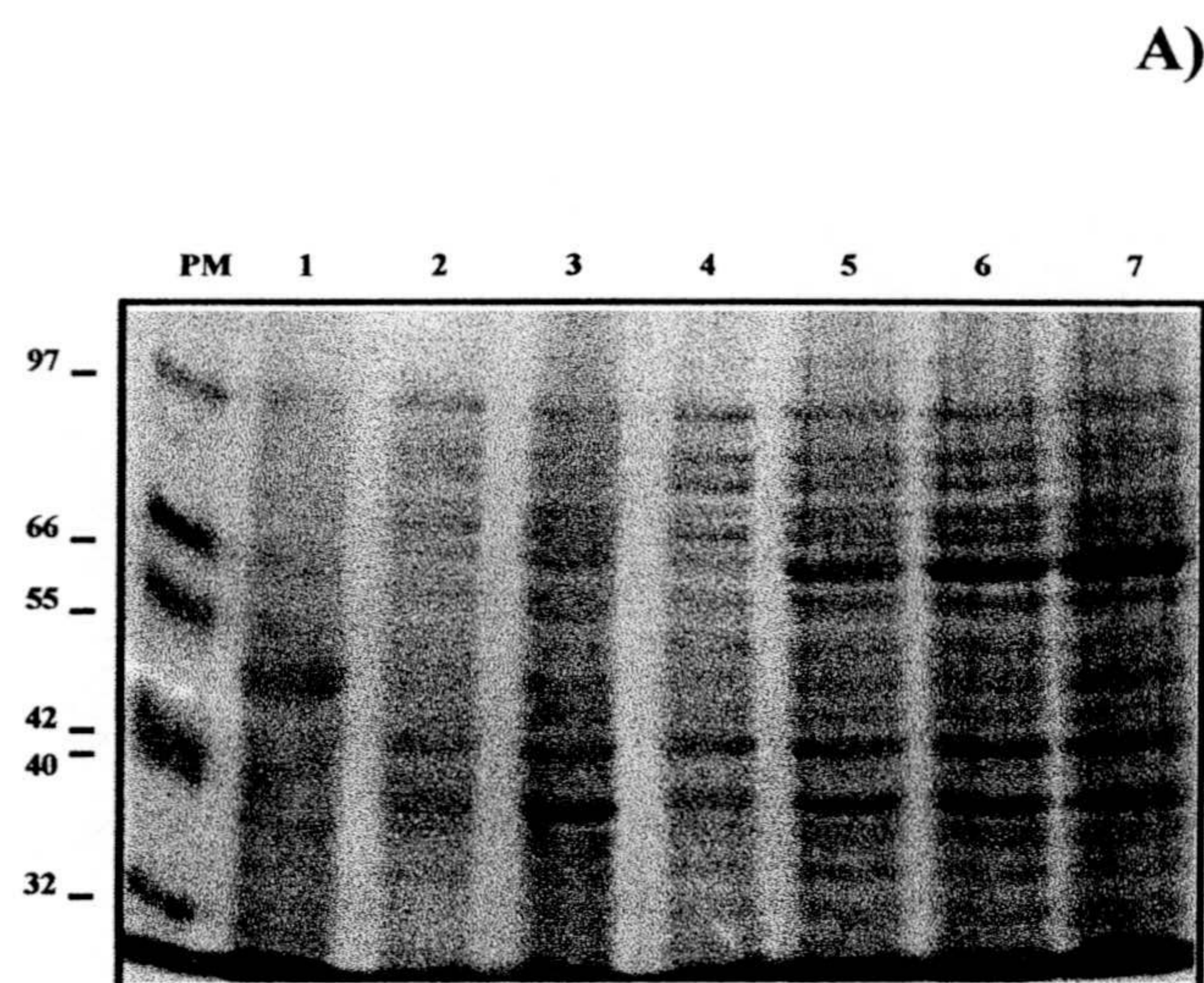


Fig. 10. Expresión de la proteína recombinante L1TcRTRN. La inducción se hizo con 0,5 mM de IPTG a 28°C en presencia de 2 mM de Mg²⁺. A) PAGE-SDS con coloración de azul de Coomassie. 1. Plásmido pHisL1TcRTRN 0 horas. 2.3. pHisL1TcRTRN 3h de inducción en la cepa XLI-B y M15 respectivamente. 4 a 7 pQL1TcRTRN en M15 a 0, 1, 2 y 3 horas de inducción.

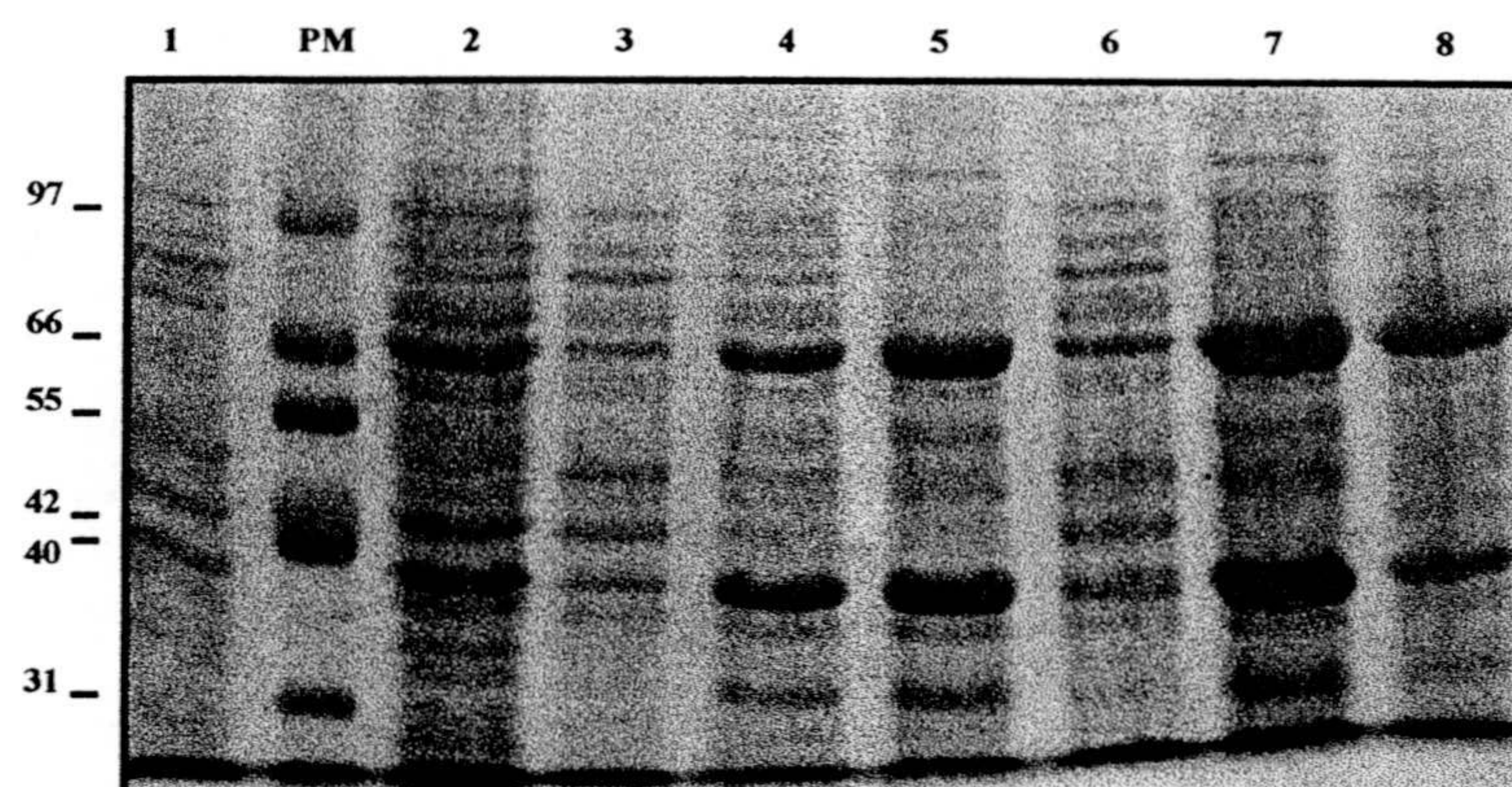


Fig.11. Solubilidad de la proteína recombinante L1TcRTRN. 1.2. Fracción soluble e insoluble luego del tratamiento con triton 0,5%. 3.4. Fracción soluble e insoluble luego del tratamiento con tween-20 1%. 5.6. Fracción insoluble y soluble luego del tratamiento con B-mercaptoetanol 10 mM. 7. Fracción insoluble luego de tratamiento con 0,05% de SDS. 8. Proteína L1TcRTRN 3 h de inducción.

4.6. Clonaje de la Transcriptasa inversa de L1Tc

El dominio L1TcRT se obtuvo a partir del plásmido recombinante pQL1TcRTRN por digestión con la enzima Hind III cuyo corte mapea tanto en la zona del sitio múltiple de clonaje que está hacia 3' del fragmento clonado, como en 2981 de L1Tc, de ésta forma saca el fragmento correspondiente al dominio ARNasa H, el cual se elimina. El plásmido fué transformado en la cepa de *E.coli* XLI-B, analizado por mapeo de restricción y secuencia, transformándose luego en la cepa de *E. coli* M15 y se le dió el nombre de pQL1TcRT (Fig. 13).

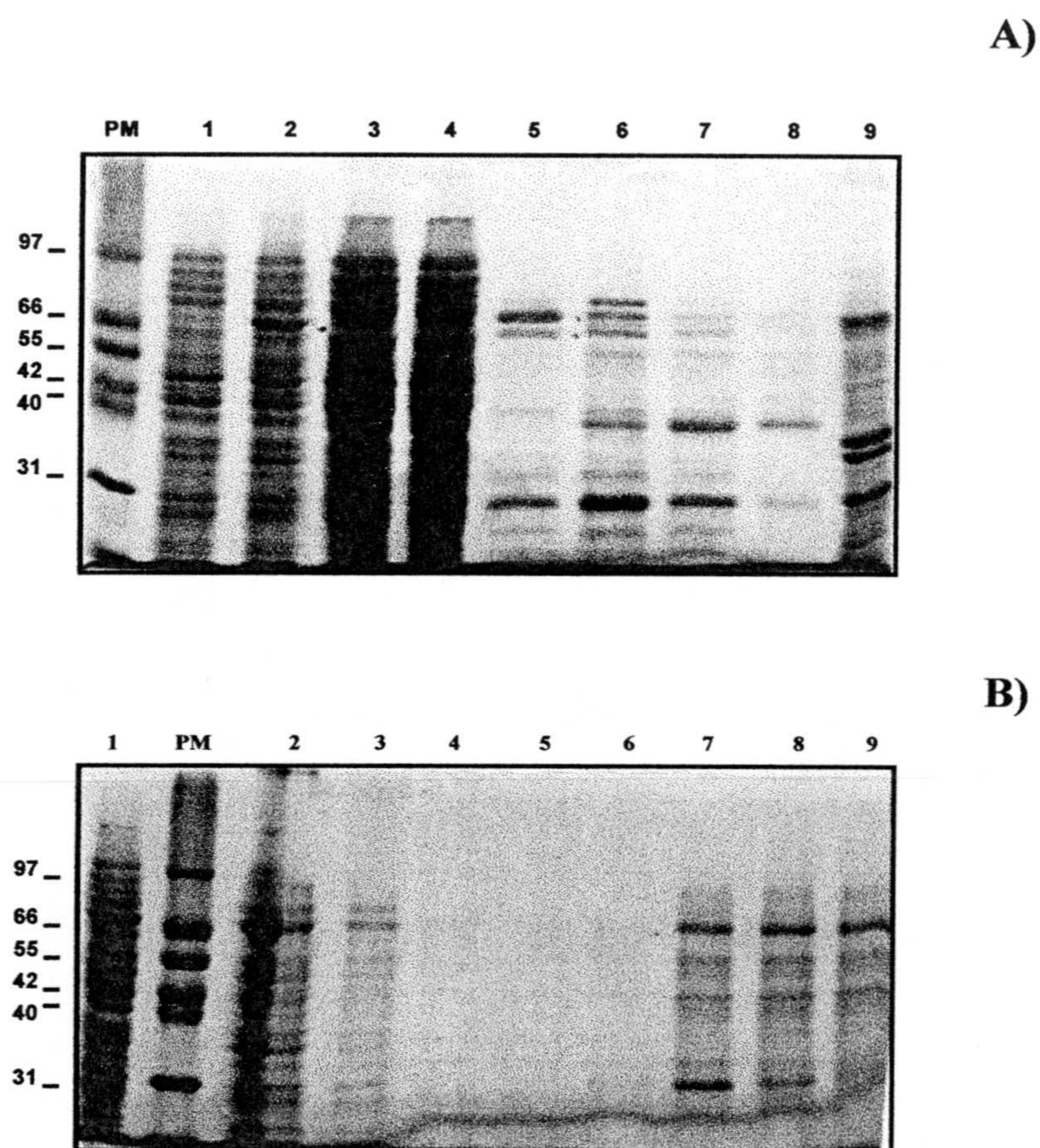


Fig.12. Inducción y purificación de la proteína recombinante L1TcRTRN. A) PAGE-SDS con coloración de azul de Coomassie. A) 1.2. 0 y 3 horas de inducción con 0,5mM de IPTG de L1TcRTRN. 3.4. Fracción soluble antes y después de pasar por la resina. 5 a 9. Fracciones 1,3, 5, 7 y 9 recogidas luego de pasar la fracción soluble de la proteína por una columna de afinidad Na-Ní y elución con gradiente de imidazol 50-500 mM. B) 1. L1TcRTRN luego de 3 h de inducción 2.3. Proteína solubilizada con 1,5 mM de HClGu antes y después de pasar por la resina. 4 a 9. Fracciones 1, 3, 5, 7 y 9 eluidas con gradiente de imidazol luego de pasar la fracción solubilizada con HClGu.

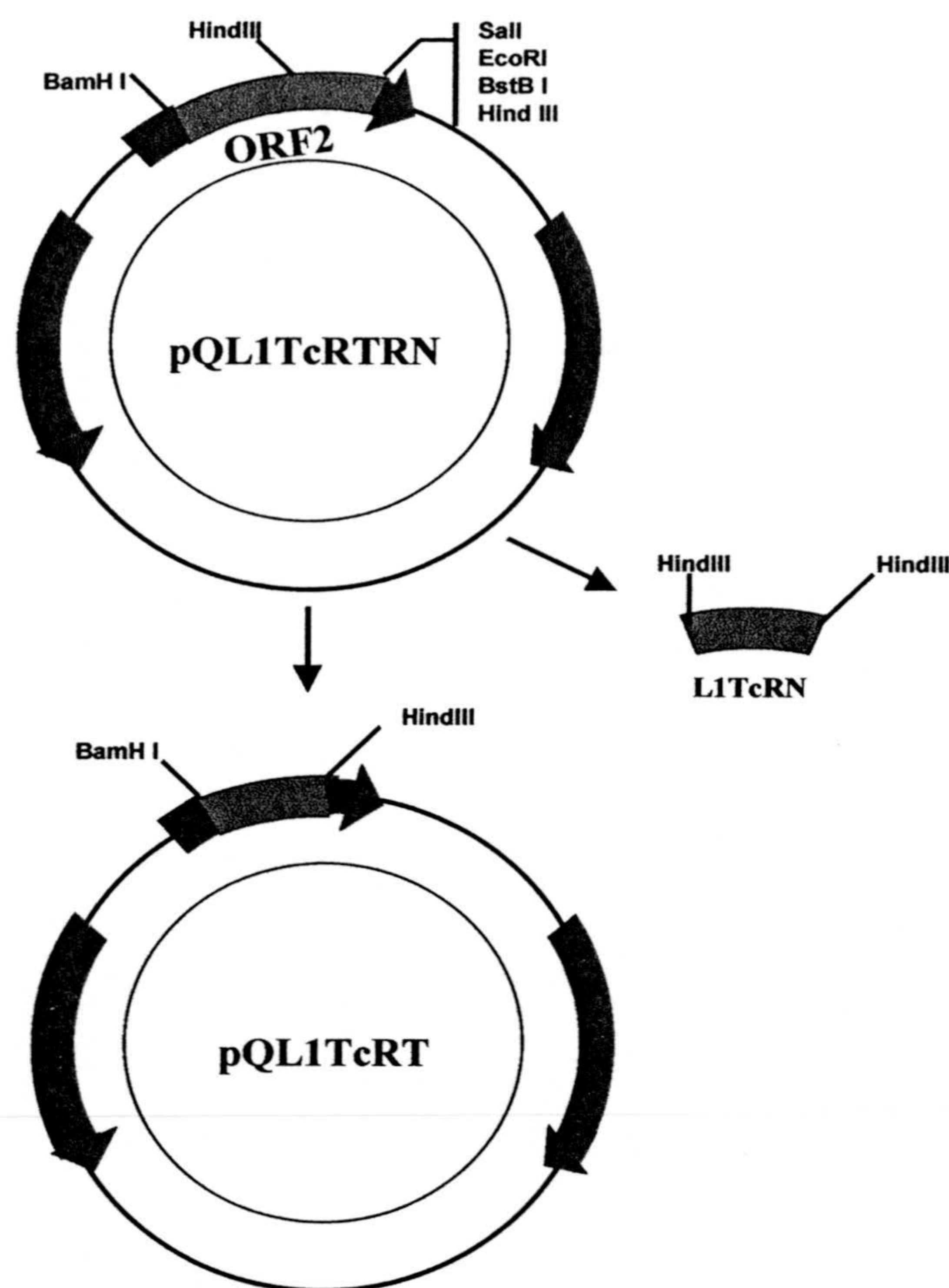


Fig 13. Representación esquemática de la construcción del pQL1TcRT. El ORF2 de L1Tc fue digerido con la enzima HindIII para eliminar el dominio correspondiente a la ARNasaH.

4.7. Expresión y purificación de la Transcriptasa inversa de L1Tc

La expresión del dominio RT se obtuvo mediante la inducción con 0,5 mM de IPTG, durante 2 horas a 37°C, la proteína obtenida, con un peso molecular de 40kDa, se purificó mediante un método similar a la proteína total y se confirmó mediante Western – blot con el antisuero 5001 (RT) y el 5011 (ARNasa H), (Fig. 14A y 14B).

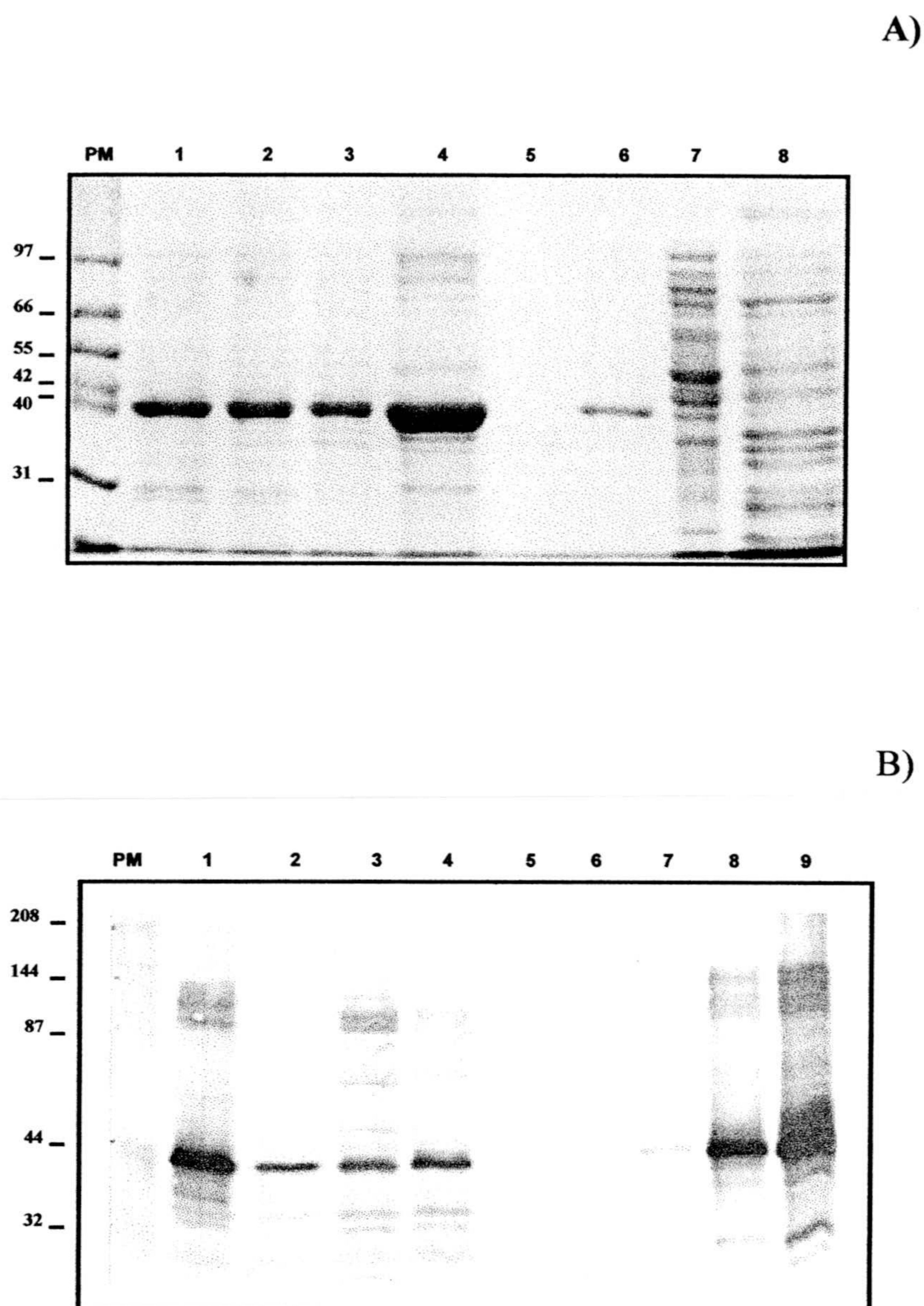


Fig. 14. Expresión y purificación de la proteína recombinante L1TcRT.
A) 1 a 4. PAGE-SDS con coloración de azul de Coomassie de las fracciones 1, 3, 5, 7 eluidas de la columna de Ni-NTA con gradiente de 50-500 mM de imidazol a partir de la proteína soluble. 5 a 8. proteína L1TcRT solubilizada con HClGu
B) Western-blot con anticuerpo dirigido contra dominio RT. 1.L1TcRT luego de 3 horas de inducción con 0,5 mM de IPTG. 2 a 4. Fracciones 1, 5 y 7 de la purificación de la proteína soluble. 5 a 7. L1TcRT solubilizada con HClGu. 8 y 9. L1TcRT insoluble.

4.8. Actividad Transcriptasa inversa del L1Tc

4.8.1. Homopolímeros sintéticos

La actividad RT del L1Tc se ensayó tanto con RTRN como con RT sola, mediante el uso de los diferentes homopolímeros, mostrando en ambos casos un comportamiento similar, con una mayor afinidad por el poli(rA)/oligo(dT) en el caso de los homopolímeros de ribonucleótidos y en el caso de los de deoxinucleótidos por el poli(dC)/oligo(dG) (Fig. 15). La actividad enzimática en las dos proteínas, fue dependiente de cationes divalentes, con una mayor preferencia por el Mg, la concentración óptima para éste fue 5 mM (Fig. 16), similar a la de la enzima retroviral usada como control positivo, la de Mn fue 1 mM (Fig.17), en el caso de KCl 80 mM (Fig. 18), el pH 8 (Fig. 19) y la temperatura 37°C (Fig. 20). Como control negativo se usó la bacteria con plásmido sin inserto, siendo inducida, purificada y determinada la actividad en las mismas condiciones que las descritas para la RT de L1Tc. En éste caso también se usaron los diferentes inhibidores de las transcriptasas inversas retrovirales y se observó un comportamiento similar al visto con los ensayos en lisado total de *T. cruzi*.

4.8.2. RT – PCR

La actividad transcriptasa inversa de RTRN y RT de L1Tc también se midió mediante un ensayo de RT – PCR, usando como molde un ARN retroviral (BMV) y en presencia de ADN activado, para evitar la amplificación por parte de posibles ADN polimerasas contaminantes. Usando ésta metodología se obtuvo la amplificación de una banda de aproximadamente 150 pb, siendo observada tanto en el gel con bromuro de etidio, como en la autoradiografía luego de la hibridización con el oligonucleótido interno marcado con [³² P] (Fig.21). Como control positivo se usó la RT de Mo – MuLV y no se adicionó enzima en el control negativo.

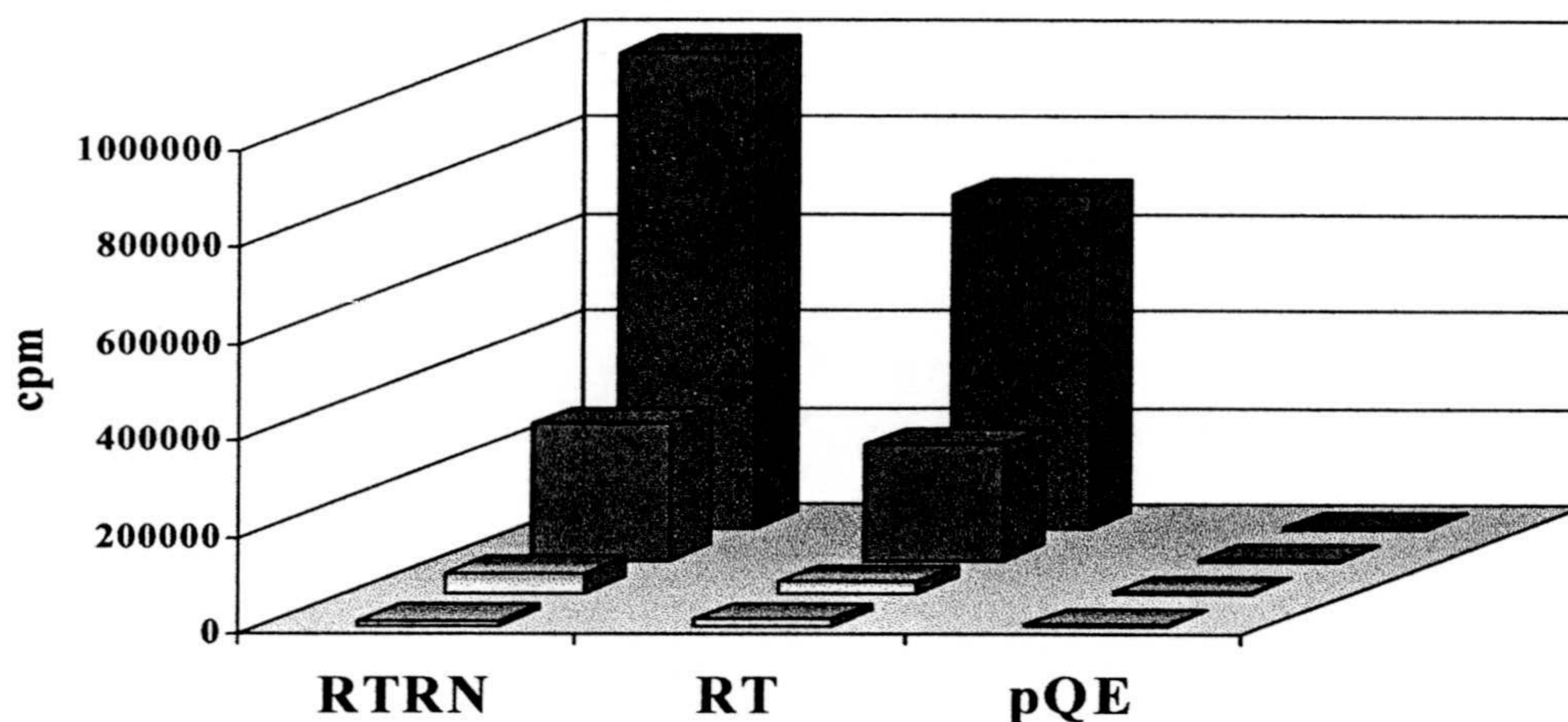


Fig 15. Utilización de diferentes homopolímeros por parte de L1TcRTRN y L1TcRT. □ poli(rC)/oligo(dG). □ poli(rA)/oligo(dT). ■ poli(dA)/oligo(dT). ■ poli(dC)/oligo(dG). pQE corresponde al control negativo, de plásmido sin inserto. Las reacciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos.

4.9. Mutagénesis dirigida de la Transcriptasa inversa

La mutación del dominio invariante de las transcriptasas inversas YADD se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediado por oligonucleótidos. Se hicieron 2 mutaciones, la primera consistió en cambiar la alanina (A) 311, por una metionina (M); para ello, inicialmente, se subclonó en PBSSK un fragmento digerido con las enzimas de restricción PvuII (2332) y Hind III (2981) de un tamaño de 649 pb y que incluía los nucleótidos a mutar, en éste caso el 2730 y 2731; usando éste fragmento se realizó una primera amplificación y mutación de una cadena, con el oligonucleótido que incluye las mutaciones, RTM3 5'-GGGTGTCACAGCAGACATGTATATGGACG - 3' y con T7 5' - AATACGACTCACTATAG -3' que mapea en el plásmido PBSSK donde se había subclonado el fragmento del gen RTRN a mutar y una segunda amplificación y mutación de la cadena complementaria con el oligonucleótido mutado RTM1 5' CGTCCATATACATGTCTGCTGTGACACCC 3' y M13r 5' -AACAGCTATGACCATG - 3' (Fig. 22A). Luego de la purificación

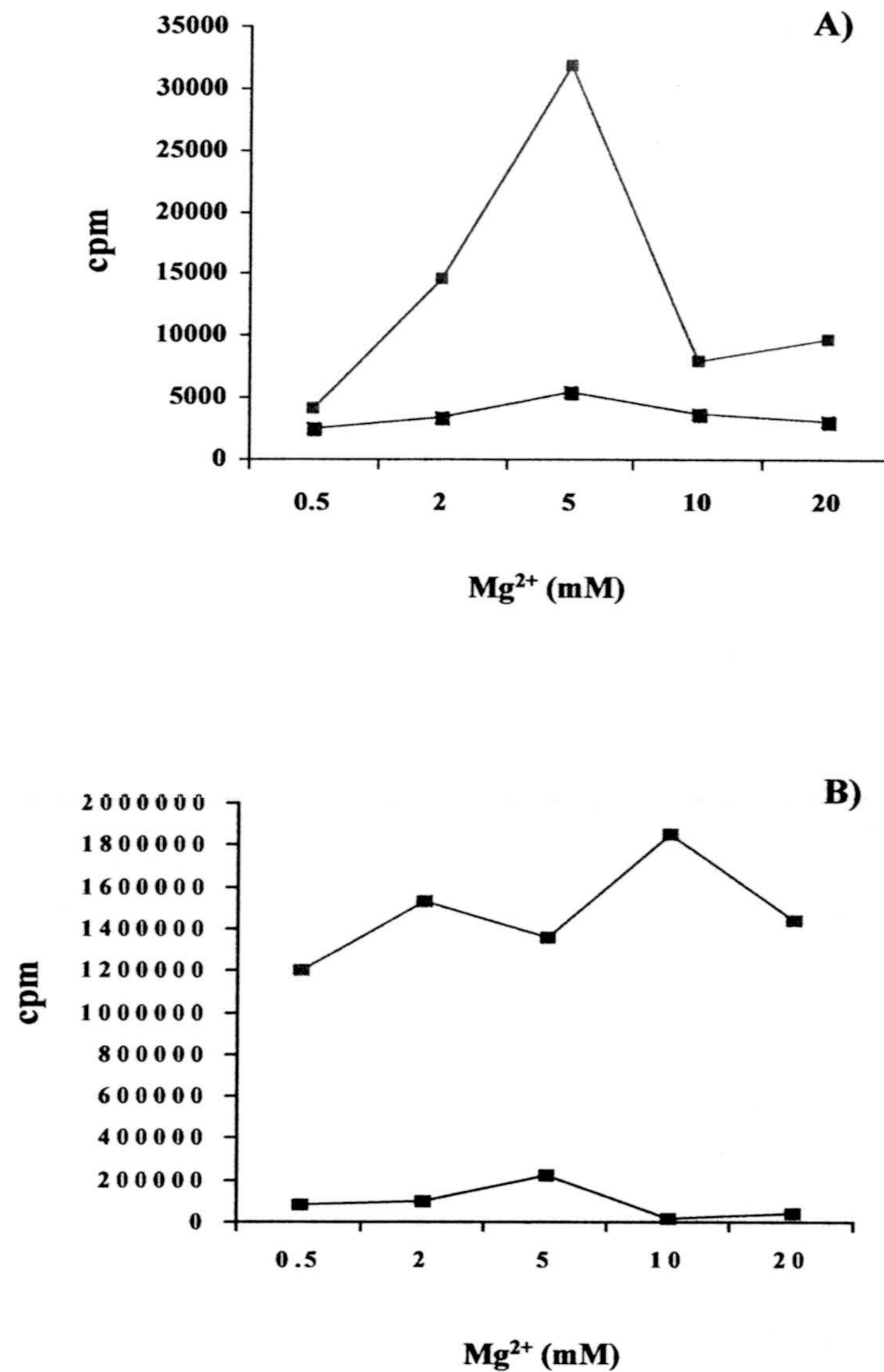


Fig 16. Determinación de la concentración óptima de Mg^{2+} en el ensayo de actividad Transcriptasa inversa de la proteína L1TcRTRN, usando los diferentes homopolímeros. A) \blacksquare poli(rA)/oligo(dT). \blacksquare poli(rC)/oligo(dG). B) \blacksquare poli(dA)/oligo(dT). \blacksquare poli(dC)/oligo(dG). Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos, variando solamente las concentraciones de Mg.

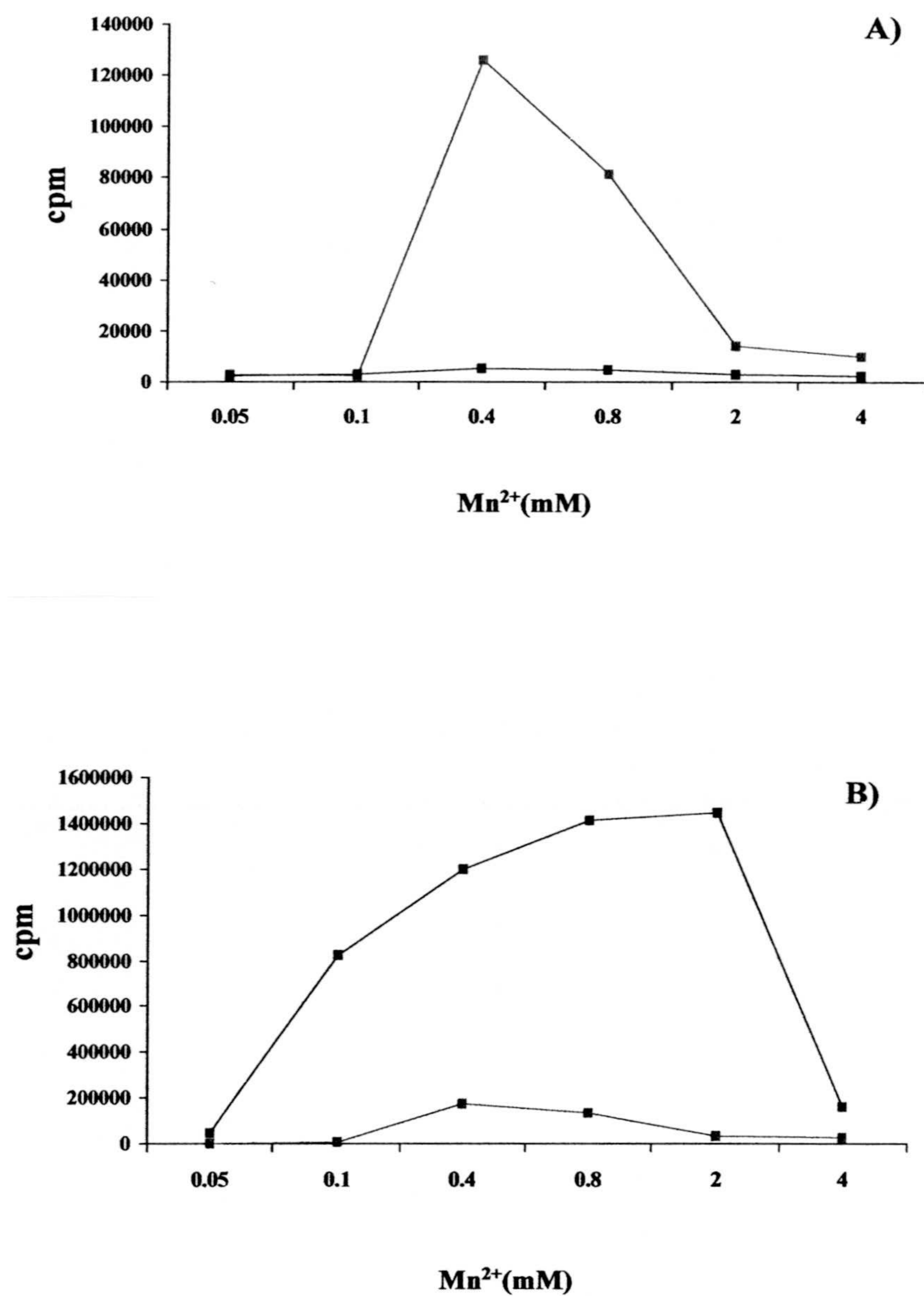


Fig 17. Determinación de la concentración óptima de Mn²⁺ en el ensayo de actividad Transcriptasa inversa de la proteína L1TcRTRN utilizando diferentes homopolímeros. A) □ poli(rA)/oligo(dT). ■ poli(rC)/oligo(dG). B) □ poli(dA)/oligo(dT). ■ poli(dC)/oligo(dT). Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos, variando solamente las concentraciones de Mn.

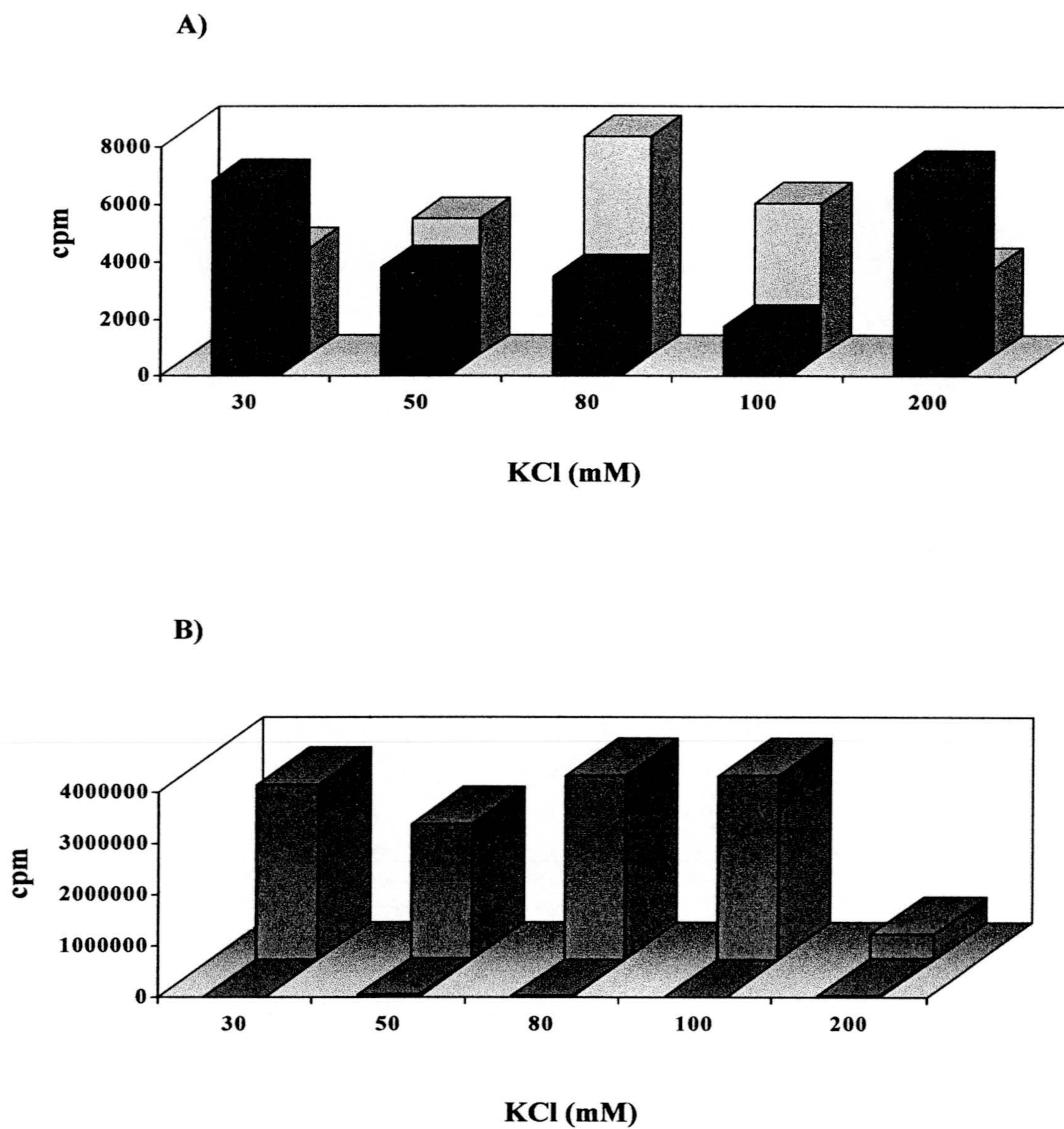


Fig. 18. Determinación de la concentración óptima de KCl en el ensayo de actividad Transcriptasa inversa de la proteína L1TcRTRN, usando diferentes homopolímeros. A) ■ poli(rA)/oligo(dT). □ poli(rC)/oligo(dG). B) ■ poli(dA)/oligo(dT). ■ poli(dC)/oligo(dG). Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritos en métodos, variando solamente las concentraciones de KCl.

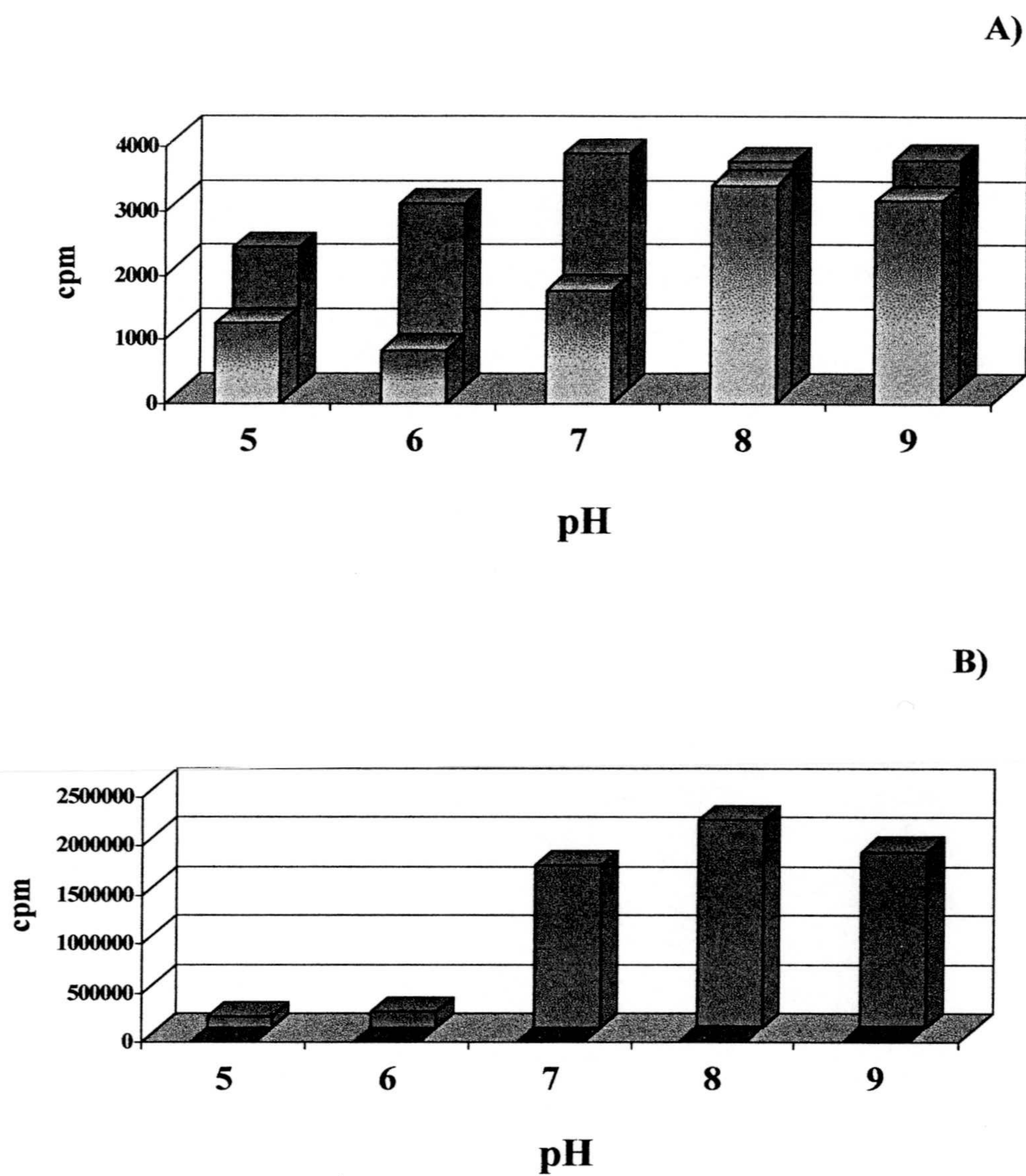


Fig. 19. Determinación del pH óptimo para la actividad transcriptasa inversa de la proteína recombinante de L1TcRTRN. A) □ poli(rA)/oligo(dT). ■ poli(rC)/oligo(dG). B) □ poli(dA)/oligo(dT). ■ poli(dC)/oligo(dG). Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos.

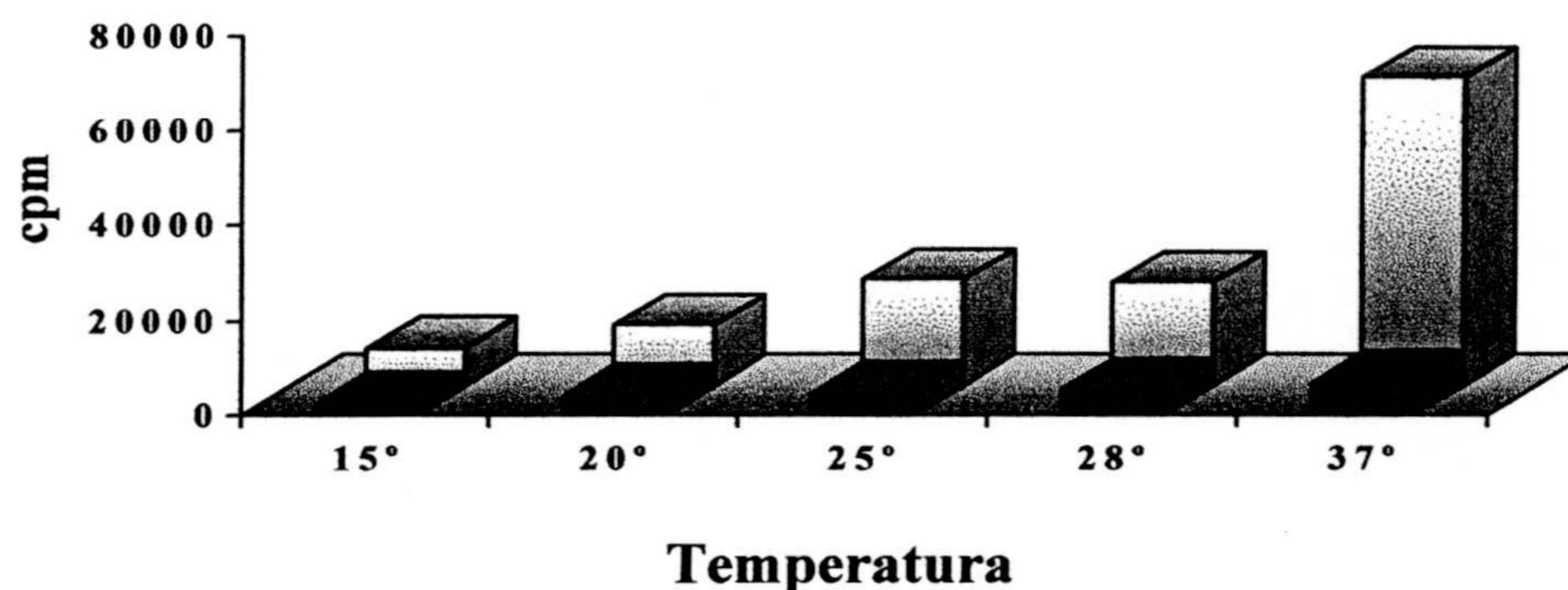


Fig. 20. Efecto de la temperatura en la actividad transcriptasa inversa de la proteína recombinante L1TcRTRN. ■ poli(rA)/oligo(dT). □ poli(dA)/oligo(dT). Las reacciones se llevaron cabo como se describe en métodos, a temperaturas de 15, 20, 25, 28 y 37° C.

de los fragmentos de un tamaño aproximado de 300 y 350 pb respectivamente, se hizo una nueva amplificación usando solamente los oligonucleótidos externos, T7 y M13r, de ésta forma se obtuvo la doble cadena mutada de un tamaño aproximado de 750 pb, ésta banda se digirió, al igual que el plásmido pQL1TcRTRN con las enzimas de restricción Bsu36 I (2631) y Nru I (2971), obteniéndose un fragmento de 340 pb que se clonó en reemplazo del mismo fragmento no mutado (Fig. 22).

La segunda mutación consistió en cambiar el ácido aspártico (D) 313, por una isoleucina (I), se utilizó el mismo fragmento subclonado en PBSSK y la primera amplificación se hizo con el oligonucleótido mutado RTI3 5' – GGGTGTACAGCAGACATGTATGCGGACATCCTCTC – 3' y T7 de PBSSK y la segunda amplificación se hizo con el oligonucleótido complementario mutado RTI1 5' – GAGAGGATGTCCGCATACATGTCTGCTGTGACACCC – 3' Y M13r de PBSSK (Fig. 22), igual que en el caso anterior se purificaron los fragmentos de un tamaño similar al anterior y se realizó otra amplificación con los oligonucleótidos externos para obtener el fragmento mutado de un tamaño

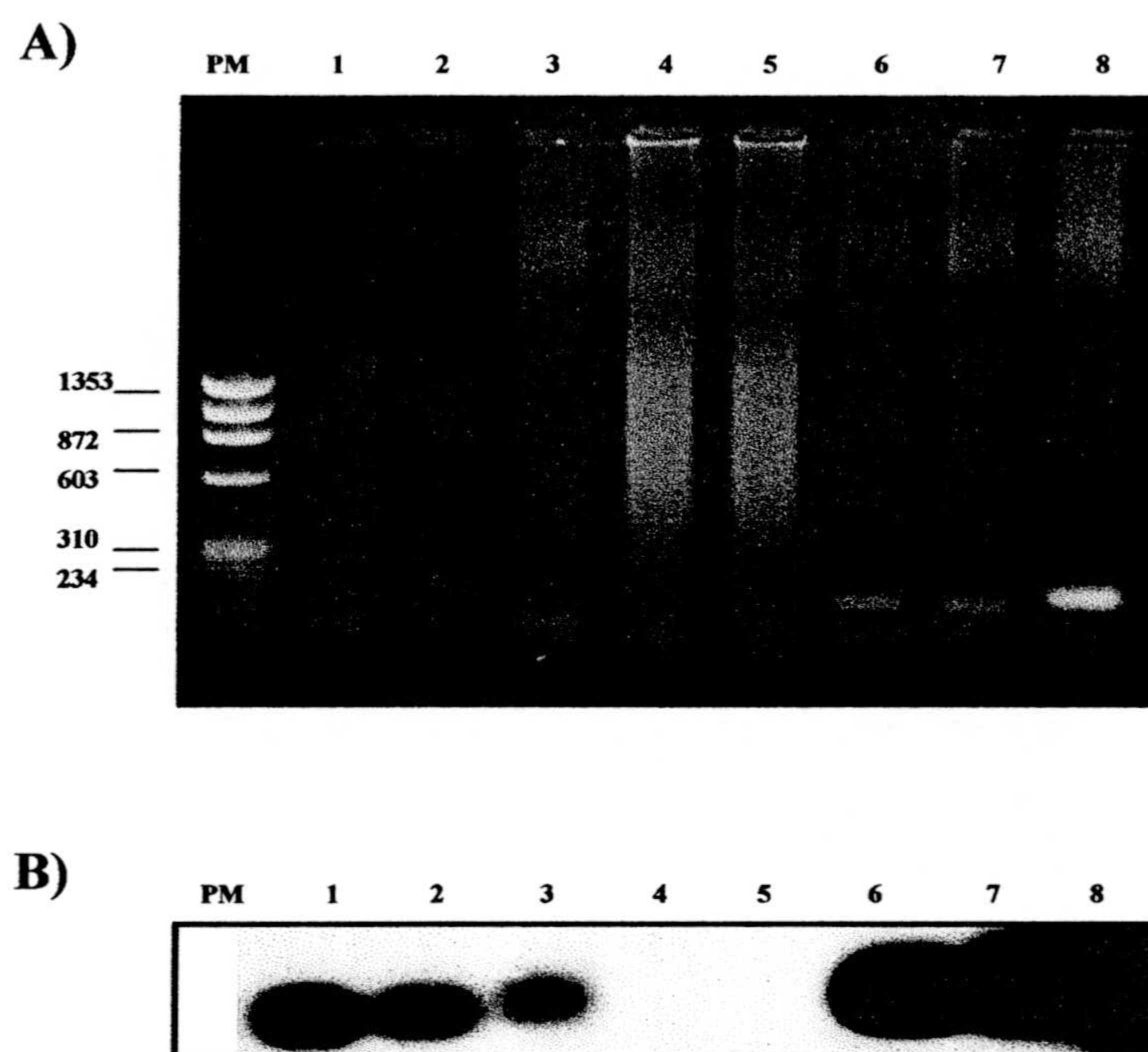


Fig. 21. Detección de actividad Transcriptasa inversa de la proteína recombinante L1TcRTRN mediante ensayo de RT-PCR. La actividad enzimática se determinó usando como molde de la RT, ARN del virus del mosaico de tabaco (BMV) con amplificación posterior por PCR. A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR. 1,7, MuLV. 2,6, L1TcRTRN. 3,5 ADNpol. 4, no enzima. 8, AMV. 1 a 3 sin ADN activado. 4 a 8 con ADN activado. B) Autoradiografía del Southern-blot correspondiente.

aproximado de 750 pb, el cual se clonó en una forma similar al anterior (Fig.22). Las mutaciones y las clonajes se confirmaron por secuenciación.

4.10. Expresión y purificación de los mutantes

Las proteínas mutadas se expresaron en iguales condiciones a las silvestres obteniéndose un resultado similar (Fig. 23), por lo tanto, se procedió a purificarlas siguiendo el mismo protocolo. A una alícuota de las proteínas concentradas se le realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, con

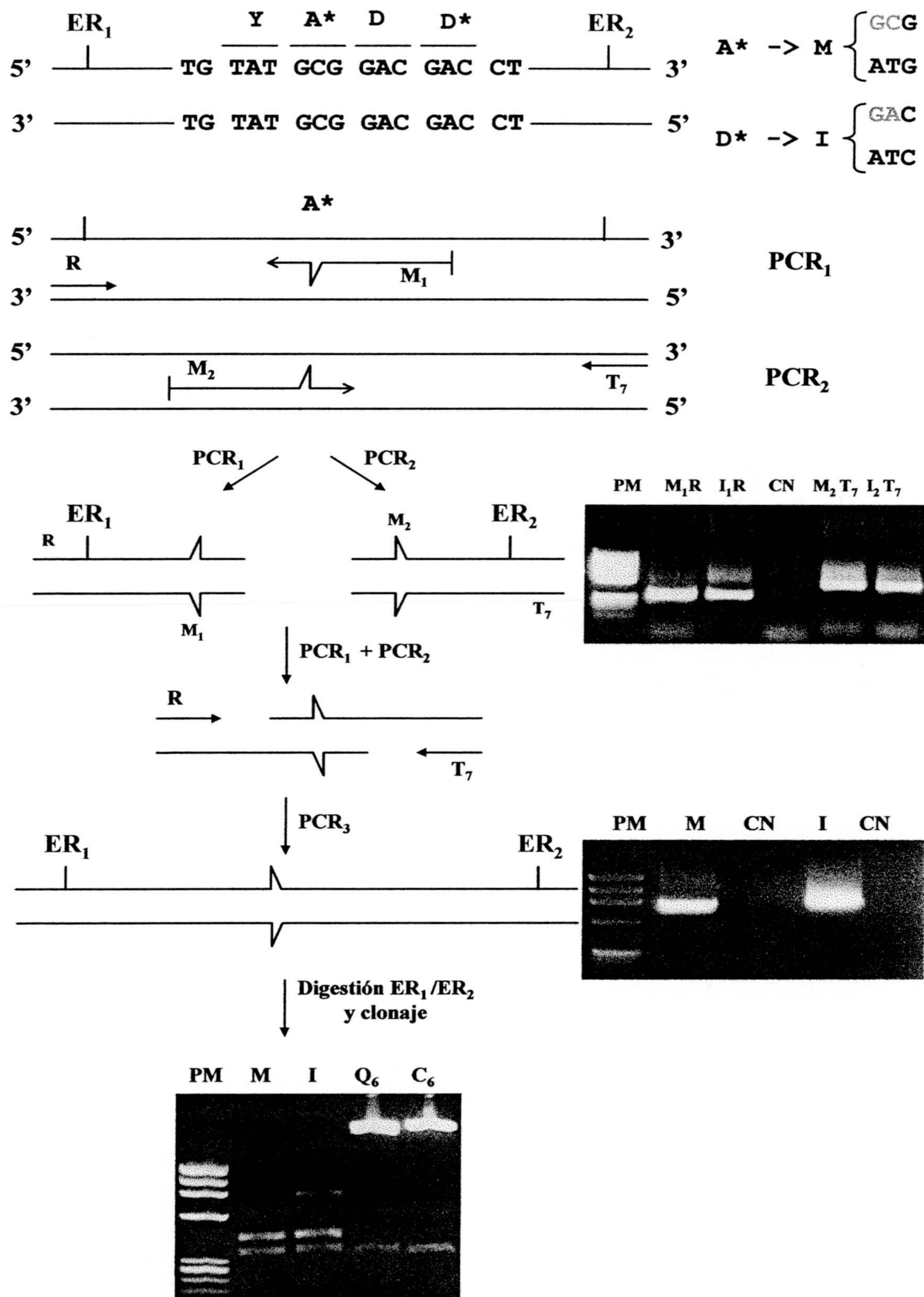


Fig.22. Mutagénesis dirigida sobre L1TcRT. Las mutaciones se realizaron como se describe en métodos.

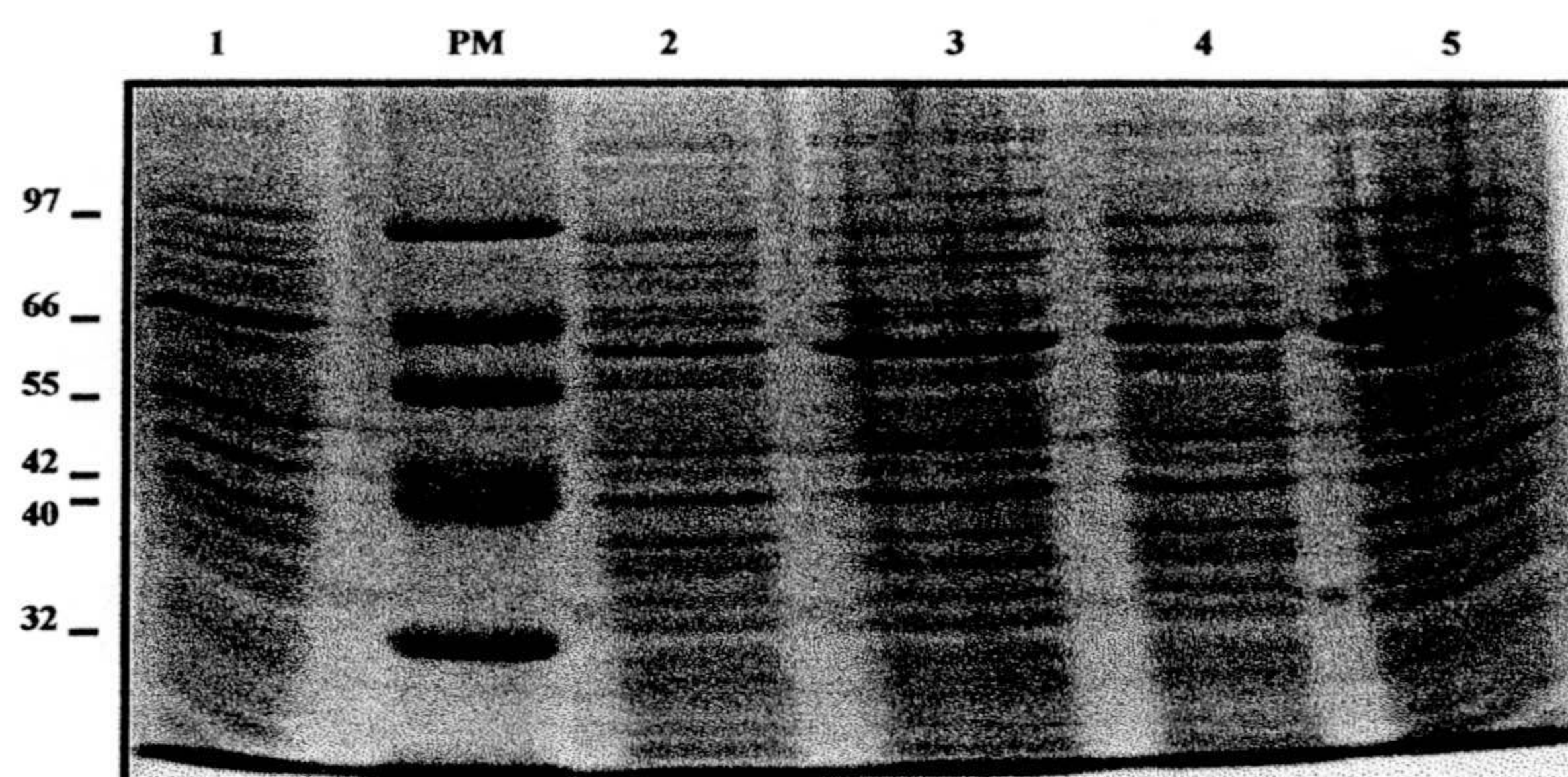


Fig.23. Expresión de la proteína recombinante L1TcRTRN mutada en A311M y D313I. 1. L1TcRTRN silvestre luego de 3 horas de inducción con 0,5 mM de IPTG. 2 y 3. L1TcRTRN mutante A311M a 0 y 3 horas de inducción. 4 y 5. L1TcRTRN mutante D313I a 0 y 3 horas de inducción.

coloración de azul de Coomasie (Fig. 24 A) y un western de confirmación (Fig. 24 B).

4.11. Determinación de actividad de los mutantes

Los efectos de las diferentes sustituciones realizadas en el dominio catalítico de la transcriptasa inversa YADD sobre la actividad transcriptasa inversa se muestran en la Figura 25. El reemplazo de la Ala 311 por Met produce un ligero aumento en la actividad con respecto a la proteína silvestre, en contraste con el reemplazo del Asp 313 por Iso que dió una enzima con actividad casi nula cuando se utilizaron los homopolímeros de ribonucleótidos poli (rA)/oligo(dT) y poli (rC)/oligo(dG) y una disminución de un 75% cuando los

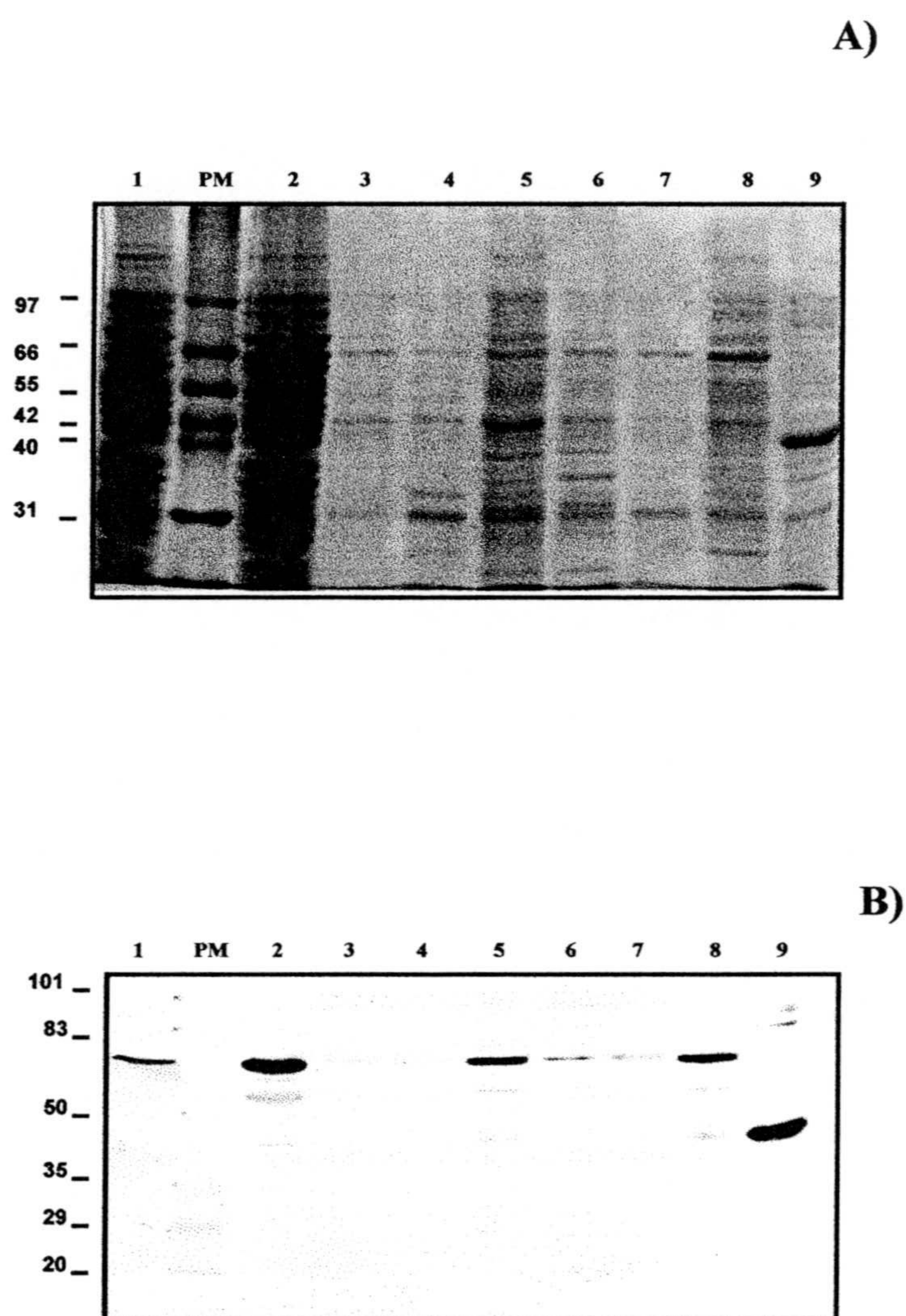


Fig. 24. Purificación de la Transcriptasa inversa silvestre L1TcRTRN y mutantes. A) PAGE-SDS coloración de Coomassie. 1. L1TcRTRN silvestre 0 horas de inducción. 2. inducción de 3h. 3.4. L1TcRTRN tipo silvestre purificada 5. 6. L1TcRTRN mutante Met. 7. 8. L1TcRTRN mutante Iso. 9. L1TcRT. B) Western blot correspondiente utilizando un AcMo antiHistidinas.

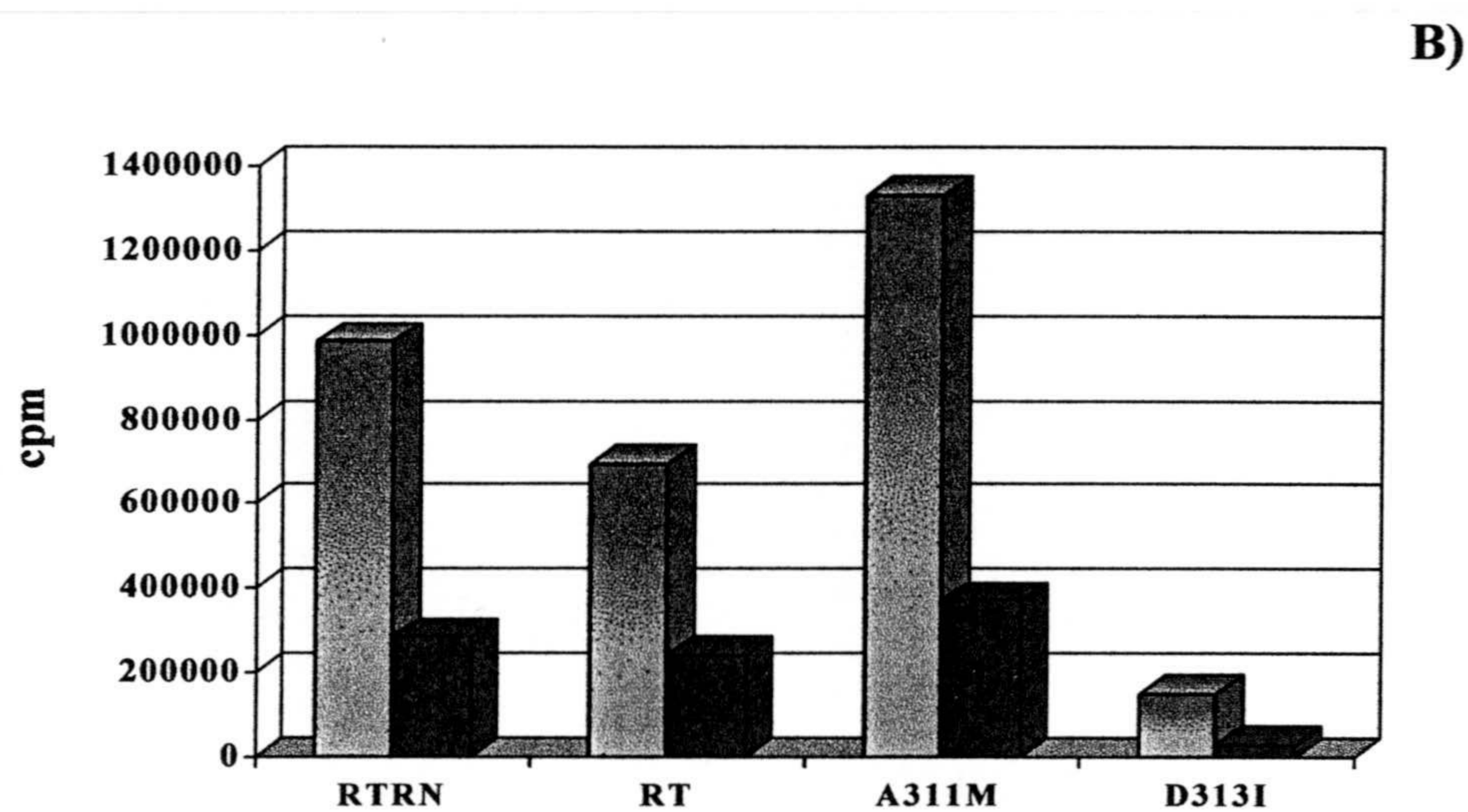
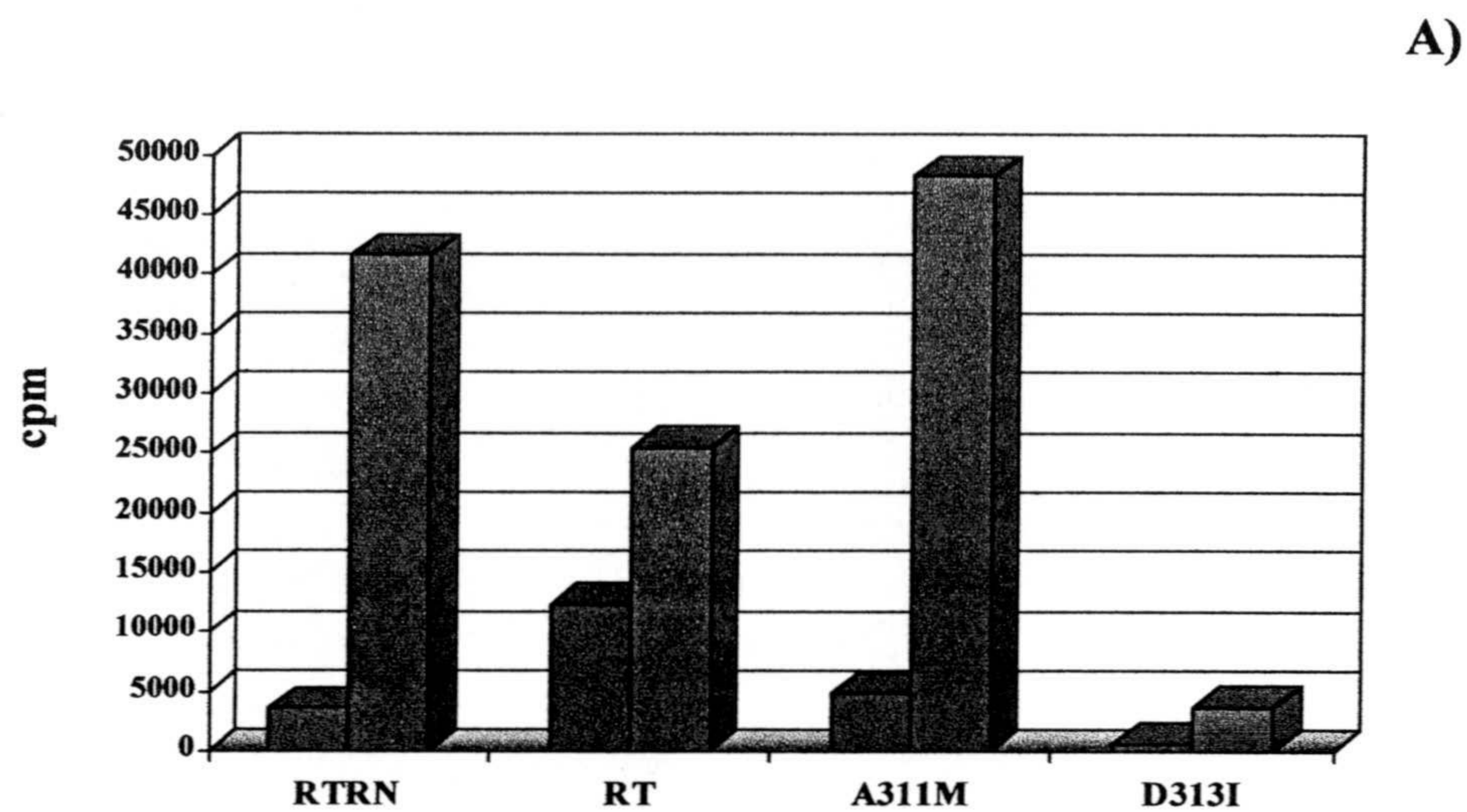


Fig. 25. Determinación de actividad transcriptasa inversa con diferentes homopolímeros de la proteína recombinante L1TcRTRN silvestre y mutantes A311M y D313I. A) ■ polir(rA)/oligo(dT). ■ poli(rC)/oligo(dG). B) ■ poli(dA)/oligo(dT). □ poli(dC)/oligo(dG). Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos.

homopolímeros usados fueron poli (dA)/oligo(dT) y poli (dC)/oligo(dT) comparado con la proteína no mutada.

4.12. Otras actividades asociadas a la Transcriptasa inversa

En el caso de los retrovirus y los retrotransposones del tipo LTR se ha descrito una actividad ARNasa H asociada a la transcriptasa inversa, existiendo como un dominio en la zona carboxiterminal de la RT (Tisdale y col., 1991; Clare y Farabaugh 1985) siendo esencial para la conversión del ARN en doble cadena de ADN. Estudios funcionales unidos a la existencia de las estructuras cristalizadas de la ARNasa H de HIV (Davies y col. 1991) y de *E. coli* (Katayanagi y col., 1990; Yang y col., 1990), revelaron estructuras similares a pesar de presentar una homología de aminoácidos solamente del 24%, conservándose cuatro residuos relacionados con el mecanismo catalítico, un ácido aspártico (D) , ácido glutámico (E), a una distancia de 35 residuos otro ácido aspártico (D) y un último ácido aspártico (Katz y Skalka, 1994). Basados en éstos estudios y dado que para los retrotransposones no – LTR no se ha descrito ésta actividad se hizo una búsqueda de éstos aminoácidos en los diferentes retrotransposones mediante el programa de (Fig.26) .

4.13. Clonaje de la ARNasa H de L1Tc

El dominio L1Tc ARNasa H se clonó a partir del plásmido pQL1TcRTRN eliminando el dominio RT, para ello el plásmido fué digerido con BglII que corta en el sitio múltiple de clonaje, hacia la zona 5' del fragmento y EcoRV que corta en 3063 de L1Tc, sacando un fragmento de 1300 pb aproximadamente éste sitio de restricción está presente entre los dominios RT y RNasa H. Para no perder la fase de lectura, el extremo protuberante dejado por el corte con BglII se rellenó con la enzima Klenow, seguido de una religación del fragmento (Fig.27). La mezcla de ligación, se transformó en la cepa de *E.coli* XLI-B y

**Motivos RNasaH conservados en 13 non-LTR
Retrotransposones, HIV y E.coli**

dirsl-1	1	.FDLRMKS MEDQINNLSLAFTRFMKEPMFSSNTNSRSQ.PSHDDSNTENE
llrn-1	1	..VQNIQEIQDSMRRSNLRIIGIEESEDSQLKGPVNVF.....NKIIEE
r1bm	1	.RKKATWMEPDYQTSQILTGHGIFNKRLADMRLREGHA....CDCGAVEE
r1dm-2	1	..VLGGAPPLDLAAKLLAIKYKLRGFPLEENDWLYGE....DIACLSWE
cin4	1	.FDL.WAWCSDPCEIPKEVWLTVSEPDPELPPISTPLP....LVGAHHA
ifactor-2	1	..GIIGNELADQAAKLASNMPLIVTPNINNTDIKRHLK...AELATKQKE
rnasecoli	1	..LKQVEIFTDGSC LGNPGPGGYGAILRYRGREKTFSAGYTRTTNNR.ME
rnasehiv	1	.IVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTNKGRQKVSLT....DTTNQKTE
rnasel1tc	1	..KEAGPSPHDLRTFVIGYGASKLRYGSELIWAVATDS.....AKNE
tad1-2	1	.AADREEWLEDATNREWVSRYNHHLAAAVAKSGQRYEFTIADLNPKFSGE
bmrD	1	...RWRYLGVDFEASGCVTLEHSISSALNNISRAPLKP.....QORLE
cre2	1	.LKGADGDKDDDTYSFLSDDSDTEDRVPEDIDDRSTSTSTFTQELSPQTAE
tart-b12	1	.NRNSHTLALDENTSRLLEEKRILSRVFKATKNYEDKA.....KLKAAE
llmd-2	1	.RTSGGITMPDLKLYYRAIVIKTAWYWYRDRQVDQWNR.....IEDPE
loa2	1	.GVPLKCKVGDDIPSPHCITLFCPRSVGRSTESLLVLL.....RNQNRIE
consensus	1	D E
dirsl-1	49	QSEDESSNNV....DVPTDYQLSDTLLGQYKHMVNNQGLLVEEECILKRD
llrn-1	43	NFPNLKKEIPIG IQEAYRTPNRLDQKRNTSRHIIVKTPNAQNKERILKAV
r1bm	46	DRDHVLWECP...LYDEIRGRMLDGISRSEVGPVYHADLVRDEKNFLLR
r1dm-2	45	QRKTRLEECL...IQSWQNRWDDSEPGRVTHRFIPYVTLAYRDPSFGFS
cin4	45	PTDLKKGHVY...TLRNHLEVVEDLCFIHGRNTRGGPMNRKPRREFVWSY
ifactor-2	46	NIINCNQWYQ...SLNTNNTHTCDYLKQTHQNWTRLDQIKIIRLRLGHTN
rnasecoli	48	LMAAIVALEA..LKEHCEVILSTDSQYVRQGITQWIHNWKKRGWKTADKK
rnasehiv	46	LQAIHLALQD....SGLEVNI VTDSQYALGIIQAQPKSESELVSQIIEE
rnasel1tc	41	MQKTYATLAR....IVSGVPSTVDPESALLEANMPPLHVLCLRARLSIFE
tad1-2	50	AIQRHVMVGTKKKKGRRRKPEEEDEPYPLTKAKSSLLVQARTEVIGLRAF
bmrD	41	ILRAHLIPRF..QHGFVLGNISDDRRLRMLDVQIRKAVGQWLRLPADVPA
cre2	50	DGEHVFGGHV.DPAVLGDWSEEDDSLEQETADRACRGSAAAKTERHRSM
tart-b12	44	NRLKKAIKIL.RENRINEQVEGIDTSNPDRMRKMWKLLEDEGKRTNQPNFP
llmd-2	43	MNPHTYGH LI.FDKGAKTIQWKKDSIFNNWCWHNWLLSCRMRIDPYLSP
loa2	45	TDTWKVISRR.NEGGALLVIAIDELSKCILWRRGTMS SPLRTIPVSGLK
consensus	51	D
dirsl-1	95	EISELNKVFNFPSNFQVNVAPFGTPEGITVSSNVKNNDTDLLSVEKRIN
llrn-1	93	REKGQVT.....YKGRPIRITPDFSPETMKARRSWTDVIQTLREH
r1bm	93	EFAIHGT.....RRALRANHEDCLATKNVGDVSSPRTGRM
r1dm-2	92	MRTSFLL....TGHGSFNAFLHGRALS DTTACACGDPYEDWMHILCACP
cin4	92	GVSDSAG.....EKREERSEEFRGRETMRRDWDHDDDEDFHQHRHQ
ifactor-2	93	ITHQHYL.....NPNPITVCPFCQGDLSISHILNS
rnasecoli	96	PVKNVDL..WQRDAALGQHQIKWEWVKGHAGHPENERCDELARAAAMN
rnasehiv	92	LIKKEKV.....YLAWVPAHKGIGGNEQVDKLV SAGIRK
rnasel1tc	87	NTRACQM..DWMRRPPEPPPRAGFRISPLSRDELYAFV DAYTKDYGIT
tad1-2	100	LHRRKVPDVLTPICACGLEKETFAHIVLNCLDAETLFWSDPDSWPLSKE
bmrD	89	YYHAAVQ.....DGGLAIPSVRATIPDLIVRRFGGLDSSPWSVAR
cre2	99	KFLERLA.....QHESMTHSPTSPGDVIRAVIEEDEASSALFAC
tart-b12	93	LKLETQK..GPKWTKTIKETTET FVSHLEGRFKPNNNVPDYHIDRVNTG
llmd-2	92	CTKVKSK.....WIKELHIKPETLKLIEEKVGSLEDMGTGEKF
loa2	94	KKTGAKP.....QPAPTGKEDVSVGNITTS DTPASEQSSP
consensus	101	D

Fig.26. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la zona carboxiterminal de la proteína recombinante L1TcRTRN de *T. cruzi*, con la ARNasa H de *E. coli*, HIV y 13 retrotransposones no-LTR.

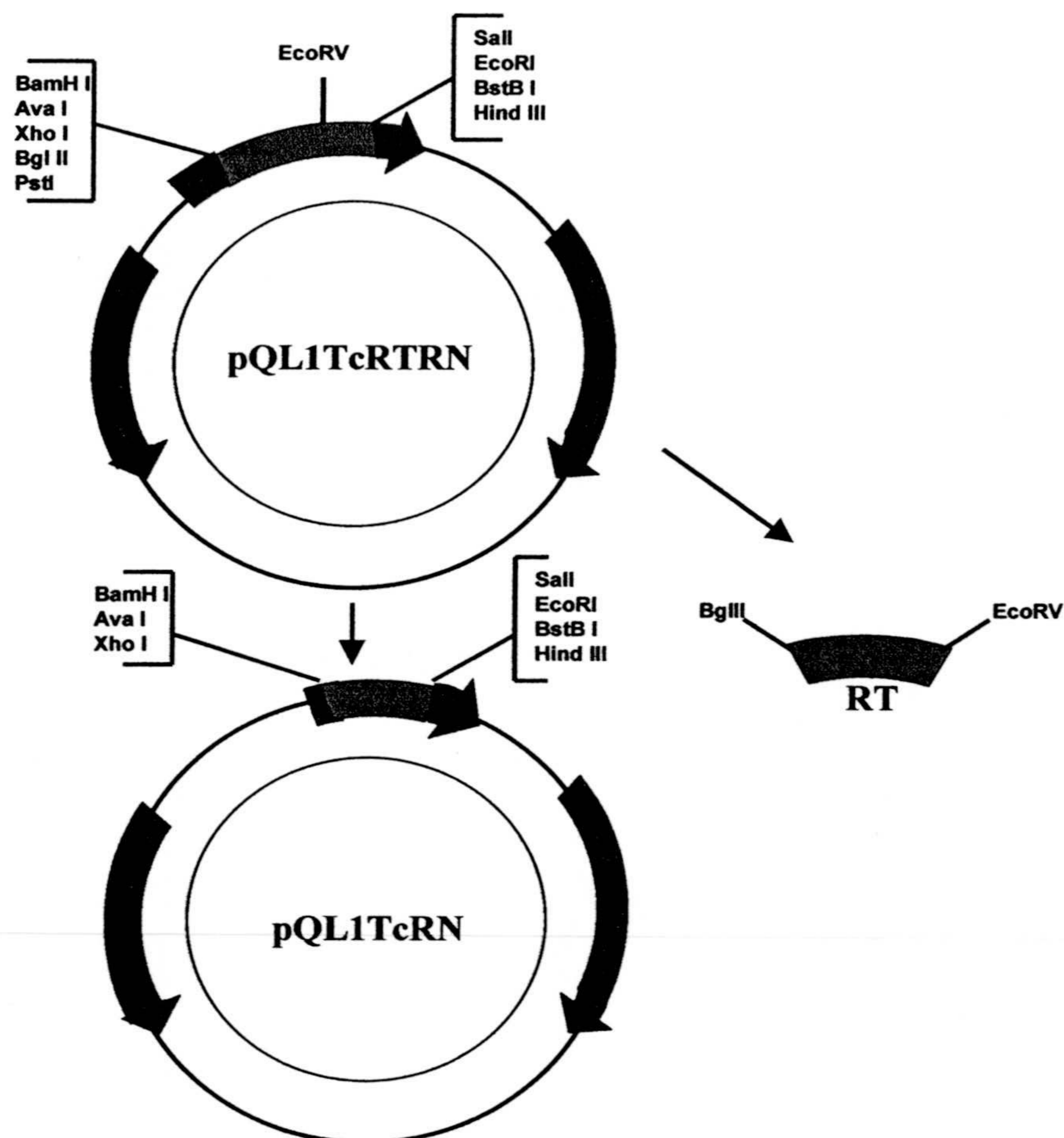


Fig.27. Representación esquemática de la construcción del pQL1TcRN. El ORF2 de L1Tc fue digerido con las enzimas BglII y EcoRV como se describe en métodos para eliminar el dominio correspondiente a la RT.

luego de la selección y comprobación tanto por análisis de restricción como por secuencia del plásmido recombinante se transformó en la cepa M15 para su expresión y recibió el nombre de pQL1TcRN.

4.14. Expresión y purificación de la ARNasa H de L1Tc

La expresión del dominio ARNasa H de L1Tc se obtuvo mediante la inducción con 0,5 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C, la proteína obtenida tenía el tamaño esperado de 32 kDa (Fig. 28).

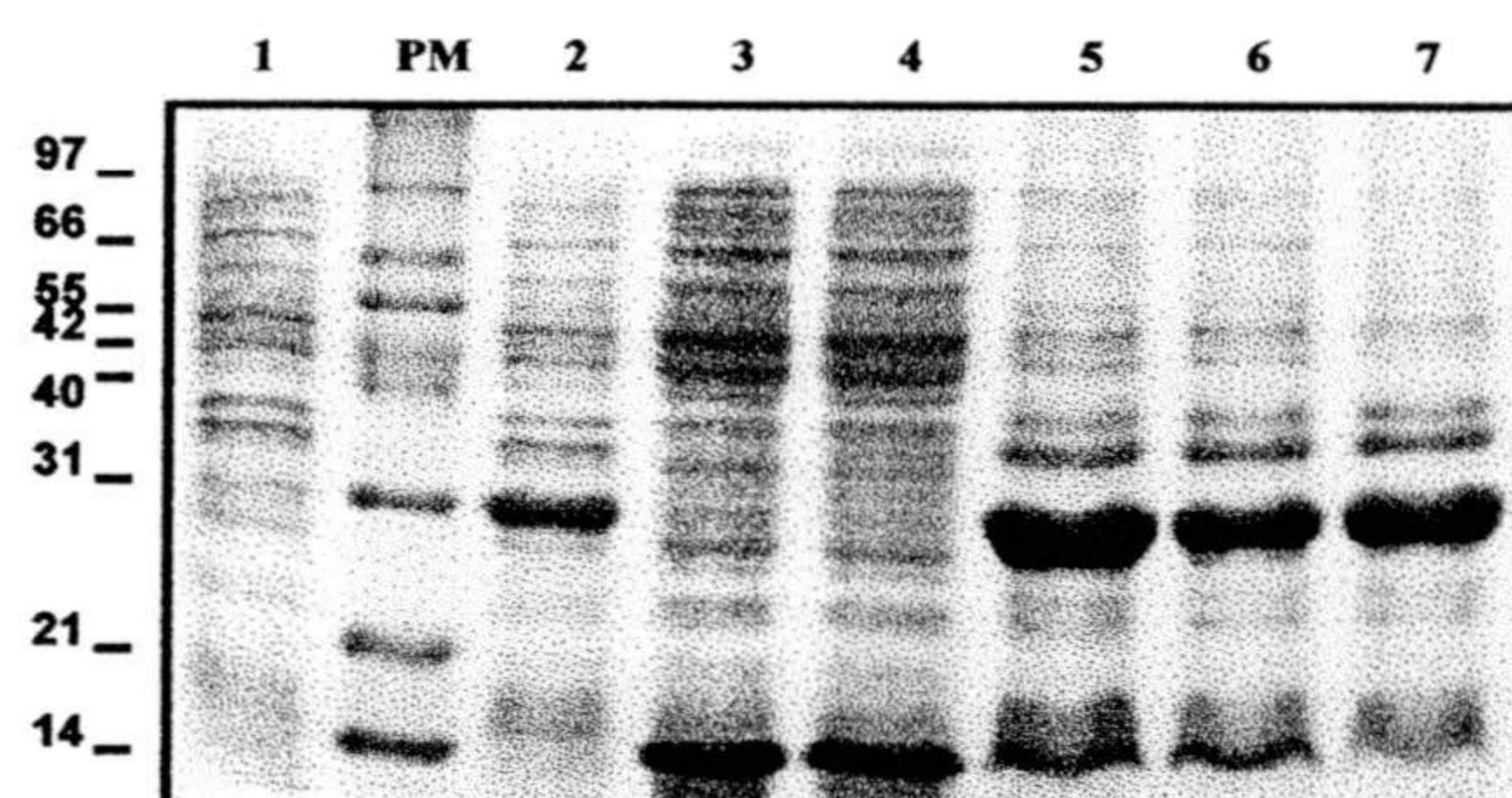


Fig. 28. Expresión de la proteína recombinante L1TcRN. 1.2. 0 y 3 horas de inducción con 0,5 mM de IPTG. 3. Fracción soluble. 4. Fracción soluble luego de la resina. 5 y 6. Extracción de la proteína con 8M de úrea, antes y después de la resina. 7. Fracción insoluble.

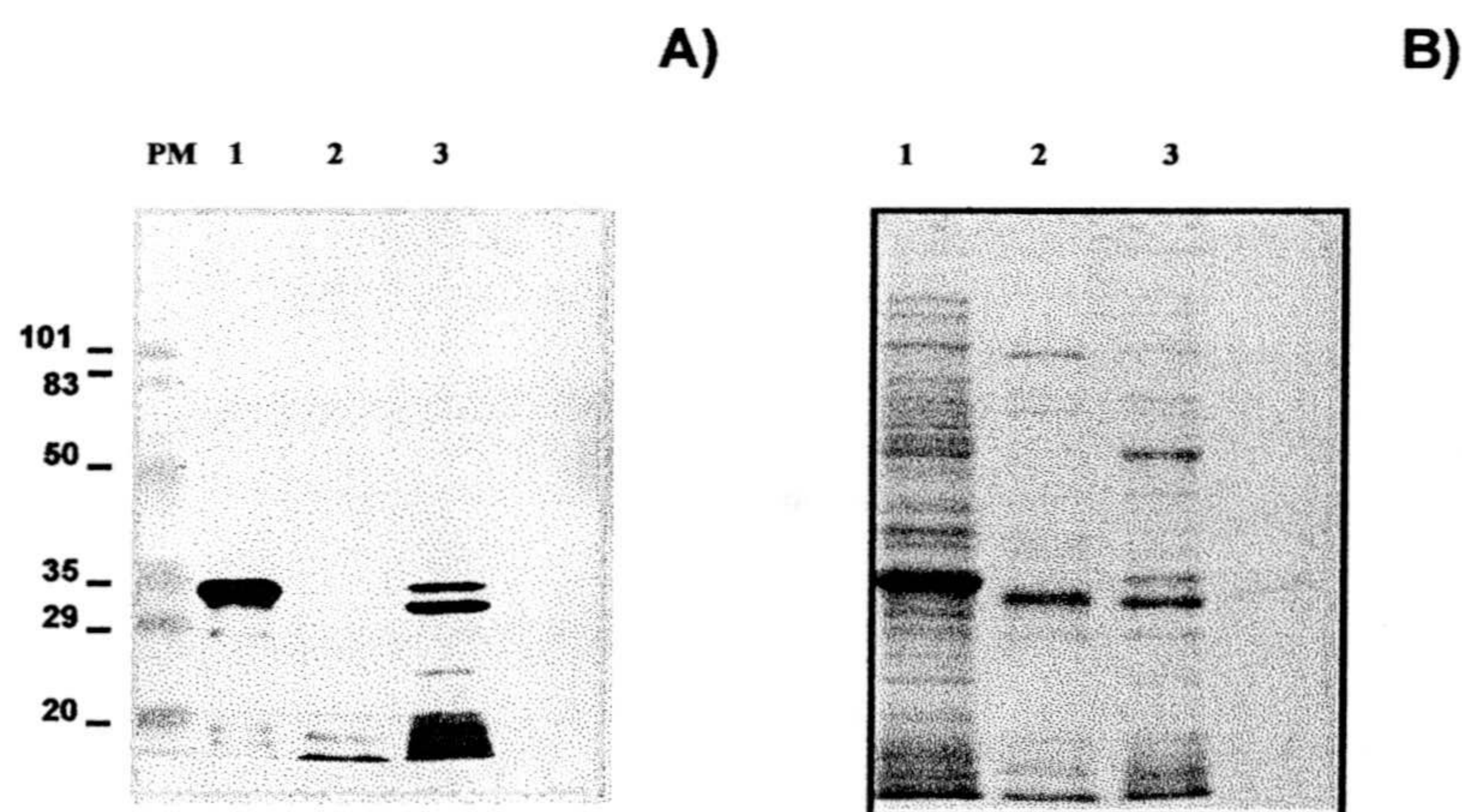


Fig. 29. Purificación de la proteína recombinante L1TcRN. 1. 3 horas de inducción. 2. L1TcRN purificada y concentrada a partir de la fracción soluble. 3. L1TcRN purificada y concentrada a partir de la extracción con 8 M de úrea. A) Western-blot correspondiente, frente a AcMo antihistidinas. B) PAGE-SDS coloreado con azul de Coomasie.

La purificación se realizó con un método similar al ya descrito, principalmente a partir de la fracción soluble dado que ésta proteína presentó una mayor solubilidad que las anteriores. En la figura 29 B se puede observar la proteína luego de diálisis y concentración. En la figura 29 A se observa el resultado del western de la proteína concentrada frente a un Ac monoclonal dirigido contra las histidinas, presentando un grado de purificación del 90% y algo de degradación.

4.15. Determinación de actividad ARNasa H de L1Tc

4.15.1. Homopolímero

La determinación de la actividad ARNasa H se realizó, no solamente con la proteína RN de 32 kDa sino también con la proteína RTRN de 66 kDa y como controles, la RT de 40 kDa, la ARNasa H de *E. coli* y de HIV. La integridad del sustrato [^3H] poli (rA): poli (dT) se confirmó mediante la incubación de éste con nucleasa S1, mung bean y ARNasa A, las cuales no lo degradaron luego de 1 hora de incubación (Fig. 30). La actividad ARNasa H se determinó por lo tanto, con éste sustrato, inicialmente, bajo las condiciones óptimas para la ARNasa H asociada a la RT de HIV, la figura 31 muestra la actividad en éstas condiciones de las fracciones ensayadas.

El efecto de los cationes metálicos divalentes se ensayó utilizando diferentes concentraciones tanto de Mg como de Mn, en el primer caso la proteína RTRN de L1Tc mostró un ligero aumento a mayores concentraciones al igual que la enzima de *E. coli*, mientras que la RT no mostró ningún tipo de actividad y la RN una ligera disminución (Fig. 32). Por el contrario, cuando se utilizó el Mn tanto la RTRN de L1Tc como la RN mostraron una mayor actividad en relación a la observada con Mg mientras que la de *E. coli* tuvo un descenso considerable que iba relacionado con el aumento en la concentración del catión y la RN mostró mayor actividad a menores concentraciones de éste, la RT como en el caso anterior no mostró actividad (Fig. 33).

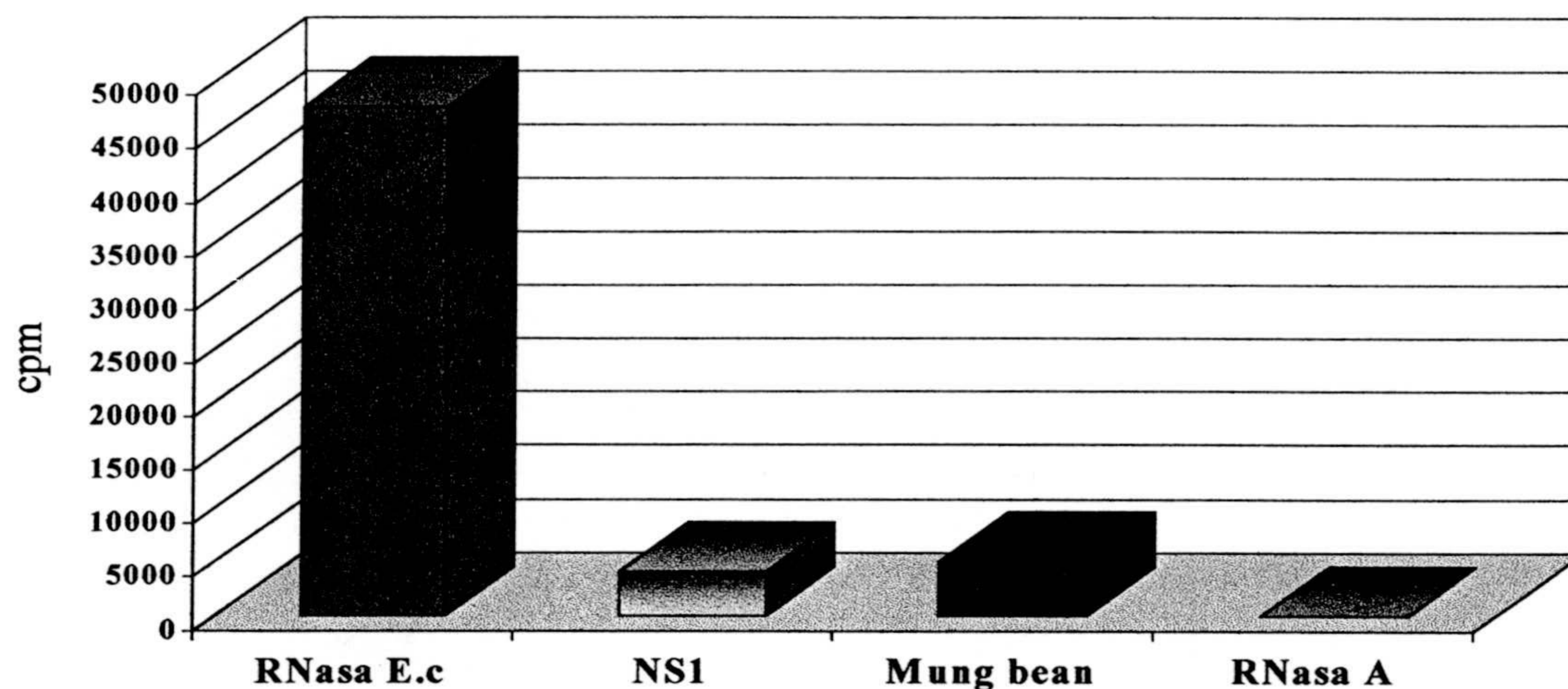


Fig.30. Análisis de la integridad del sustrato [^3H]poli(rA)/poli(dT) usado en la determinación de actividad ARNasa H. Los ensayos se realizaron según las condiciones descritas en métodos.

También se determinó el efecto del pH en la actividad ARNasa H, como se muestra en la figura 34, tanto la RTRN de L1Tc como la de HIV y la de *E. coli* tienen su pH óptimo entre 8 y 9, mientras que para la RN de L1Tc está en 7. Respecto al efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad, se vió un aumento de actividad paralelo al aumento de la concentración del sustrato tanto para la RTRN como para la RN de L1Tc (Fig.35) igual a lo observado con el aumento en la concentración de la enzima, en éste caso se hizo solamente con RTRN y como control se usó RT la cual no mostró ninguna variación (Fig. 36).

4.15.2. Ensayos de complementación

La actividad ARNasa H del L1Tc se evidenció también con ensayos de complementación en la cepa de *E. coli* MIC 3001, la cual es deficiente del gen *masa h* siendo su crecimiento dependiente de temperatura con lo cual solamente crece a 32°C y es letal a 42°C, sólo ocurrió la complementación

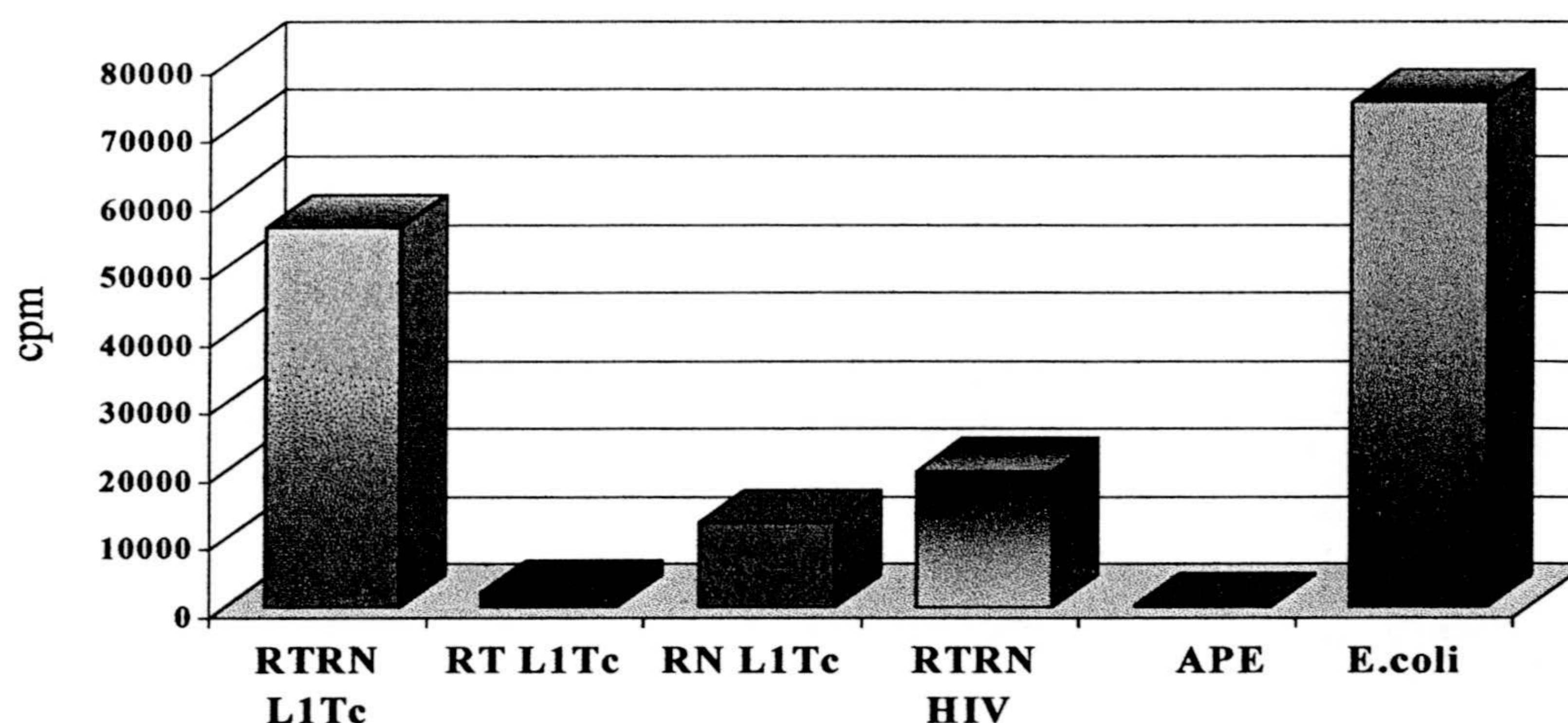


Fig.31. Determinación de actividad ARNasa H de las proteínas recombinantes L1TcRTRN y L1TcRN. Los ensayos se realizaron según las condiciones estándar descritas en métodos.

cuando la bacteria se transformó con el plásmido recombinante que llevaba el gen tanto RTRN como RN de L1Tc.

4.16. Mutagénesis dirigida de ARNasa H de L1Tc

Dado que se conocían los aminoácidos del sitio catalítico y el efecto deletéreo de mutaciones en algunos de ellos sobre la actividad ARNasa H de HIV (Schatz y col., 1989) y de Mo-MuLV (Johnson y col., 1986), se realizó la mutación D 439 N, mediante el método de PCR, utilizado anteriormente para la RT, en éste caso los oligonucleótidos usados en la primera amplificación y mutación fueron RN2 5' – CCATCTCACATAACCTACGCACG – 3' y Tcreb2c 5' TTTCTTAAGCAGTATTCCAACCCC – 3' y para la mutación y amplificación de la segunda cadena RN1 5' - CGTGCGTAGGTTATGTGGAGATGG – 3' y Osn2fa 5' – CGCACCCCCACCAGTATG – 3'. En la primera amplificación se obtiene una banda de aproximadamente 800 pb y en la segunda de 600 pb, éstas bandas se purificaron y se realizó la otra reacción en cadena de la polimerasa para obtener la banda de aproximadamente 1350 pb (Fig. 37) con

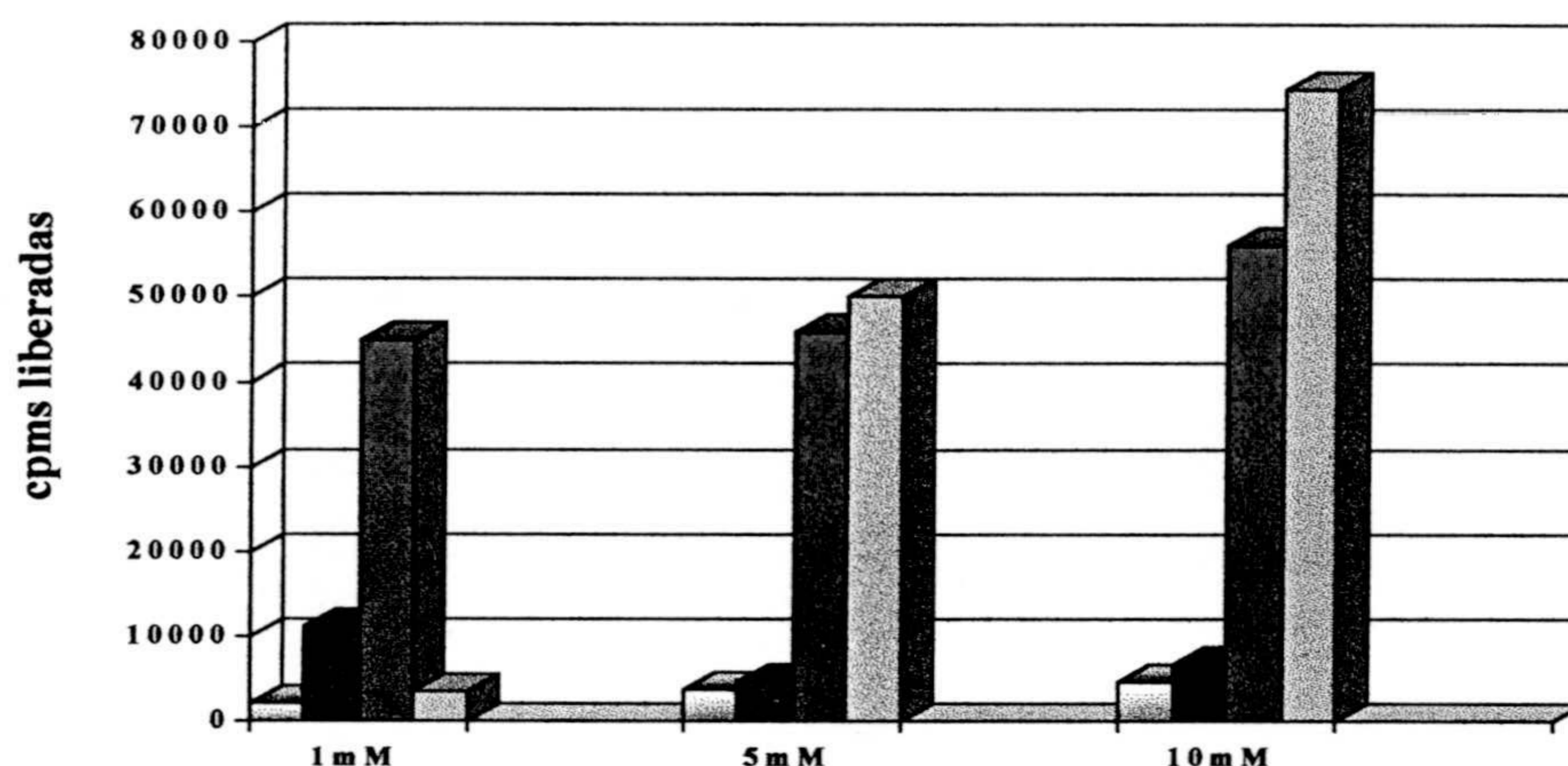


Fig.32. Determinación de actividad ARNasa H de las proteínas recombinantes L1TcRTRN y L1TcRN en presencia de diferentes concentraciones de Mg. □ L1TcRT. ■ L1TcRN. ■ L1TcRTRN. ■ ARNasa H de *E. coli*. Los ensayos se realizaron según las condiciones estándar descritas en métodos excepto las diferentes concentraciones de Mg^{2+} .

la mutación, ésta banda se digirió con EcoRV (3063) y Sall (3698) al igual que el pQL1TcRTRN donde se clonó el fragmento mutado, en el caso de pQL1TcRN las digestiones que se realizaron para el clonaje fueron con BglI y Sall. Las mutaciones y clonajes se confirmaron por secuenciación. Los plásmidos mutados fueron transformados en la cepa M 15 de *E. coli*.

4.17. Expresión y purificación de los mutantes de ARNasa H de L1Tc

Las bacterias con los plásmidos recombinantes se crecieron en condiciones similares a la tipo silvestre, obteniéndose una inducción de la expresión de la proteína similar, la purificación se realizó siguiendo el mismo protocolo y la electroforesis con coloración de Coomassie de las fracciones obtenidas y de la

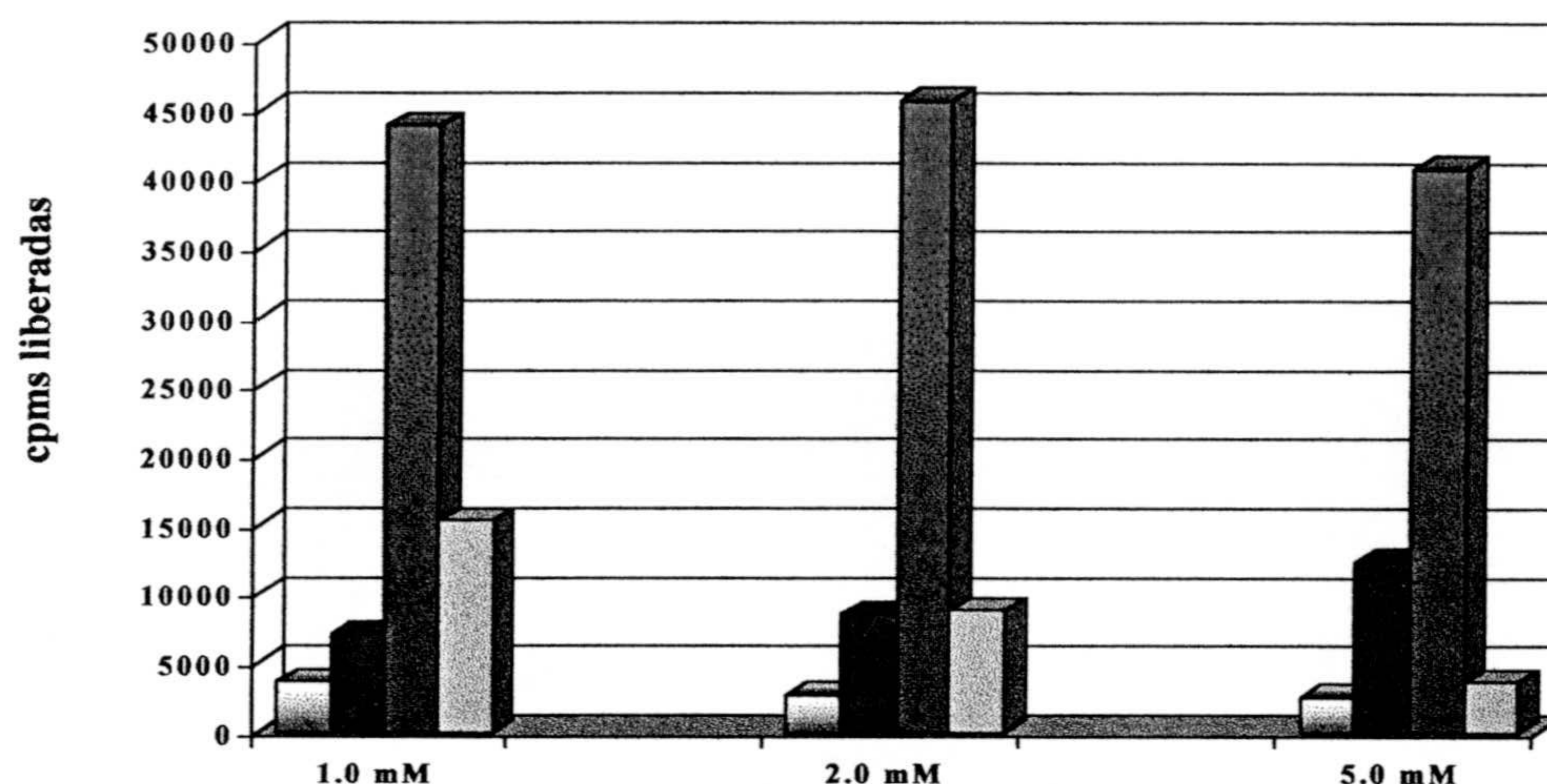


Fig.33. Determinación de actividad RNasa H de las proteínas recombinantes L1TcRTRN y L1TcRN en presencia de diferentes concentraciones de Mn.
 □ L1TcRT. ■ L1TcRN. ■ L1TcRTRN. ■ RNasa H de *E. coli*.
 Los ensayos se realizaron según las condiciones estándar descritas en métodos excepto las diferentes concentraciones de Mn²⁺.

proteína concentrada se muestra en la figura 38 A. Este gel también se transfirió para su confirmación por Western como se ve en la figura 38 B.

4.18. Determinación de la actividad RNasa H de los mutantes

La determinación de la actividad RNasa H de los mutantes se realizó usando el híbrido [³H] poli(rA) : poli(dT). El efecto de la mutación D 439 N se indica en la figura 39.

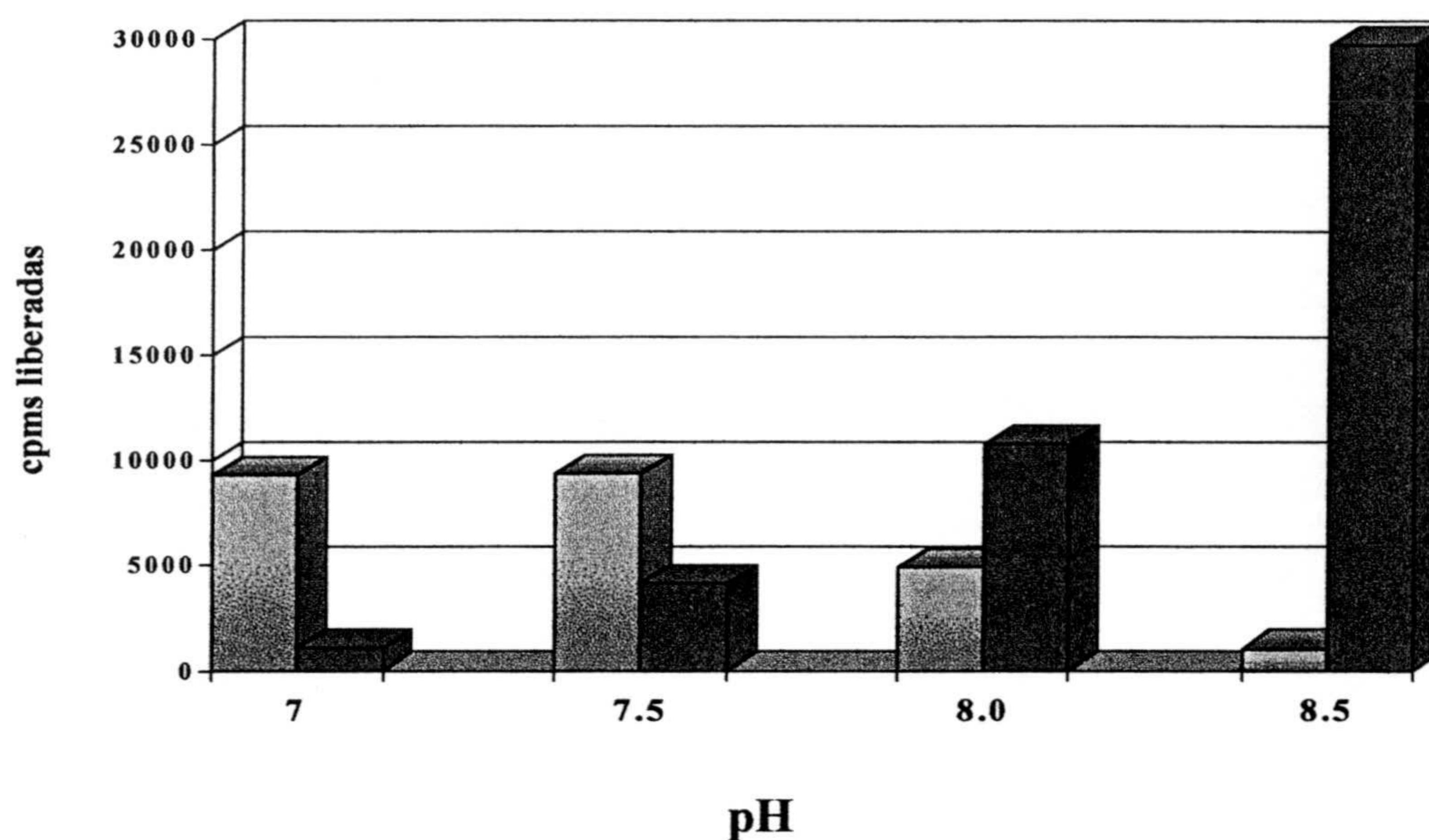


Fig.34. Efecto del pH en la actividad ARNasa H de la proteína recombinante L1TcRN. □ L1TcRN. ■ ARNasa H de *E. coli*. Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos, excepto la variación del pH.

4.19. Redefinición del ORF2

Los mayoría de los retrotransposones del tipo no-LTR poseen dos marcos de lectura abiertos, el primero presenta homología con proteínas de unión a ácidos nucleicos y el segundo es el que tiene homología con la endonucleasa y la transcriptasa inversa, en el caso del L1Tc ésta organización es diferente ya que el primer marco de lectura abierto codifica para una nucleasa, el segundo para la transcriptasa inversa y el tercero para la proteína de unión a ácidos nucleicos (Martín y col., 1995). Dado que en el L1Tc la región intergénica era bastante grande, que la secuencia se hizo en una genoteca de ADNc y la posibilidad de introducir mutaciones por la falta de capacidad correctora de la RT es bastante alta y pensando en la posibilidad de que ésta zona codificara

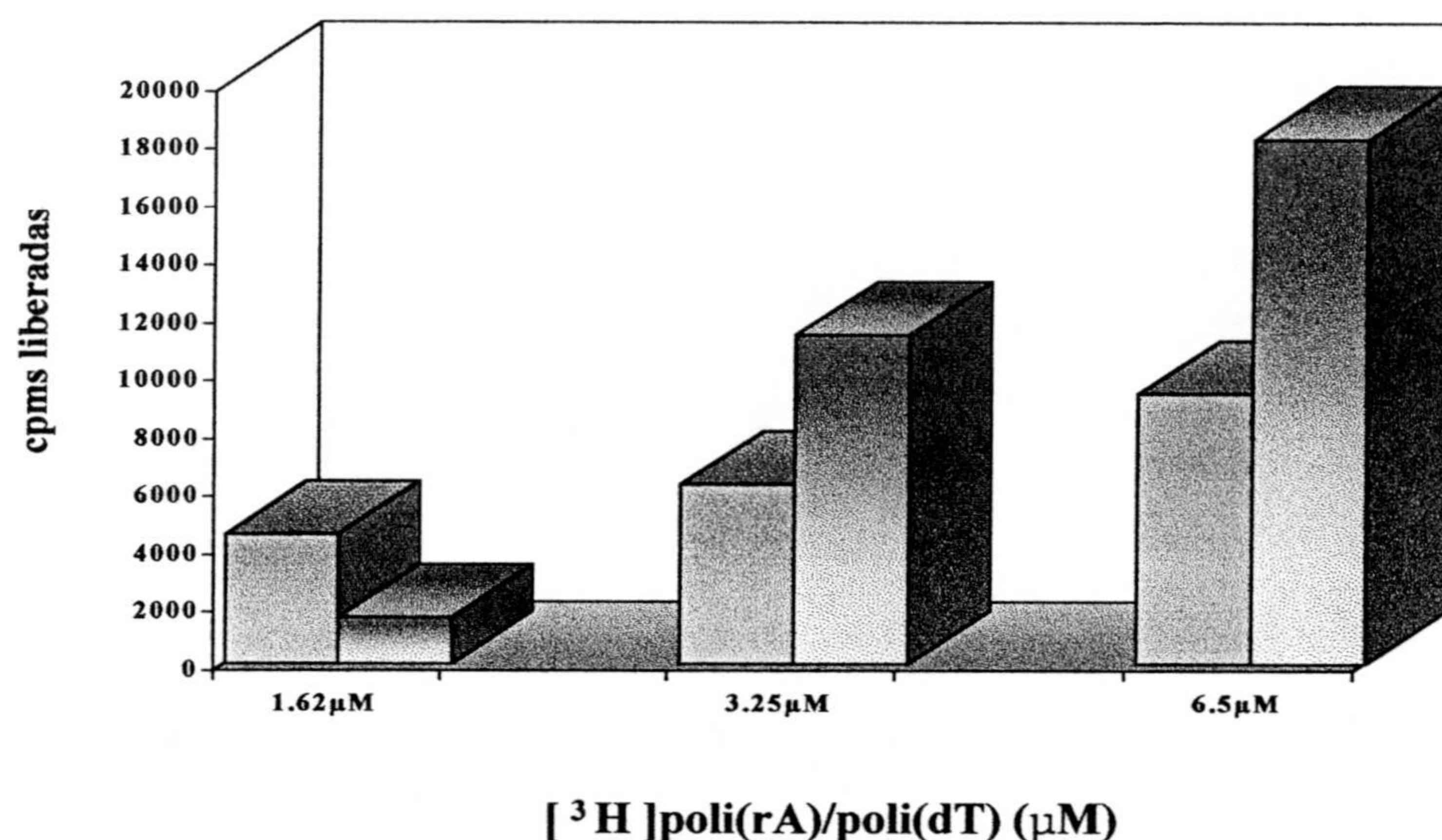


Fig.35. Efecto de la concentración de [³H]poly(rA).poly(dT) en la actividad ARNasaH de la proteína recombinante L1TcRN. □ L1TcRN. ■ ARNasa H de *E. coli*. Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos, excepto las variaciones en la concentración de sustrato.

para una proteasa, se decidió secuenciar nuevamente ésta región a partir de una genoteca genómica. Esto se hizo en un fragmento que contenía el L1Tc completo subclonado en pBSKS y proveniente de un clon positivo de pBac.

Al analizar las secuencias y hacer la comparación mediante un FASTA con L1Tc se observaron algunos cambios e inserciones presentes en la secuencia a partir del genómico pero no del ADNc, por lo tanto, al hacer la traducción a aminoácidos se produjo un cambio en el marco de lectura en la nucleasa a partir del aminoácido eliminándose el codón de parada de dicha proteína y la secuencia volvía a ser homóloga con L1Tc a partir del aminoácido 9 de la transcriptasa inversa. Con éste resultado la estructura del L1Tc presentaba dos

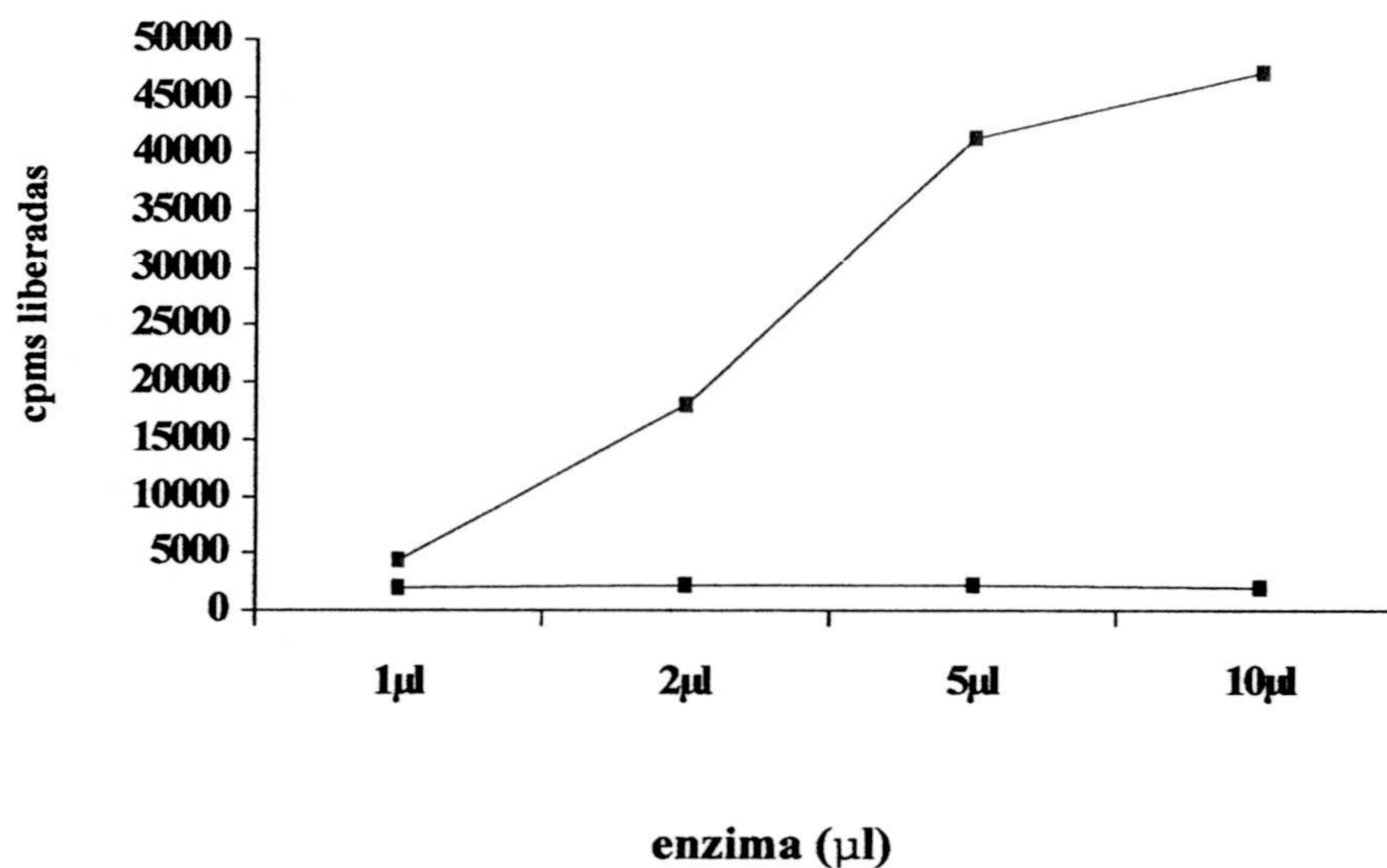


Fig. 36. Efecto de la concentración de enzima en la actividad ARNasa H de la proteína recombinante L1TcRTRN. ■ L1TcRTRN. ■ L1TcRT. Los ensayos se realizaron en las condiciones estándar descritas en métodos, excepto la cantidad de enzima.

marcos de lectura abiertos al igual que los retrotransposones no -LTR con la diferencia en el orden de sus proteínas.

4.20. Determinación de la actividad promotora de la secuencia 5' de L1Tc

Para analizar la actividad promotora de la zona 5' de L1Tc se utilizó el vector de transformación pTEX (Kelly y col., 1992) descrito para la expresión de genes de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*. Como gen reportador se utilizó el de cloranfenicolacetil transferasa (CAT) aislado a partir del plásmido pMSGCAT (Pharmacia) con la enzima de restricción Sall, siendo clonado en dicho sitio en el vector de transformación pTEX (Fig. 40), éste plásmido se denominó pCAT.

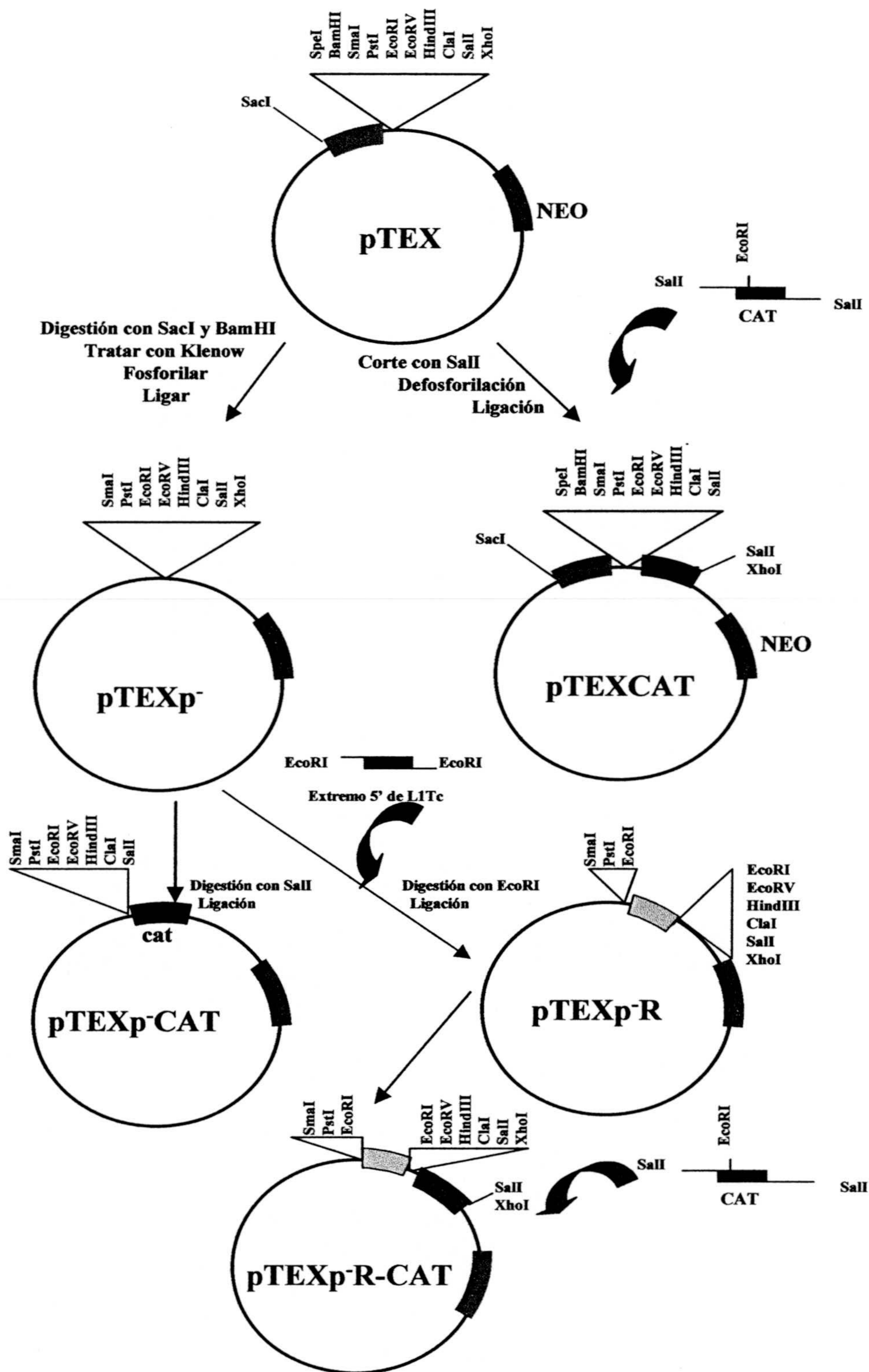


Fig.40. Estrategia de clonaje

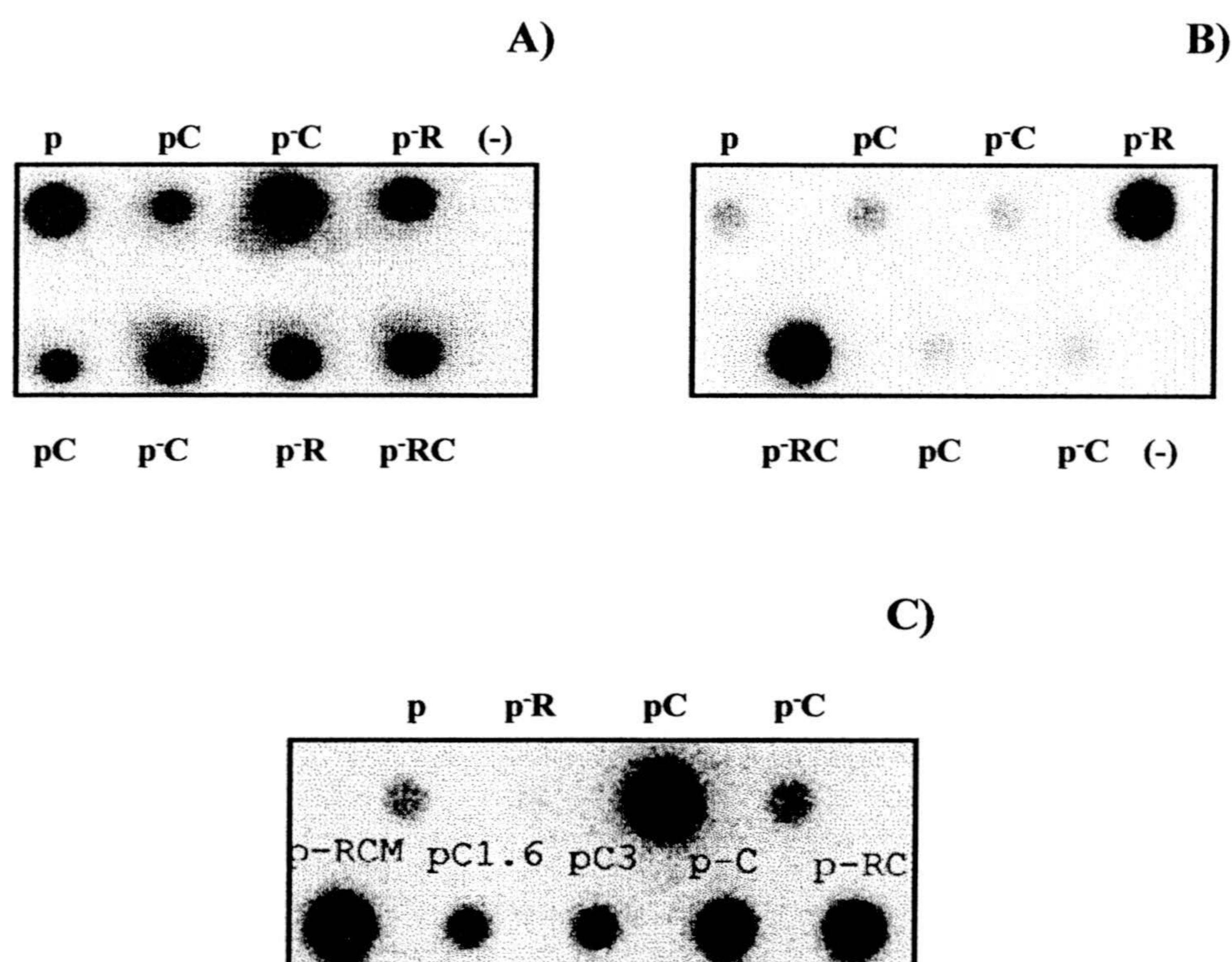


Fig. 41. Autoradiografía de los dot-blot de las diferentes construcciones de los plásmidos pTEX transformados en *Trypanosoma cruzi*. A) Se utilizó como sonda un fragmento de Neo marcado con ^{32}P . B) Se utilizó como sonda un fragmento de RIME marcado con ^{32}P . C) Se utilizó como sonda un fragmento de CAT marcado con ^{32}P .

Para la construcción del control negativo se utilizó éste plásmido al cual se le deletionó la zona promotora de pTEX usando las enzimas de restricción BamHI y SacI y se denominó p⁻CAT. Para el análisis de la actividad promotora de la zona 5' de L1Tc se usó p⁻C en el cual se clonó dicha zona en el sitio EcoRI del sitio de clonaje múltiple del plásmido, éste fragmento de 300 pb se obtuvo por digestión con EcoRI a partir del pSPFM55 el cual contenía el L1Tc, el plásmido resultante se denominó p⁻RCAT. Se construyó otro plásmido control con la zona promotora de L1Tc pero sin el gen reportador CAT llamado p⁻R. La estrategia seguida en la construcción de éstos vectores se puede ver en la figura 46. Estos plásmidos fueron transformados en la cepa de *E.coli* XLIB y se confirmaron las construcciones por mapeo de restricción y por secuencia de las zonas deletionadas o adicionadas.

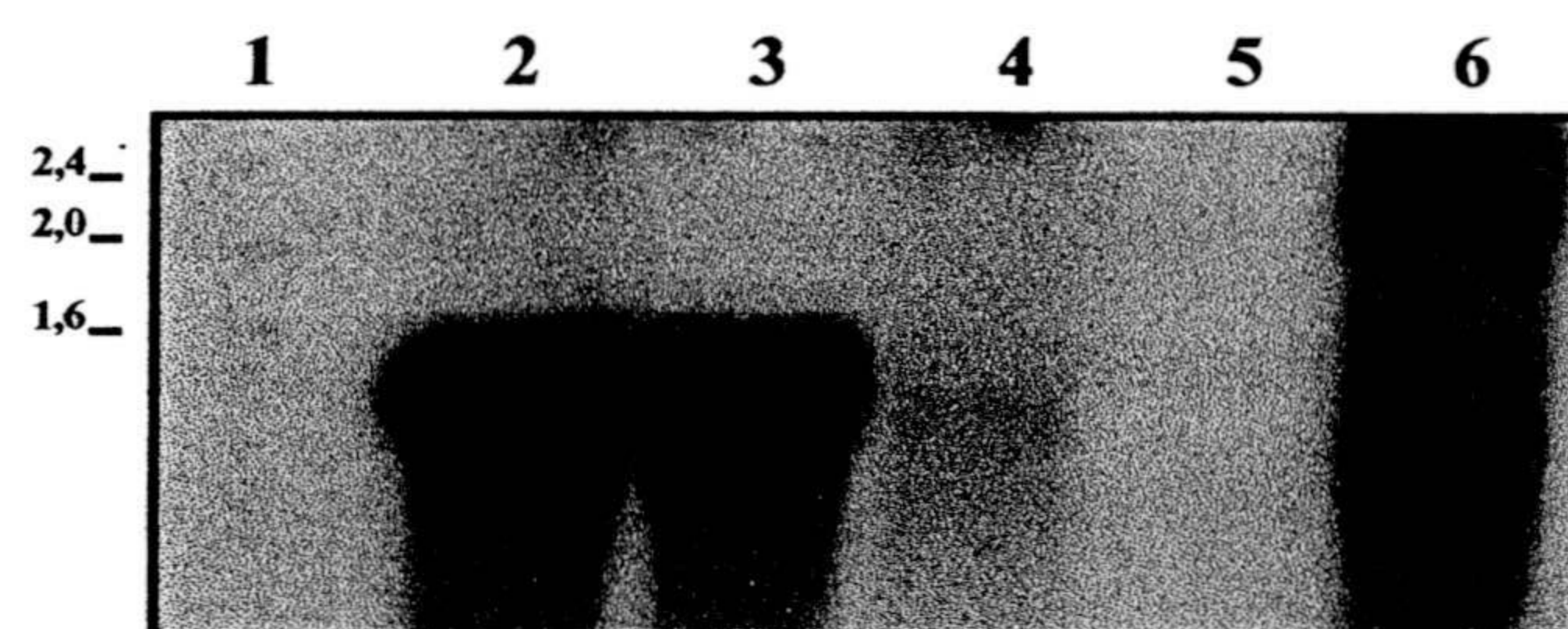


Fig. 42. Autoradiografía de Northern-blot de las diferentes construcciones de los plásmidos pTEX transformados en *Trypanosoma cruzi*. 1. pTEX. 2 y 3. pCAT con 1,6 y 3 mgr/ml de G-418. 4. p-CAT. 5. p-R. 6. p-RCAT.

Luego de la transformación en los parásitos y los subcultivos posteriores donde se fue aumentando la concentración de antibiótico, se confirmó la presencia de los plásmidos en los parásitos realizando dots de ADN hibridados con una sonda que mapeaba en el gen *neo*, otra de CAT y otra de RIME, marcadas con ^{32}P . Como se ve en la figura 41 todos los plásmidos hibridan correctamente dependiendo de la construcción con su sonda correspondiente y todos hibridan con *neo* indicando la presencia de los plásmidos en los parásitos. Luego de por lo menos 3 semanas de permanecer con la misma concentración de antibiótico se realizó un Northern el cual se hibridó con una sonda de CAT, observándose expresión de un transcrito del tamaño reportado de 1,2 kb solamente en pCAT y p-RCAT (Fig. 42).

5. DISCUSSION

5. DISCUSION

El elemento transponible L1Tc del tipo no-LTR descrito en *Trypanosoma cruzi* presenta alta homología en las zonas conservadas con las transcriptasas inversas (Martín y col., 1995), propias de los retroelementos y dado que han sido descritos múltiples elementos con dicha similitud sin presentar actividad, el objetivo principal de la presente tesis es demostrar la actividad transcriptasa inversa codificada por éste retroelemento y actividades asociadas que le permitirían dirigir su propia transposición.

5.1. Actividad Transcriptasa inversa en *T. cruzi*

Mediante el uso de homopolímeros sintéticos de ARN y moldes específicos de la RT, se ha detectado en lisados totales de *T. cruzi* una actividad polimerasa dependiente de ARN. Esta actividad fue más alta cuando se usó el molde poli(rA)/oligo(dT) igual a lo reportado para el elemento CRE1 de *Crithidia fasciculata* (Gabriel y Boeke, 1991). El producto de la polimerización mostró una extensión de aproximadamente 100 nucleótidos, siendo un híbrido ARN:ADN ya que fue degradado mediante el uso de ARNasa H y nucleasa S1. El hecho, de que tanto la afidicolina como el ddTTP no inhiban significativamente el nivel de incorporación de nucleótidos con los diferentes tipos de molde/cebador utilizados, mientras que la actinomicina D lo hace solamente con el poli(dC)/oligo(dG) sugiere que la incorporación de radiactividad, cuando se usa éste molde es probablemente debida a una actividad "RT-like". Esta actividad explicaría la presencia de híbridos ARN:ADN en las reacciones que contienen los moldes ARN/oligo(dN). Estos datos sugieren, que la actividad ARN dependiente detectada en los lisados totales de *T. cruzi* podría clasificarse como una actividad "RT-like". Los resultados de los experimentos con los inhibidores que han demostrado tener éste efecto en transcriptasas inversas de retrovirus tanto de mamíferos como de aves, refuerzan ésta hipótesis.

La actividad "RT-like" se asoció principalmente con la fracción nuclear presentando una actividad siete veces mayor que la detectada en citoplasma. Esta actividad específica en la fracción citoplasmática de *T. cruzi*, presenta unos niveles similares a los descritos por Deragon y col. (1990) en células carcinoembrionarias humanas NTera2D1. Esta actividad presentó requerimientos iónicos específicos, con una actividad óptima a 20 mM de Mg⁺⁺, concentración superior a la requerida por enzimas retrovirales como AMV ó Mo-MuLV. El hallazgo de ésta actividad "RT-like" en los lisados totales del parásito estaría de acuerdo con la presencia en el genoma del retrotransposón L1Tc, el cual codifica en su ORF2 para dicha actividad. En tripanosomátidos se ha postulado la presencia de una actividad transcriptasa inversa para explicar la existencia de criptogenes editados que substituyen a los criptogenes originales de los maxicírculos de ciertos organismos (Simpson y Maslov, 1994), sin embargo ésta actividad sólo se ha detectado en *C. fasciculata* asociada con el retrotransposón CRE1 (Gabriel y Boeke, 1991), por lo tanto, la presencia de ésta actividad en *T. cruzi* estaría de acuerdo con la edición de ARN en éste parásito (Simpson y Maslov, 1994; Maslov y col., 1994).

5.2. Actividad Transcriptasa inversa codificada por el L1Tc

En éste trabajo de tesis se ha clonado y expresado en *E. coli*, por primera vez una transcriptasa inversa codificada por el retrotransposón no-LTR, L1Tc de *T. cruzi*. La proteína de un tamaño aproximado de 66 kDa, se aisló, purificó y mediante el uso de homopolímeros sintéticos se demostró que es una proteína con actividad polimerasa y al igual que otras RTs es capaz de utilizar diferentes combinaciones de molde/cebador, incluyendo moldes de ADN. Esta actividad fue más alta cuando el homopolímero de ribonucleótido utilizado fue poli(rA)/oligo(dT) como ocurre con el elemento CRE1 de *Crithidia fasciculata* (Gabriel y Boeke, 1991) y en el caso de homopolímero de deoxinucleótido fue más alta con el poli(dC)/oligo(dG). No se observó ningún cambio en la actividad cuando la proteína utilizada correspondía a a zona aminoterminal de la proteína donde se encuentra el dominio polimerasa y en la cual se había

eliminado la zona carboxiterminal de la proteína, asociada a la actividad ARNasa H en las enzimas retrovirales (Hansen y col., 1987). Para descartar que la actividad detectada fuera debida a la presencia de ADN polimerasas contaminantes, de *E. coli*, se realizó una purificación y determinación de actividad en paralelo, a partir de una bacteria transformada con plásmido sin inserto no detectándose ningún tipo de actividad.

La actividad enzimática de la RTRN y RT de L1Tc fue dependiente de cationes divalentes con una mayor preferencia por el magnesio y una actividad óptima a 5 mM, siendo en éste caso similar a la de las enzimas retrovirales a diferencia de lo ocurrido en el ensayo con el lisado total de parásito, donde se requería una concentración mucho mayor, debido probablemente a la presencia de otras enzimas que lo requieren. El manganeso a concentraciones entre 0,4 a 0,8 mM reemplaza al magnesio con una ligera disminución de la actividad. La sal estimuló la actividad, con concentraciones óptimas entre 50 a 80 mM de KCl siendo similar a la reportada para la RT de Mo-MuLV pero más alta que la reportada para RTs de retroelementos como *jockey* de *Drosophila*, donde concentraciones de 50 mM disminuyeron la actividad a la mitad y a 100 mM ésta no pudo detectarse (Ivanov y col., 1991) aunque en nuestro caso la actividad cayó a la mitad con ésta última concentración. La preferencia por los homopolímeros poli (rA)/oligo(dT) y poli (dC)/oligo(dG), no varió en ninguna de las condiciones ensayadas anteriormente.

La enzima fue activa entre 20 y 37°C siendo la temperatura óptima a 37°C, éste resultado es similar al mostrado en el ensayo de lisado total de *T. cruzi* aunque los cultivos del parásito tienen una temperatura óptima de crecimiento de 28°C, algunas enzimas retrovirales como Mo-MuLV también funcionan mejor a 37°C, aunque otras funcionan mejor a temperaturas mayores como AMV que lo hace a 42°C, en el caso de la RT del virus Rous sarcoma (RSV) el aumento de la temperatura a 40,5°C estimula su actividad en un 8,3% (Verma y col., 1974); para la RT del elemento *jockey* la temperatura óptima es de 26°C pero con una caída del 60% a 22° y del 20% a 30°C, para el elemento Ty de

levaduras su temperatura óptima es 20°C (Garfinkel y col., 1985) en el caso de L1Tc, la temperatura afectó más la polimerización dependiente de ADN que de ARN, en cuanto al pH la RT de L1Tc permaneció activa en un rango amplio de pH desde 7 a 9 con un óptimo de 8, resultado similar al observado en las enzimas retrovirales y de otros retroelementos como L1 de humanos (Mathias y col., 1991) y *jockey* de *Drosophila* (Ivanov y col., 1991).

El AZT inhibió la actividad polimerasa de la RT de L1Tc a concentraciones más altas que las descritas para la RT de HIV, en cuanto a los otros inhibidores como la novobiocina que inhibe la RT del elemento *jockey*, la RT de L1Tc presentó un comportamiento similar, al igual que con la rifamicina SV que además inhibe RTs de retrovirus de aves.

La actividad transcriptasa inversa del L1Tc también se demostró mediante el ensayo de RT-PCR utilizando un molde de ARN del retrovirus BMV y como competidor altas concentraciones de ADN "activado", el cual es el molde de preferencia de las ADN polimerasas dependientes de ADN. En éste caso sólo se observó amplificación con las transcriptasas inversas tanto de L1Tc, como de HIV y de Mo-MuLV.

El efecto de la sustitución del ácido aspártico de la posición 313 por una isoleucina llevó a una disminución de actividad de un 90% con todos los homopolímeros ensayados, éste residuo pertenece al motivo invariante Y/FXDD y ha sido reportado que la sustitución de cualquiera de los dos aspárticos lleva a la eliminación de la actividad RT tanto en HIV (Larder y col., 1987), como en el retroelemento CRE1 de *C. fasciculata* (Gabriel y Boeke, 1991). El segundo residuo de éste motivo en el caso de las RTs retrovirales es una metionina, en HIV su sustitución por una alanina lleva a una disminución de la actividad de cerca de 100 veces (Menéndez-Arias y col., 1997), para los retrotransposones no-LTR éste residuo corresponde a una alanina y la actividad de éstos últimos comparada con las enzimas retrovirales es de cerca de 100 veces menor, por lo tanto, para determinar el posible papel de éste

aminoácido en la diferencia de actividad se construyó un mutante donde se substituyó la alanina 311 por la metionina, observándose un pequeño aumento en la actividad que no parece significativo.

Todos éstos datos demuestran que el ORF2 del elemento L1Tc codifica para una actividad transcriptasa inversa, corroborando funcionalmente lo que se había definido previamente por homología de secuencia entre el L1Tc y los retroelementos. Por lo tanto, éstos datos nos permiten concluir que el L1Tc es un elemento activo ya que posee una de las principales actividades necesarias para el proceso de transposición. Es importante resaltar que dado que la RT tiene actividad polimerasa dependiente tanto de ADN como de ARN, el elemento tiene la capacidad no sólo de copiar el ARN sino de llevar a cabo la síntesis de la segunda cadena de ADN, necesaria para la posterior integración.

Esta actividad Transcriptasa inversa no sólo, sería importante para el propio elemento sino para el parásito ya que en tripanosomátidos se ha postulado la presencia de una actividad transcriptasa inversa para explicar la existencia de criptogenes editados que substituyen a los criptogenes originales de los maxicírculos de ciertos organismos (Simpson y Maslov, 1994), sin embargo ésta actividad sólo ha sido detectada en *C. fasciculata* asociada, también a un retrotransposón, el CRE1 (Gabriel y Boeke, 1991), por lo tanto, la presencia de ésta actividad en *T. cruzi* estaría de acuerdo con la edición de ARN en éste parásito (Simpson y Maslov, 1994; Maslov y col., 1994).

5.3. Actividad ARNasa H asociada a la RT de L1Tc

Se sabe que la RT es una enzima trifuncional con una actividad ADN polimerasa dependiente de ARN, una actividad polimerasa dependiente de ADN y una actividad ARNasa H. Estas actividades cooperan para convertir el ARN de sencilla cadena en un ADN de cadena doble (Weiss y col., 1982, 1985; Varmus, 1988), en el caso de los retrotransposones éste ADN se integraría y

en el caso de los retrovirus es esencial para producir viriones infectivos (Tisdale y col., 1991).

Para los retrotransposones LTR se han descrito los motivos ARNasa H similares a los de las enzimas retrovirales (Doolittle, 1989). En el caso de los elementos LINE ó no-LTR éstos dominios no son tan obvios, encontrándose solamente una pequeña homología en algunos de ellos (Fawcett y col., 1986; McClure, 1991). Basados en los estudios cristalográficos de las ARNasas H de *E.coli* (Katayanagi y col., 1990) y de HIV (Kanaya y col., 1990) se definieron cuatro aminoácidos ácidos (un glutámico y tres aspárticos) involucrados en la unión al Mg^{2+} el cual es esencial para la actividad, éstos residuos están totalmente conservados en las enzimas retrovirales y retroelementos similares, el papel de éstos residuos fue confirmado por Schatz y col., quienes mediante ensayos de mutagénesis del ácido glutámico reprimieron específicamente la actividad ARNasa H (Schatz y col., 1989) de HIV, además ensayos similares indican que los tres residuos conservados ionizables Asp-10, Glu-48 y Asp-70 de *E. coli* (homólogos a Asp-443, Glu-478 y Asp-498 de HIV respectivamente), están todos implicados en el sitio activo de la enzima, ya que sustituciones por las amidas análogas no ionizables Asn y Gln respectivamente, dieron como resultado una pérdida total de la actividad (Kanaya y col., 1990; Mizrahi y col., 1990).

En éste trabajo de tesis se muestra la conservación de éstos cuatro aminoácidos en la zona carboxiterminal de la RTRN de L1Tc y en los 13 retrotransposones no-LTR examinados al compararlos con las ARNasas de *E. coli* y con varias enzimas retrovirales, demostrando además por primera vez actividad ARNasa H de un retrotransposón no-LTR mediante un ensayo de degradación del ARN presente en el híbrido ARN:ADN. Como control de una posible contaminación de la enzima propia de la *E. coli* se usó tanto la L1TcRT, como una proteína irrelevante purificadas en condiciones similares, sin observarse ningún tipo de actividad. Esta actividad bioquímica se confirmó con ensayos funcionales in vivo, mediante la complementación de una mutación

ARNasa HI en la cepa MIC3001 de *E. coli*, la cual presenta un fenotipo sensible a temperatura y dependiente de ARNasa H (Itaya y Crouch, 1991).

La dependencia de iones metálicos divalentes de la ARNasa H de L1Tc se determinó ensayando diferentes concentraciones de cada uno de ellos, observándose un comportamiento diferente cuando la proteína completa (L1Tc RTRN) fué analizada o cuando lo fué el dominio ARNasa H (L1TcRN). En el caso del Mg^{2+} se observó un ligero aumento de la actividad paralelo al aumento de la concentración de Mg, con la proteína completa L1TcRTRN, similar a la enzima de *E. coli* y diferente de la ARNasa sola, L1TcRN; por el contrario, cuando el Mn^{2+} fué utilizado, tanto la RTRN como la RN de L1Tc mostraron un aumento de la actividad, siendo mayor para la RN a más bajas concentraciones del ión, mientras la enzima de *E. coli* mostró una disminución de su actividad en paralelo con el aumento de la concentración del Mn, ésta inhibición también ha sido reportada para la ARNasa H de *Crithidia fasciculata* (). La inhibición de actividad por altas concentraciones de cationes divalentes se ha visto para otras ARNasas, de la misma forma cuando hay un aumento de NaCl (Black y Cowan, 1994; Keek y Marqusee, 1995). La preferencia por Mn con respecto al Mg también ha sido reportada para el dominio ARNasa H de MuLV (Zhan y Crouch., 1997), para la RTRN y la RN del espuma virus humano (Kögel y col., 1995) y para HIV. Esta dependencia es interesante pues la enzima de *E. coli* muestra más actividad con Mg en la mayoría de los condiciones, la enzima con una delección de la zona de las histidinas es activada y luego inhibida por el $MnCl_2$, ésto podría explicarse por un efecto electrostático no específico del $MnCl_2$ ya que éste resultado se puede reproducir utilizando NaCl o KF. Esto puede ser así porque la ARNasa H no es una ribonucleasa específica y la mayoría de su reconocimiento de sustrato parece deberse a interacciones electrostáticas dadas por el "loop" formado por la hélice básica. Esta preferencia estuvo relacionada con el pH ya que la actividad óptima en presencia de Mg para el dominio ARNasa H de L1Tc estuvo entre pH 7 y 7,5 mientras para la proteína total estuvo entre 8 y 9 similar a la proteína total de HIV y a la ARNasa H de *E. coli*. En el caso del dominio ARNasa H de HIV en presencia de Mg a éste pH presentó actividad pero con

una concentración de enzima 10 veces mayor, mientras en presencia de Mn a pH 6 no requirió concentraciones mayores de enzima (Evans y col., 1994).

La actividad detectada con el dominio ARNasa H de L1Tc (L1TcRN) fue cuatro veces menor a la detectada con la proteína total (L1TcRTRN), esto puede ser debido, como en el caso de la enzima de HIV donde es ocho veces menor (Evans y col., 1991) a que las dos actividades estén acopladas como lo sugiere la distribución física de los dos sitios catalíticos. Es importante anotar que para la enzima de HIV se han publicado resultados contradictorios, ya que algunos grupos han descrito actividad del dominio ARNasa H, aunque menor que con la proteína completa (Hansen y col., 1988 y Evans y col., 1991) mientras otros grupos han sido incapaces de detectarla (Becerra y col., 1990; Stammers y col., 1991 y Davies y col., 1991) esto parece ser debido a la poca capacidad de la enzima de unirse al sustrato ya que se recupera la actividad cuando se adiciona la cola de las seis histidinas (Smith y Roth, 1993), o cuando se inserta la región α C de la ARNasa H de *E. coli* (Stahl y col., 1994 y Keck y Marqusee., 1995) ó cuando se reconstituye con el polipéptido RT de 51 kDa (Hostomsky y col., 1991). En el caso de la ARNasa H de MuLV ésta presenta una actividad similar a la enzima total sugiriendo que todos o la mayoría de los determinantes necesarios para la actividad están presentes en los 175 aminoácidos de la zona carboxilo terminal de la enzima (Zhan y Crouch, 1997), similar a lo reportado para la enzima del espuma virus, aunque en éste último caso tanto su actividad RT como ARNasa H son sustancialmente menores cuando se comparan con las de Mo-MuLV y HIV (Kögel y col., 1995) de forma similar a lo encontrado para la proteína del L1Tc.

Esta actividad ARNasa H presentada tanto por RTRN como por RN de L1Tc se corroboró mediante la mutación del ácido aspártico 694 por la amida correspondiente la asparagina, como se mencionó anteriormente éste cambio lleva a una eliminación de la actividad, en nuestro caso la actividad disminuyó en un 80%, presentando solamente una actividad RT, de forma similar, a como los mutantes de los residuos presentes en el sitio catalítico de la RT seguían conservando una actividad ARNasa H sugiriendo que los

residuos propios de cada sitio catalítico no son determinantes para la otra actividad y que la dependencia de la actividad ARNasa H de la RT parece estar más relacionada con la zona de conexión de los dos dominios como se ha demostrado para HIV (Homstosky y col., 1991). En éste caso sería interesante hacer un estudio más detallado para determinar cuales residuos de ésta zona de conexión son determinantes para la actividad ARNasa H, dándonos una idea de cómo sería el procesamiento de la proteína L1TcRTRN.

La demostración por primera vez de actividad ARNasa H en un retrotransposón no-LTR y de que los aminoácidos implicados en el sitio catalítico se conservan en la totalidad de los elementos analizados, es de gran importancia no sólo porque permite aclarar como éstos elementos eliminan el ARNm luego de la síntesis de la primera cadena de ADN, dejando un cebador para el inicio de la síntesis de la cadena complementaria y también explican el hecho de que se presente variabilidad en las secuencias de duplicación que flanquean las inserciones, ya que está descrito que la degradación no es un mecanismo preciso y puede generar duplicaciones de longitudes diferentes, sino que el hecho de estar conservados los aminoácidos permite suponer que es un mecanismo generalizado para todos los elementos de ésta clase y representa un paso adicional para aclarar el mecanismo de transposición.

Respecto a éstas dos actividades enzimáticas, sería interesante hacer una caracterización bioquímica detallada con miras a su posible utilización en biología molecular.

En cuanto a la nueva estructura de los dos primeros marcos de lectura, donde se ha eliminado el codón de terminación del primero y se ha fusionado en uno solo, teniendo ahora una estructura en éste ORF igual a la de los otros elementos de la misma clase, el análisis de la secuencia mostró la conservación de residuos presentes en el sitio catalítico de las cisteín-proteasas, por lo tanto, se están realizando estudios para determinar si hay una actividad de éste tipo la cual sería importante para el procesamiento del

polipéptido y conociendo el sitio de corte de ésta proteína y realizando un procesamiento natural de la misma, probablemente se podría mejorar la solubilidad de la proteína y por lo tanto facilitar su purificación y la realización de estudios estructurales.

5.4. Actividad promotora de la zona 5' de L1Tc

En éste trabajo de tesis se ha demostrado que el retrotransposón no-LTR L1Tc posee un promotor interno para su transcripción localizado en la zona 5' del elemento, donde presenta homología con el retrotransposón RIME*lingi*, caracterizado en *T. brucei* (Hasan y col., 1982), cuya inserción ha estado implicada en procesos de activación génica (Pays y col., 1989). Este resultado, además, estaría de acuerdo con la demostración de que los retrotransposones no-LTR poseen un promotor interno (Mizrokhi y col., 1988; Mclean y col., 1993 y Swergold, 1990) y con los hallazgos de nuestro laboratorio donde por ensayos de RT-PCR no se ha detectado la presencia de SL en los mensajeros del retrotransposón L1Tc (datos sin publicar), lo que implicaría un mecanismo de transcripción diferente al utilizado usualmente por *T. cruzi*, éste resultado es similar al descrito, precisamente para el elemento RIME*lingi* (Vasella y col., 1996) con el cual, como ya se mencionó, comparte homología L1Tc justamente en la zona 5'. En éste caso se realizó un análisis de las secuencias utilizadas en la construcción de vectores de transformación para *T. cruzi* y se buscaron secuencias consenso entre ellos, RIME y L1Tc, también se compararon éstas secuencias con promotores procarióticos, encontrándose algunas conservadas, actualmente se están realizando ensayos tendientes a determinar si éstas zonas son esenciales para la actividad promotora.

Con la demostración de las actividades Transcriptasa inversa, ARNasa H y la capacidad promotora de L1Tc podemos concluir no sólo que el retrotransposón es un elemento activo sino que es autónomo para dirigir su propia transposición.

5.5. Implicaciones biológicas de la actividad del retrotransposón no-LTR L1Tc

Como se mencionó en introducción, los elementos móviles pueden además de proporcionarle al hospedador flexibilidad y ser fuente de variabilidad haber evolucionado hacia funciones especializadas como participar en regulación génica. En éste aspecto el L1Tc podría actuar como promotor, iniciando la transcripción de determinados policistrones ó actuar como activador génico (enhancers) de promotores cercanos, algo especialmente importante en *T. cruzi* donde no se han sido descrito secuencias promotoras. Dentro de las funciones reguladoras también está actuando en la señal de poliadenilación de los genes de las histonas, de la misma forma que se ha descrito para otros genes (Harendza y Johnson, 1990).

Otra función en la cual podría actuar el L1Tc tiene que ver con la actividad reparadora, que se halla codificada en la zona 5' del ORF1 y cuya actividad también ha sido demostrada (Olivares y col., 1997), encontrándose además que en algunos casos ésta zona del elemento está asociada a genes *pgp* implicados en los mecanismos de resistencia a fármacos y donde eventualmente podría representar uno de los múltiples mecanismos implicados en la resistencia, reparando los daños ocasionados por ellos al ADN. Dado que L1Tc puede en principio transponerse a cualquier región del genoma podría actuar bloqueando la expresión de genes o como ya se mencionó activándolos o regulando su transcripción. De igual forma por ésta misma capacidad podría ser responsable de la creación de nuevos genes, mediante la transposición de los mismos y su posterior integración en otro sitio del genoma.

Con éstos resultados como base y teniendo en mente las múltiples implicaciones biológicas tanto benéficas como deletéreas de los elementos móviles y dada también la singularidad molecular de *T. cruzi*, sería importante ahondar en el estudio del L1Tc especialmente en lo referente a la demostración de transposición, la frecuencia de ésta y principalmente en determinar el

mecanismo mediante el cual lo hace, ya que conociéndolo podría utilizarse como un vector para inactivar genes vitales del parásito y de ésta forma controlar la viabilidad del parásito y por lo tanto controlar la infección por *T. cruzi* que en último término implicaría un control de la enfermedad de Chagas.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. *Trypanosoma cruzi* presenta una actividad "RT-like" dependiente de Mg^{2+} localizada principalmente a nivel del núcleo.
2. El retrotransposón no-LTR L1Tc presenta una actividad Transcriptasa inversa dependiente de Mg^{2+} , con preferencia por el homopolímero poli(rA)/oligo(dT) y una actividad ADN polimerasa dependiente de ADN con preferencia por el homopolímero poli(dC)/oligo(dT).
3. Los ácidos aspárticos que forman parte del sitio catalítico son imprescindibles para la actividad polimerasa dependiente tanto de ARN como de ADN, del L1Tc.
4. La actividad Transcriptasa inversa de L1Tc es inhibida por AZT, novobiocina y rifamicina.
5. El elemento L1Tc conserva los aminoácidos correspondientes al sitio catalítico de las enzimas ARNasa H descritas tanto para *E. coli* como para retrovirus hallándose además, conservados en todos los retroelementos analizados.
6. El elemento L1Tc presenta actividad ARNasa H dependiente de Mn^{2+} y de pH, siendo cuatro veces mayor con la proteína total.
7. La zona 5' del retrotransposón L1Tc que presenta homología con un retroelemento RIMEI *ingi* descrito en *T. brucei*, posee actividad promotora.
8. El L1Tc presenta dos marcos de lectura, el primero corresponde al ORF *pol* y el segundo a *gag*, similar a la estructura de los otros retrotransposones aunque en posiciones diferentes.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, P., Vaury, C., Péliissoon, A., Chaboissier, M.C., Busseau, I., and Bucheton, A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8887-8891.
- Adams, J.W., Kaufman, R.E., Kretschmer, P.J., Harrison, M., Nienhuis, A.W. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 6113-6128
- Affolter, M., Rindisbacher, L., Braun, R. (1989) Gene 80, 177-183
- Aksoy, S., Williams, S., Chang, S., Richards, F.F. (1990) Nucleic Acids Research 18(4), 785-792
- Aline, R.F.J., Scholler, J.K., Stuart, K. (1989) Mol. Bioch. Parasitol. 32, 169-178
- Amariglio, N., Rechavi, G. (1993). Env. Mol. Mutagen. 21, 212-218
- Andrews, N.W. and Colli, W. (1982) J. Protozool. 29, 264- 269.
- Andrews, N.W., Hong, K., Robbins, E.S. and Nussenzweig, V. (1987) Exp. Parasitol. 64, 474-484.
- Ashworth, A., Skene, B. Swift, S., Lovell-Badge, R. (1990), The EMBO J. 9, 1529-1540
- Avic, H. and Leder, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 1408-1411.
- Baldwin, A.S.JR., Leclair, K.P., Singh, H., Sharp, P.A. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 1406-1414
- Benne, R., Van Der Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H., et. al. (1986) Cell 46 819-826
- Berg, J.M. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 99-102
- Berg, J.M. (1986) Science 232, 485-486
- Bhat, G.J., Souza, A.E., Feaguin, J.E., Stuart, K. (1992) Mol. Biochem. Paras. 52, 231-240
- Bihui H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S.K., Dalla-Favera, R. (1993) Science 262, 747-750

-
- Boeke, J.D.; Corces, V.G. (1989) *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 403-434.
 - Boer, P.H., Adra, C.N., Lau, Y.F., Mcburney, M.W. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 3107-3113
 - Borst, P., Van der Ploeg, L.H.T., Van Hock, J.F.M., Tas, J., James, J. (1982) *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 13-23
 - Bontempi, E.J., Búa, J., Aslund, L., Porcel, B., Segura, E.L., Henriksson, J., Orn, A., Petterson, U., Ruiz, A.M. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 253-262
 - Britten, R.J., Kohne, D.E. (1968) *Science*, 161, 529-540
 - Brosius, J. 1991
 - Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987) *Biotechniques* 5, 376-379.
 - Buschiazio, A., Campetella, O.E., Macina, R.A., Salceda, S., Frasch, A.C., Sanchez, D.O. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 125-128
 - Burke, W.D., Calalang, C.C., Eickbush, T.H. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 8, 114-123.
 - Burton, F.H., Loeb, D.D., Voliva, C.F., Martin, S.L., Edgell, M.H., Hutchison III C.A. (1986) *J. Mol. Biol.* 187, 291-304
 - Carey, M.F., Singh, K., Botchan, M., Cozzarelli, N.R. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 3068-3076
 - Castro, C., Craig, S.P., Castañeda, M. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 4, 273-282
 - Claichentaus, N., Cuzin, F. (1987) *Cell* 50, 1081-1090
 - Clayton, C. (1992) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 43, 37-43
 - Cooper R., Inverso J.A., Espinosa M., Nogueira N., Cross G.A.M. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 45-60.
 - Covey, S.N., (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 623-633
 - Cully, D.F., Cross, G.A.M. (1985) *Cell*, 42, 173-182
 - Cheng, S.M., Schildkraut, C.L. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8, 4075-4090

-
- Dahl, H.H.M., Brown, R.M., Hutchinson, W.M., Maragos, C., Brown, G.K. (1990) *Genomic* 8, 225-230
 - Davidson, E.H., Britten, R.J. (1979) *Science* 204, 1052-1059
 - De Luca D'oro, G.M., Gardenal, C.N., Perret, B., Crisci, J.V., Montamat, E.E. (1993) *Parasitology* 103, 405-410.
 - Depamphidis, 1993)
 - Demple, B., Herman, T., and Chen, D.S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11450-11454.
 - Deragon, J.M., Sinnet, D., Labuda, D. (1990) *The EMBO J.* 9(10), 3363-3368
 - Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
 - Dongmei, D.L., Korman, M.H., Jakubczak, J.L., Eickbush, T.H. (1993) *Cell* 72, 595-605
 - Doolittle, R., (1981) *Science* 214, 149-159.
 - Doolittle, W.F., Sapienza, C. (1980) *Nature* 284, 601-603
 - Dover, G. (1989) *Nature* 299, 111-117
 - Duncan, C.H., Jagadeeswaran, P., Wang, R.C., Weissman, S.M. (1981) *Gene* 13, 185-196
 - Economou-Pachnis, A., Tsiichlis, P.N. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 8379-8387
 - Eickbush, T.H (1992) *The new biologist*, 4(5) 430-440
 - Evans, J.P., Palmiter, R.D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8792-8795
 - Fan, C.M., and Maniatis T. (1990) *Genes dev.* 4, 29-42
 - Flinn, H.M., Smith, D.F. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 755-762
 - Fourel, G. *Nature*, 347, 294- (1990)
 - Fuetterer, J., and Hohn, T., (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 92-95
 - Gabriel, A., Boeke, J.D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9794-9798

-
- Gabriel, A., Yen, T.J., Schwartz, D.C., Smith, C.L., Boeke, J.D., Sollner-Webb, B., Cleveland, D.W. (1990) *Mol.Cell.Biol* 10(2), 615-624
 - Gibson, W.C. and Miles, M.A. (1986) *EMBO J.* 5, 1299-1305.
 - González, A., Prediger, E. Huecas, M.E., Nogueira, N., Lizardi, P.M. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81,3356-3360
 - Gottesdiener, K.M., Goriparthi, L., Masucci, J.D. Van Der Ploeg, L.H.T. (1992) *Mol.Cell.Biol.* 12(10), 4784-4795
 - Gottesdiener, K., Chung, H. Brown, S.D., Lee, M.G.S., Van Der Ploeg, L.H.T. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11(5), 2467-2480
 - Gutierrez-Hartmann, A., Lieberburg, I., Gardner, D., Baxter, J.D., Cathala, G.G. (1984) *Nuceic Acids Res.* 12, 7153-7173
 - Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 189, 113-124
 - Harendza, C.J., Johnson, F.L. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2531-2535.
 - Hasan, G., Turner, M.J., Cordingley, J.S. (1984) *Cell* 37, 333-341
 - Hasan, G., Turner, M.J., Cordingley, J.S. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 6747-6761
 - Hattori, M., Kuhara, S., Takenaka, O., Sakaki, Y. (1986) *Nature* 321, 625-628
 - Haynes, S.R., Jelinek, W.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6130-6134
 - Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., Roditi, I. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 370-374
 - Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R.A., Franke de Cazulo, B.M., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C.C., Pettersson, U. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 213-224.
 - Herget, T., Reich, M., Stüber, K., Starzinski-Powitz, A. (1986) *EMBO J.* 5, 659-664
 - Hobbs, M.R. and Boothroyd, J.C. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 1-16
 - Hsu, T., Cogos, J.A., Kirsh, S.A., Kafatos, F.C. (1992) *Science* 257, 1946-1950
 - Hutchinson, C.A., Hardies, S.C., Loeb, D.D., Shehee, W.R., Edgell, W.H. (1989) in *Mobile DNA*, eds. Berg, D.E. & Howe, M.M. (Am. Soc. Microbiol, Washington, DC), pp 593-617

-
- Imbodem, M., Blum, B., DeLange, T., Braun, R., Seebeck, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 188, 393-402
 - Ivanov, V.A., Melnikov, A.A., Siunov, A.v., Fodor, I.I., Ilyin, Y.V. (1991) *The EMBO J.* 10(9), 2489-2495
 - Jefferies, D., Tebabi, P., Pays, E. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11(1), 338-343
 - Jelinek, W.R. Schmid, C.W. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 813-844.
 - Jelinek, W.R., Toomey, T.P., Leinwand, L., Duncan, C.H., Biro, P.A., Choudary, P.V., Eissman, S.M., Rubin, C.M., Houck, C.M., Deininger, P.L., Schmid, C.W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1398-1402
 - Jensen, S., Herdmann, T. (1991) *The EMBO J.* 10(7), 1927-1937
 - Kaptein, R. (1991) *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2, 109-115
 - Katzir, N., Rechavi, G., Cohen, J.B., Unger, T., Simoni, F., Segal, S., COhen, D., Givol, D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1054-1058
 - Kelly, J.M., Ward, H., Miles, M.A., Kendall, G. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 3963-3969
 - Kimmel, B.E., Onesmo K. Ole.Moiyoi., Young, J.R. (1987) *Mol.Cell.Biol.* 7(4), 1465-1475
 - Kinsey, J.A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9384-9387
 - Kooter, J.M., Van Der Spek, H.J., Wagtrer, R., d'Oliveira, C.E. Van Der Hoeven, F., Johnson, P.J., Borst, P. (1987) *Cell* 51, 261-272
 - Kriwacki, R.W., Schultz, S.C., Steitz, T.A., Caradonna, J.P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9759-9763
 - Lake, J.A., de la Cruz, P.C.G., Morel, C. and Simpson, L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 4779-4783.
 - Lanar, D.E., Levy, L.S. and Manning, J.E. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 327-341.
 - Larder, B.A., Purifoy, D.J.M., Powell, K.L., Dambi, G. (1987) *Nature* 327, 716-717
 - Lebowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M. (1993) *ibid* 7, 996-1000.

-
- Levin, M.J., Vazquez, M., Kaplan, D., Schijman, A.G. (1993) *Parasitol. Today* 9, 381-384
 - Lindahl, T. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 61-87
 - Lodes, M.J., Smiley, B.J., Stadnyk, A.W., Bennet, J.L., Myler, P.J., Stuart, K. (1993). *Mol. Cell. Biol.* 13(11), 7036-7044.
 - Luan, D.D, Korman, M.H., Jakubczak, J.L., and Eickbush, T. (1993) *Cell* 72, 595-605.
 - Majello, B., La Mantia, G., Simeone, A., Boncinelli, E., Lania, L. (1985) *Nature* 314, 457-459
 - Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 - Manley, J.M., Colzco, M.T. (1982) *Nature* 300, 376-379
 - Martin, S.L. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11(9), 4804-4807
 - Mathias, S.L., Scott, A.F., Kazazian, H.H., Boeke, J.D., Gabriel, A. (1991) *Science* 254, 1808-1810
 - Matthews, K.R., Tschudi, E.U, (1994) *Genes Dev.* 8, 491-
 - McLean, C., Bucheton A., Finnegan D.J. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13(2), 1042-1050
 - Miller, J., McLachlan, A.D., And Klug, A. (1985) *EMBO J.* 4, 1609-1614
 - Mizrokhi, L.J., Georgieva, S.G., Ilyin, Y.V. (1988) *Cell* 54, 685-691
 - Morishita, K., Parker, D.S., Mucenski, M.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ihle, J.N. (1988) *Cell* 54, 831-840
 - Morrison, D.A. (1979) *Meth. Enzymol.* 68, 326-331.
 - Morse, B., Rotherg, P.G., South, V.J., Spandorfer, J.M., Astrin, S.M. (1988). *Nature* 333, 87-90
 - Murphy, N.B., Pays, A., Tebabi, P., Coquelet, H., Guyaux, M., Steinert, M., Pays, E. (1987) *J. Mol. Biol.* 195, 855-871
 - Murphy, D., Brickell, P.M., Latchman, D.S., Willison, K., Rigby, P.W.J. (1983) *Cell* 35, 865-871

-
- Nilsen, T.W. (1994) *Science* 264, 1868-1869.
 - Nogueira, N. (1987) *Modern Biotechnology and Health: Perspectives for the year 2000*, ed. M.E. Patarroyo. p.p. 125-134.
 - Orgel, L.E., Crick, F.H.C. (1980) *Nature* 284, 604-607
 - Pays, E. and Steinert, M. (1988) *Annu. Rev. Genet.* 22, 107-126.
 - Pays, E., Murphy, N.B. (1987) *J. Mol. Biol.* 197, 147-148
 - Pays, E., Tebabi, P., Pays, A., Coquelet, H., Revelard, P., Salmon, D. and Steiner, M. (1989) *Cell* 57, 835-845.
 - Pays, E., Coquelet, H., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Steinert, M., Koenig, E., Williams, R.O. and Roditi, I. (1990) *EMBO J.* 9, 3145-3151.
 - Pays, E., Tebabi, P., Pays, A., Coquelet, H., Revelard, P., Salmon, D., Steinert, M. (1989) *Cell* 57, 835-845
 - Pelisson, A., Finnegan, D.J., Bucheton A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4907-4910
 - Pereira, M.E.A., Mejia, J.S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D. Prioli, R.P. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 179-191
 - Pieler, T., Theunissen, O. (1993) *Trends Biochem. Sci.* 18, 226-230
 - Puerta C., Martin J., Alonso C., Lopez M.C. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 1-10.
 - Puyet, A., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 2278-2286.
 - Requena, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Soto, M., Lopez, M.C., Alonso, C. (1992). *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 271-280
 - Requena, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Soto, M., Lopez, M.C., Alonso, C. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 271-280
 - Rhodes, D., and Klug, A., (1993) *Scientific American* February, 56-65
 - Rogers, J.H., (1985) *Int. Rev. Cytol* 93, 187-279
 - Ruiz, I., Altaba, R., Perry-O'Keefe, H., Melton, D.A. (1987) *EMBO J.* 6, 3065-3070

-
- Sanders, M., Lowenhaupt, K., and Rich, A. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6780-6784.
 - Saporito, S., Smith-white, B.J., and Cunningham, R.P. (1988) J.Bacteriol. 170, 4542-4547.
 - Sather, S., Agabian, N. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5695-5699
 - Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984) Cell, 37, 67-75.
 - Schwarz-Sommer, Z., Leclercq, E.G., and Saedler, H. (1987) EMBO J. 6 (13), 3873-3880
 - Shea, C., Van Der Ploeg, L.T.H. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 854-859
 - Sherman, D.R., Janz, L., Hug, M., Clayton, C. (1991) The EMBO J 10(11), 3379-3386
 - Simpson, L., Maslov, D.A, (1994) Science 264 1870-1871
 - Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V.F., Simpson, A.M., Feagin, J.E., Jasmer, D.P. and Stuart, K. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6182-6196.
 - Singer, M.S. (1982) Cell 28, 433-434
 - Singer, M.F., Thayer, R.E., Grimaldi, G., Lerman, M.I., Fanning, T.G. (1983) Nucleic Acids Res 3. 11,5739-5745
 - Sloff, P., Bos, J.L., Konings, A.F.G.M., Menke, H.H., Borst, P., Gutteridge, W.E., Leon, W. (1983) J.Mol.Biol. 167, 1-21
 - Sogin, M., Gunderson, J., Elwood, H., Alonso, R., Peatti, D. (1989) Science 243, 75-77
 - Solari, A.J. (1980) Chromosoma 78, 239-255.
 - Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517.
 - Spence, S.E., Young, R.M., Garner, K.J., Lingrel, J.B. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 2171-2186
 - Stuart, K. (1991) Annu. Rev. Microbiol. 45, 327-344.
 - Sutcliffe, J.G., Milner, R.J., Gottesfeld, J.M., Reynolds, W. (1984) Science 225, 1308-1315

-
- Sutcliffe, J.G., Milner, R.J., Boom, F.E., Reynolds, W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4942-4946
 - Swergold, G.D. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 6718-6729
 - Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 5201-5205.
 - Toh, H., Hayashida, H., Miyota, T. (1983) Nature 305, 827-829
 - Tschudi, C., Ullu, E. (1988), EMBO J., 7, 455-463
 - Ullu, E., Matthews, K.R., Tschudi, C. (1993) Mol.Cell.Biol. 13(1), 720-725
 - Ürményi, T.P., De Castro, F.T., Carvalho, F.J.O., De Souza, W., Rondinelli, E. (1992) DNA and Cell Biology 11 (2), 101-109.
 - Vázquez, M.P., Schijman, A.G., Levin, M.J. (1994) Mol.Biochem.Parasitol. 64, 327-336
 - Vidal, F., Mougneau, E., Glaichenhaus, N., Vaigot, P., Darmon, M., Cuzin, F. (1993). Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90, 208-212
 - Vigayasarathy, S., Ernest, I., Itzhaki, J.E., Sherman, D., Mowatt, M.R., Michels, P.A.M., Clayton, C. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 2967-2975
 - Villanueva, M., Williams, S.P., Beard, C.B., Richards, F.F., Aksoy, S. (1991) Mol.Cell.Biol. 11(12), 6139-6148
 - Voliva, C.F., John C.L., Comer M.E., Hutchinson III, C.A., Edgell, M.H. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 8847-8859.
 - Walacce, M.R., Andersen, L.B., Saulino,A.M., Gregory, P.E., Glover, T.W., Collins, F.S. (1991) Nature 353, 864-868
 - Weiner, A.M., Deininger, P.L., Efstratiadis, A. (1986) Annu. Rev. Biochem. 55, 631-661
 - Xiong, Y., Eickbush, T.H., (1988) Mol.Cell.Biol. 8(1),114-123
 - Xiong, Y., Eickbush, T.H. (1988) Cell 55, 235-246
 - Xiong, Y., Eickbush, T.H. (1990) The EMBO J 9(10), 3353-3362