



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

Caracterización de una quinasa de proteínas SR de
Trypanosoma cruzi TcSRPK

Nº 6

Carolina Dimnik

Tutor: Héctor Torres
Director: Daniel Portal

Departamento de Investigación
Noviembre 2001

Agradecimientos

Al Doctor Torres por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio

Al Lic. Daniel Portal por su paciencia y dedicación

Al Lic. Guillermo Lobo por su colaboración y ayuda

Al Doctor Claudio Pereira y a la Lic. Catalina Guida por prestarme sus tesis

A la Lic. Soledad Ivaldi por su apoyo

Indice

Introducción	7
Antecedentes	10
Materiales y métodos	14
Resultados	16
Discusión	24
Referencias	25

Introducción

El mal de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis cuyo vector es el insecto hematófago *Triatoma infestans*, vulgarmente conocido con el nombre de Vinchuca y cuyo agente etiológico es el protozoario *Trypanosoma cruzi*.

Esta enfermedad es considerada por la Organización Mundial de la Salud (WHO/OMS) como la tercera epidemia en importancia de todo el continente sudamericano, luego de la malaria y la eschistosomiasis.

Dinámica de infección y evolución de la enfermedad

La picadura del insecto vector en las horas de sueño nocturno, constituye la principal vía de infección de *Trypanosoma cruzi* (Brener, 1973).

Inmediatamente después de succionar la sangre, el vector libera los parásitos (tripomastigotes metacíclicos) con las heces contaminadas. El prurito causado por la picadura lleva al individuo a facilitar el contacto de los parásitos con la herida, favoreciendo la infección. Las mucosas bucal y conjuntiva son otras vías frecuentes de infección por *T. cruzi* (Romaña, 1963).

En cuanto a la evolución clínica de la enfermedad de Chagas se pueden distinguir claramente dos fases:

La **fase aguda** es en general asintomática; se estima que más del 90% de los individuos infectados pasa a la fase crónica sin advertirlo (Rosenbaum, 1964). El conjunto de signos clínicos que caracterizan la fase aguda comprende: fiebre, parasitemia detectable, linfadenopatía, entre otros. En un bajo número de casos (1-5%) se observa la aparición de una miocarditis generalmente reversible por parasitación de células del miocardio con amastigotes (Laranja, 1956). En el sistema nervioso las lesiones histopatológicas son las de la meningoencefalitis aguda.

Durante la **fase crónica** la mayor parte de la población infectada no presenta evidencias discernibles de la enfermedad. Sólo un porcentaje de hasta el 30%, con grandes diferencias regionales, desarrolla al cabo de varios años, síntomas y/o signos de daño visceral. Esto es lo que se denomina enfermedad de Chagas crónica, cuya manifestación clínica más frecuente en la Argentina es una cardiopatía. En la cardiopatía chagásica crónica, desde los estadios iniciales hasta los cuadros terminales se detectan focos inflamatorios activos, los cuales podrían desempeñar un rol preponderante en la destrucción lenta y progresiva del miocardio (Chiale y Rosenbaum, 1989).

El *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma. Del griego *trypain* (perforar) o *trepanos* (taladro) + *soma* (cuerpo). Este género fue propuesto por Gruby en 1843 para designar a los 'flagelados hemáticos de cuerpo aguzado y con movimientos ondulantes y espiralados'.

T. cruzi es la especie así designada por Carlos Chagas en honor al médico brasileño Oswaldo Cruz (1871-1917) en 1909 (Lombardero, 1978).

Clasificación taxonómica

La ubicación sistemática del *Trypanosoma cruzi* es la siguiente (Hoare, 1972; Levine, 1980):

Reino: Protista

Phylum: *Sarcocystophora*: Su locomoción se realiza por medio de flagelos y/o pseudopodios. Poseen un único tipo de núcleo.

Sub-phylum: *Mastigophora*: Presentan un pequeño número de flagelos, se reproducen por fisión binaria y en algunos grupos por reproducción sexual.

Clase: *Zoomastigophorea*: Sin cloroplastos, con uno o varios flagelos, reproducción sexual conocida en pocos grupos, grupo prolífico.

Orden: *Kinetoplastida*: Tienen de uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión, una única mitocondria que se extiende por toda la célula semejando un tubo o una red de tubos y generalmente poseen una organela autoreplicante que es en realidad una prolongación capsular de la mitocondria, denominada kinetoplasto. El aparato de Golgi está ubicado en la zona de la depresión flagelar. Hay especies parásitas y otras de vida libre.

Suborden: *Trypanosomatina*: Poseen un solo flagelo, libre o con membrana ondulante, el kinetoplasto es pequeño y compacto. Son todos parásitos.

Familia: *Trypanosomatidae*: En esta familia encontramos varios géneros monogenéticos (con un solo huésped): *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*, son todos parásitos de invertebrados y otros digenéticos (con más de un huésped) como *Leishmania* y *Trypanosoma* que alternan un huésped vertebrado y otro invertebrado.

Género: *Trypanosoma*: Se dividen en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el consecuente método de infección en el huésped vertebrado (**Hoare, 1964**).

Sección: *Estercoraria*: Comprende trypanosomas que completan su desarrollo en la región posterior del tubo digestivo del vector. Se transmiten por contaminación a través de las heces del insecto. Ejemplos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi*. La única especie de este grupo patógena para el hombre es el *T. cruzi*.

Especie: *cruzi* (**Chagas, 1909**)

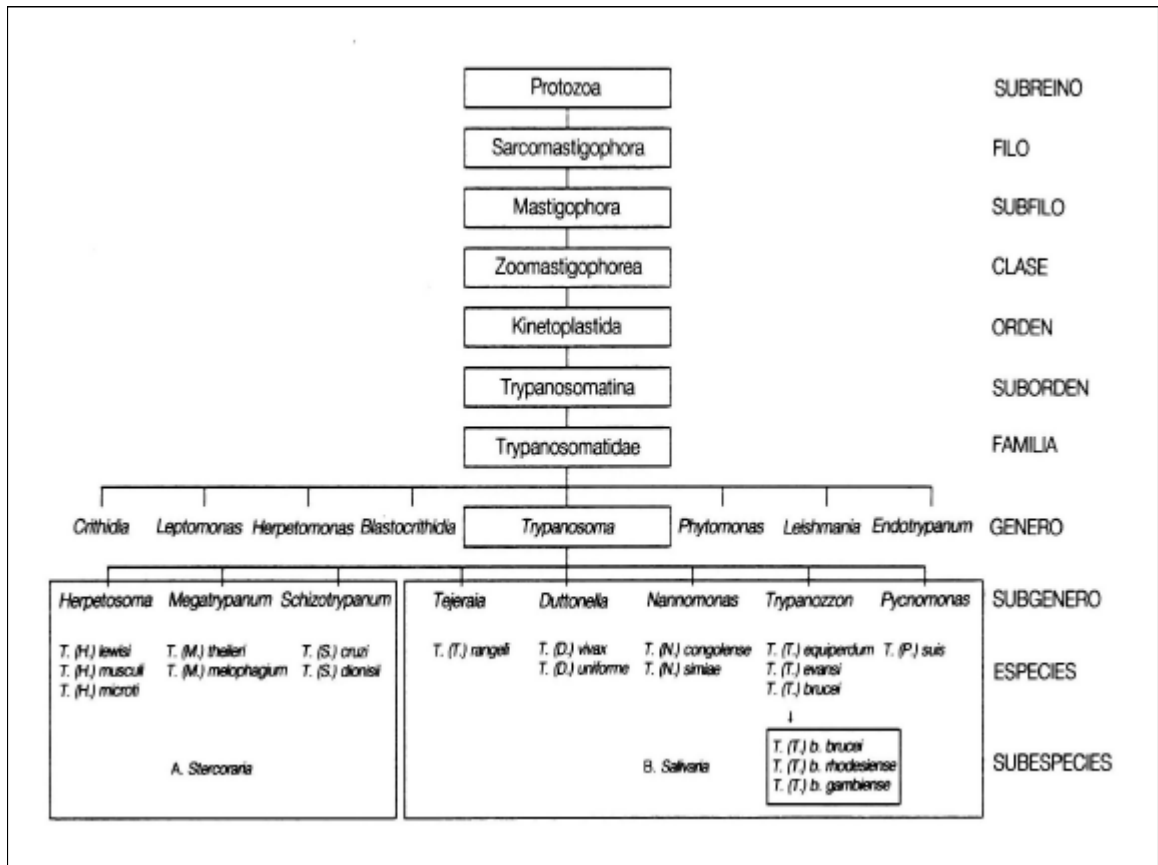


Figura 1. Esquema de la clasificación taxonómica de los trypanosomátidos. (OMS, 1991).

Entre las cualidades distintivas de este grupo taxonómico desde el punto de vista celular y molecular podemos mencionar:

- † El sistema kinetoplasto-mitocondrion que caracteriza el orden *Kinetoplastida* está presente en los géneros *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Crithidia* entre otros. Esta organela es única y está localizada en la base del flagelo, contiene una red de ADN (kADN) concatenado que codifica para funciones involucradas en la producción de energía, como en las mitocondrias convencionales.
- † El «pocket» o bolsillo flagelar es un dominio particular de la membrana plasmática, una invaginación entre el cuerpo celular y el flagelo donde ocurre el tráfico de moléculas con el medio extracelular por endo y exocitosis (**Vickerman, 1994**).

Ciclo de vida

El *T. cruzi* presenta 3 estadios en su ciclo de vida, distinguibles morfológicamente según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (**Brener, 1973**).

El **epimastigote** es la forma flagelada replicativa, en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular.

El **tripomastigote** es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos huéspedes. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el kinetoplasto es distal al núcleo celular. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en

el intestino del insecto, siendo estas últimas las formas infectivas. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar macrófagos por un evento fagocítico (Zingales, 1985) y también otros tipos celulares por un evento dirigido por el parásito y mediado por receptores (Ortega-Barria, 1991).

El **amastigote** es la forma no flagelada de localización intracelular en vacuolas ácidas y replicativa en el citoplasma del huésped (Ley, 1990).



Figura 2. Foto del estadio tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*.

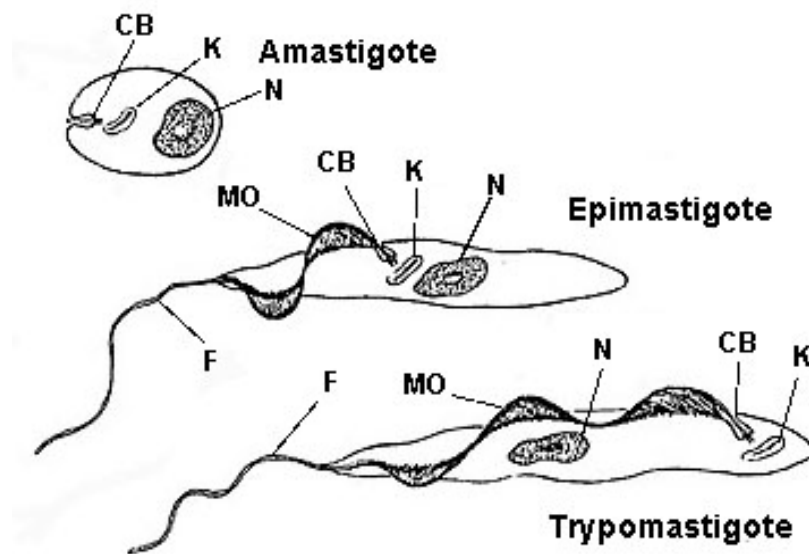


Figura 3. K: kinetoplasto; CB: cuerpo basal; MO: membrana ondulante
F: flagelo; N: Núcleo

Las formas tripomastigote circulan dentro de la sangre de un huésped vertebrado, siendo estos, parásitos extracelulares. Un vector hematófago, como la vinchuca, ingiere tripomastigotes junto con la sangre, su alimento. Los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes dentro del intestino medio de la vinchuca. Después de aproximadamente una semana, pasan al intestino posterior donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Cuando el insecto se alimenta, defeca a menudo al mismo tiempo y suelta tripomastigotes metacíclicos que contaminan la herida. Dentro del vertebrado, los tripomastigotes son fagocitados por las células de defensa del huésped, o pueden entrar en otras células como las del músculo cardíaco. Durante esta fase intracelular, se transforman en amastigotes y se multiplican por fisión. Posteriormente, los amastigotes se transforman en tripomastigotes, rompen la célula del huésped, y entran en la

circulación sanguínea. Así, pueden ser ingeridos por un vector, o pueden infectar una nueva célula del huésped vertebrado, pasando de nuevo a amastigotes y repitiendo el ciclo (**Figura 4**).

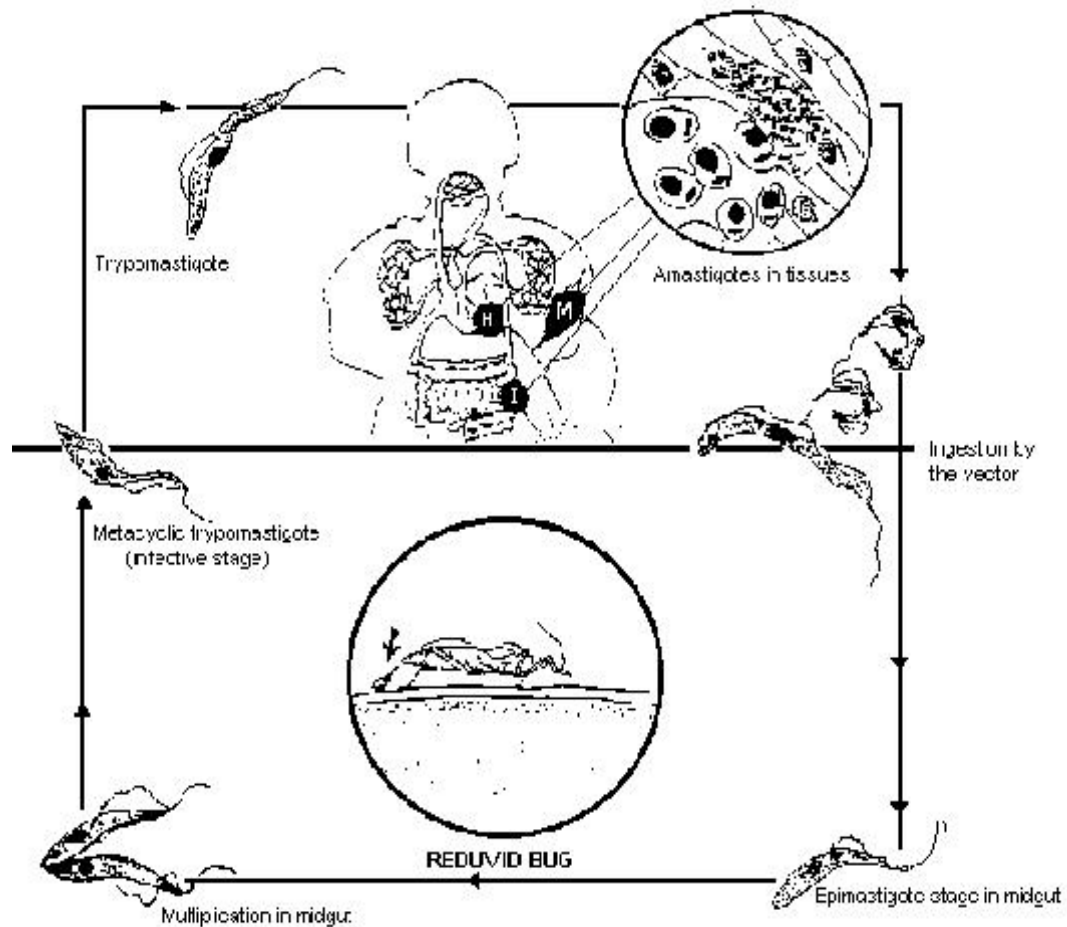


Figura 4. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

Antecedentes

Desde el descubrimiento del procesamiento de los precursores de los ARN mensajeros (pre-ARNm) en 1977, ha habido un gran progreso en el discernimiento de los factores involucrados en esta compleja reacción. Múltiples proteínas y componentes nucleoprotéicos son necesarios para catalizar el “splicing” del pre-ARNm, el cuál consiste en una serie compleja de reacciones denominada “splicing”. Éste ocurre a nivel de un complejo macromolecular: el “spliceosoma”. Los componentes de la maquinaria del “splicing” y los factores involucrados en el ensamblaje del spliceosoma incluyen las ribonucleoproteínas que contienen los ARN nucleares pequeños (snARN), U1, U2, U4/U6 y U5; los polipéptidos asociados a ARN heteronuclear (hnRNP); y un gran número de factores de “splicing” no ribonucleoprotéicos esenciales (**Kraimer, 1999**).

Se han descrito dos tipos diferentes de procesamiento del pre-ARNm: “*trans*-splicing” y “*cis*-splicing”. La reacción de “*trans*-splicing” intermolecular consiste precisamente en la unión de “exones” de ARN transcritos separadamente.

En la naturaleza existe una reacción denominada “*trans*-splicing” o adición de un “miniexón” o ARN “splice leader” (ARN SL). Esta reacción ha sido estudiada en una variedad de eucariotas inferiores como los tripanosomátidos y nematodos. El “*trans*-splicing” parece ser el único mecanismo de procesamiento de los tripanosomátidos ya que no se han encontrado intrones *cis* convencionales (**Kraimer, 1999**). Fue descubierto en tripanosomas africanos como resultado de experimentos diseñados para la caracterización de genes y ARNm de glicoproteínas de superficie. Se encontró que el ADN copia (ADNc) y los clones genómicos codificantes para estas proteínas eran idénticos excepto por una secuencia de 39 nucleótidos localizada en

el extremo 5' del clon de cADN. Por análisis de hibridización se reveló que esta secuencia no estaba codificada cerca del gen de la proteína de superficie, sino que estaba repetida casi 100 veces en otros loci. Todos los ARNm de los tripanosomátidos poseen esta secuencia de 39 nucleótidos derivada del ARN SL.

La reacción de "trans-splicing" se encuentra detallada en la figura 5.

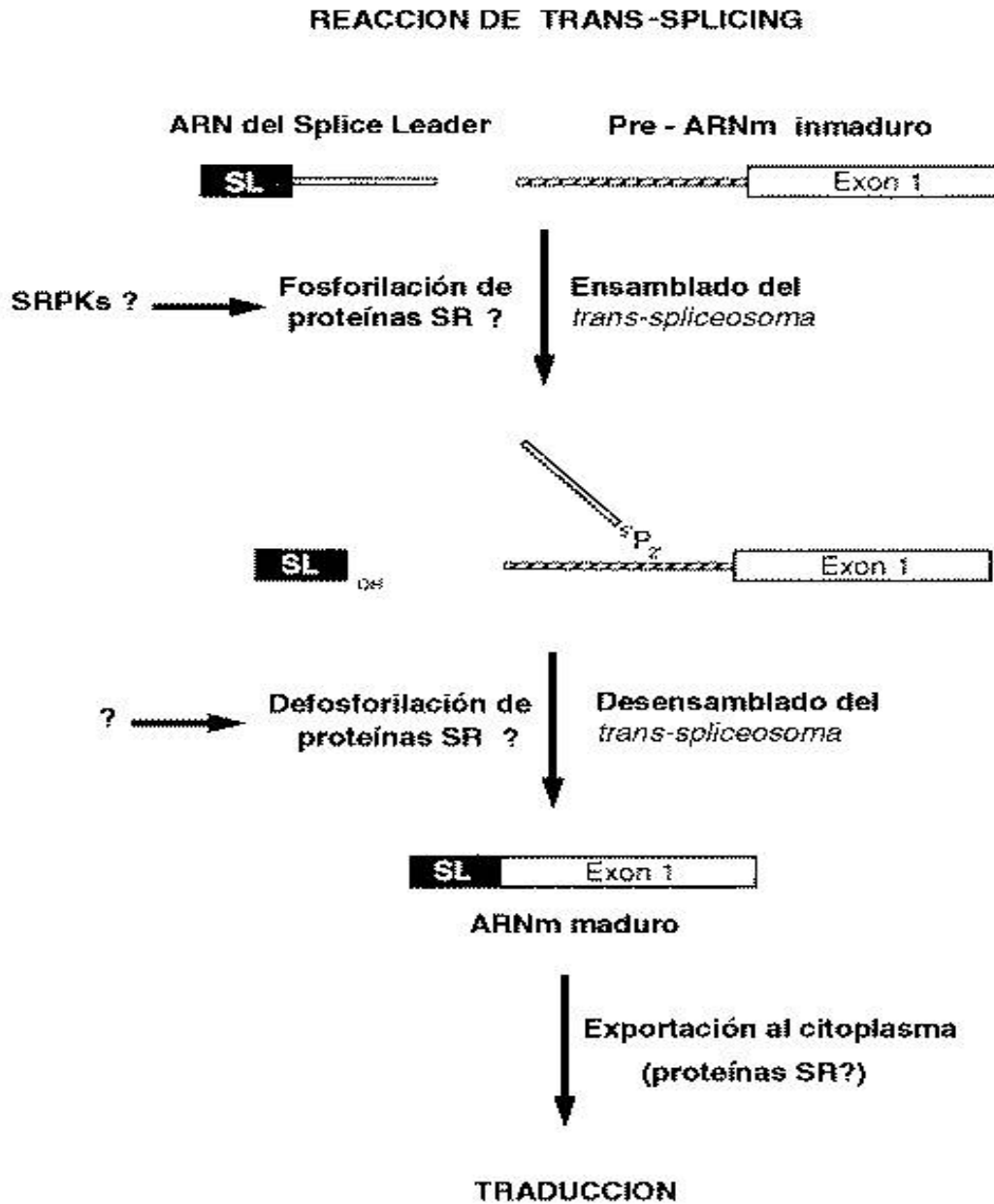


Figura 5. Reacción de "trans-splicing". El primer paso de la reacción de "trans-splicing" consiste en el clivaje del sitio 5' de "splicing" en el ARN SL, dejando un extremo 3'-hidroxi terminal. Simultáneamente a este clivaje, se forma un nuevo enlace fosfodiéster 2'-5' entre el extremo 5' de la porción intrónica del ARN SL y un residuo de adenosina situado aguas arriba del sitio de "splicing" 3'. En el segundo paso el hidroxilo 3' terminal del miniexón ataca el sitio de "splicing" 3' creando el producto de la reacción y liberando una estructura intrónica en forma de Y.

Por otro lado la reacción de "cis-splicing" también ha sido materia de detallados estudios. Los componentes de la reacción de "cis-splicing" en levaduras han sido analizados e identificados mediante el uso de técnicas genéticas sofisticadas, mientras que el estudio de los factores de "splicing" de mamíferos se ha basado primariamente en métodos bioquímicos. El primer sistema *in vitro* para el estudio del "cis-splicing" de pre-ARNm exógeno fue desarrollado en 1984, y poco tiempo después fue posible el fraccionamiento de

Las proteínas SR se caracterizan por un fosfoepítipo común, al menos un dominio de reconocimiento a ARN (RRM) en el extremo amino-terminal y un dominio rico en residuos de argininas y serinas en el extremo carboxi-terminal (**Giannakouros, 1999**) (**figura 7**).

Según el número de RRM presentes pueden dividirse en dos diferentes subgrupos: las proteínas SR de tipo 1, representadas por SF2/ASF (factor de “splicing” 2/ factor de “splicing” alternativo), SRp40, SRp55 y SRp75, poseen dos motivos de reconocimiento a ARN; y las de tipo 2, entre las cuales se encuentran SRp20, 9G8 y SC35, poseen un sólo motivo (**Figura 8**). A pesar de que en principio se especuló que la presencia de una o ambas copias del RRM podía determinar la especificidad de estos reguladores del “splicing”, los dos tipos de proteínas presentan comportamientos similares en ensayos in vitro de “splicing” constitutivo y alternativo (**Krainer, 1999**).

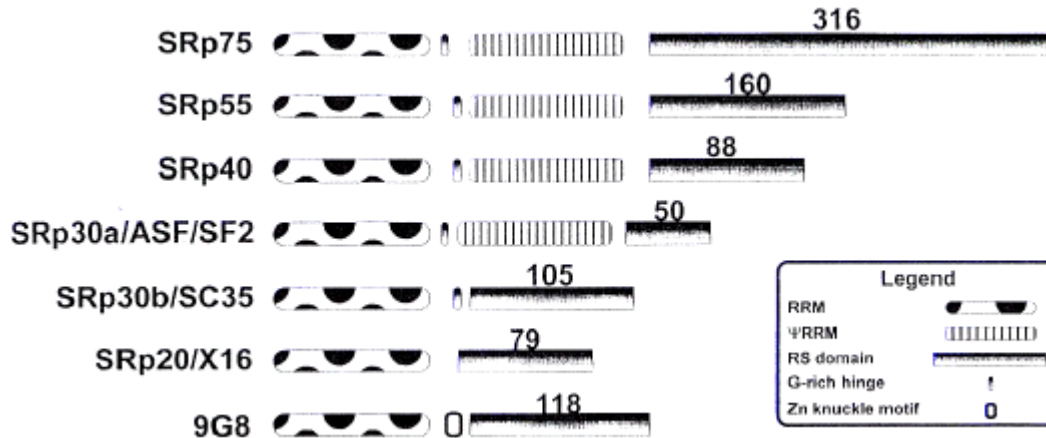


Figura 7. Representación esquemática de los dominios de las proteínas SR de humano. Cada miembro de la familia está compuesto por un extremo N-terminal del tipo RRM, dominio de unión a ARN, y una secuencia repetitiva de argininas y serinas en el extremo C-terminal, llamada dominio RS.

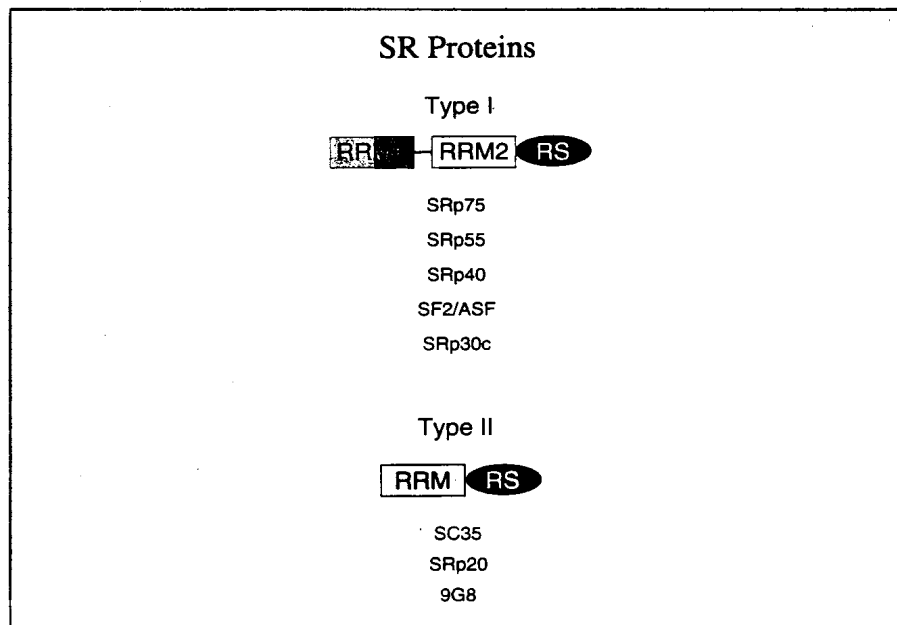


Figura 8. Las subfamilias de proteínas SR. Las proteínas SR pueden distinguirse según la presencia o ausencia de un segundo RRM.

Numerosas investigaciones han demostrado que los residuos de serina precedidos o seguidos de argininas (dipéptidos RS/SR) son fosforilados por quinastas específicas, permitiendo así que las proteínas SR migren desde sus reservorios intranucleares hacia los sitios de “splicing”. Se han identificado varias quina-

sas en mamíferos que fosforilan factores de “splicing” con dominios ricos en dipéptidos SR dispuestos en tandem, incluyendo las quinasas específicas de proteínas SR 1 y 2 (SRPK1 y SRPK2) (**Ren-Jan Lin, 2000**). La remoción de las repeticiones de serina y arginina de la proteína SR SF2/ASF, así como la sustitución de las serinas o de las argininas, resultó en proteínas mutantes que no podían ser fosforiladas por SRPK1, lo cuál sugirió que esta quinasa reconoce específicamente los dipéptidos SR conservados (**Xiang-Dong Fu, 1994**).

En base a estudios en extractos celulares de mamíferos, se requiere de la fosforilación y la desfosforilación de las proteínas SR para que ocurra el “splicing” de los precursores de ARNs mensajeros (**Ren-Jan Lin, 2000**). Una posibilidad es que la fosforilación podría modular la propiedad de unión a ARN de las proteínas SR, modificando potencialmente su blanco específico. Otra posibilidad es que las interacciones proteína-proteína entre las proteínas SR y otros elementos del “spliceosoma” podrían estar afectadas por la fosforilación del dominio RS. La fosforilación ha sido implicada en el ensamblado del “spliceosoma”, en la regulación de la selección del sitio de “splicing”, en la modulación de la actividad y en la localización subnuclear de las proteínas SR; sin embargo se requiere mucha más evidencia experimental para poder comprender este mecanismo regulatorio (**Stojdl, 1999**).

El objetivo principal de esta tesina es la caracterización de la primera quinasa específica de proteínas SR descrita en un eucariota inferior, el *Trypanosoma cruzi*, llamada TcSRPK, recientemente clonada en el laboratorio del Dr. Torres. Para esto se ensayó la quinasa con diversas proteínas SR (de mamífero y del parásito en cuestión (TcSR)); con diferentes proteínas mutantes del dominio RS de SF2/ASF, con TcSR y en presencia de diferentes péptidos sintéticos con motivos de arginina/serina variables correspondientes a distintas regiones del dominio RS de TcSR.

También se realizó un ensayo de complementación de levaduras mutantes de una quinasa de proteína SR, y de sobreexpresión en levaduras salvajes.

Materiales y métodos

Cepas de *Escherichia coli* y vectores utilizados. Se utilizó el vector pCG recombinante, para el clonado de fragmentos codificantes de proteínas SR utilizados como ADN templado en la PCR. El vector pGEMt-easy[®] (el cuál contiene el gen *b-gal* como marcador de selección) fue usado para el subclonado de los productos de PCR. Para la transformación con los productos de la ligación se utilizó la cepa de *E. coli* DH5a. Para la expresión de las proteínas se transformó la cepa de *E. coli* BL21 con el vector pET19b recombinante (el cuál contiene el gen *Amp^r* como marcador bacteriano)

Medio utilizado para los experimentos con *E. coli*: Medio LB (1 litro): 10 gr. NaCl, 10 gr. Peptona de caseína, 5 gr. Extracto de levadura.

Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* y vectores utilizados. En los ensayos con levaduras se utilizó el vector de expresión pREP1 reprimible por tiamina. El promotor *nmt1* de este vector permite regular la expresión de un gen en un medio dependiendo de la presencia de tiamina. Las cepas de *S. Pombe* haploides usadas para el ensayo de sobreexpresión son: cepa salvaje 1913 (*h⁻ leu1*) y para los ensayos de complementación: cepas mutantes 2D4 (*h⁻ leu1, ura4, kic1::ura4⁺, dsk1::ura4⁺, his2*).

Medios utilizados en los ensayos con *S.pombe*: Medio YES (Extracto de Levadura suplementado): 0.5% p/v Extracto de levadura, 3% p/v glucosa, 50-250 mg/litro adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina hidroclicorada. Medio YEL suplementado con leucina: 0.25% Extracto de levadura, 1.5% glucosa, 30 mg/ml leucina. EMM: 3 g/litro Potasio hidrógeno ftalato, 2.2 g/litro Na₂HPO₄, 5 g/litro NH₄Cl, 2% (p/v) glucosa, 20 ml/litro Sales (stock 50X), 1 ml/litro Vitaminas (stock 1000X) y 0.1 ml/litro Minerales (stock 10000X) (**ver Guthrie, 1991**).

PCR. la mezcla de reacción de 50 ml para el clonado in vitro de las proteínas SR consistió en: ADN molde (pGEMt-easy/gen de cada una de las proteínas SR), buffer de PCR 10X, primer 5' NdeI 100 ng/ml, primer 3' BamHI 100 ng/ml, enzima Taq 1 U/ml, dNTPs 10 mM y H₂O. Se siguió el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C 5 min., 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 55°C 30 seg. y 72°C 2 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa 1%.

Ligado de los productos de PCR en el vector pGEMt-easy. Los fragmentos NdeI/BamHI fueron ligados en el vector pGEMt-easy NdeI/BamHI desfosforilado. La mezcla de reacción de ligado en 5 ml fue la siguiente: buffer de rápida ligación T4 ADN ligasa 2X 2.5 ml, producto de PCR (cada uno de los genes de las proteínas SR) 1 ml, vector 0.5 ml, ligasa T4 0.5 ml y H₂O 0.5 ml. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante toda la noche.

Transformación de la cepa *E. coli* DH5a con los productos del ligado. Se retiraron del freezer tubos con bacterias DH5a competentes. Se agregaron 5 ml de las reacciones de ligación anteriores. Luego

fueron incubados durante 15 minutos en hielo. Se realizó una segunda incubación durante 5 minutos a 37°C; y con el posterior agregado de 800 ml de medio LB, los tubos se volvieron a incubar durante 1 hora a 37°C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 5 min. a 4000 rpm y los sedimentos se plaquearon en LB agar con X-gal 2% 30 ml e IPTG 0.5M 12 ml. Las placas fueron incubadas a 37 °C

hasta el día siguiente. Algunas de las colonias blancas que crecieron fueron repicadas en un tubo con medio LB suplementado con ampicilina para seleccionar las bacterias recombinantes.

Minipreparación de ADN plasmídico. Se obtuvo ADN plasmídico a partir de los repiques de bacterias recombinantes. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 4 min. para cosechar las células. El sobrenadante fue retirado y se dejó el precipitado. Éste fue resuspendido en 100 ml de la solución I (precipita células) agitando vigorosamente en un Vórtex. Se agregaron 200 ml de solución II (rompe membranas celulares) y se mezcló por inversión. Posteriormente 150 ml de solución III (precipita ADN genómico) fueron agregados, y se mezcló de la misma forma. Se realizó una centrifugación durante 10 min. a máxima velocidad (13200 rpm) y el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf limpio. Se adicionaron 4 ml de RNAsa (10 mg/ml) y se incubaron en estufa a 37°C durante 1h 30 min. Luego se agregó un volumen de una solución de cloroformo isoamílico (24:1 v/v), se centrifugó a máx. velocidad durante 1 min. para separar las fases acuosa de la orgánica y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Luego de repetir el mismo procedimiento, se adicionaron 2 volúmenes (900 ml) de Etanol absoluto y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 20 min.. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue lavado con Etanol 70%. Se lo dejó secar para finalmente resuspenderlo en 20 ml de agua. **Solución I** (TGE frío): Tris-HCl 25 mM pH8, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM. **Solución II:** 0,2 N NaOH, 1% SDS. **Solución III:** Acetato de potasio 3M pH 5.2.

Digestión enzimática del ADN plasmídico. Para verificar la presencia de los insertos correspondientes a los genes de las proteínas SRs el ADN plasmídico fue digerido con NdeI y BamHI, mediante la preparación de la siguiente reacción de digestión en 20 ml de volumen final: Buffer de reacción 10X 2 ml, ADN plasmídico 2 ml (aproximadamente 500 ng), NdeI 0.5 U, BamHI 0.5 U y H₂O 15 ml. Las mezclas de reacción fueron posteriormente incubadas a 37°C durante 2 horas. Las muestras digeridas fueron sembradas en un gel de agarosa 1% para la purificación de los insertos.

Purificación de los insertos por GeneClean. Se extrajeron los tacos de agarosa con los insertos por medio de un bisturí. Se pesaron los tacos y se procedió a agregar 3 volúmenes de buffer QIAEX1 y 30 ml de resina QIAEX II. Las muestras fueron incubadas a 50°C durante 10 min. (agitando con un Vórtex cada 2 min.). Luego se centrifugaron durante 30 seg. a máxima velocidad y se removió el sobrenadante. El sedimento fue lavado con 500 ml de buffer QIAEX1. Posteriormente a una nueva centrifugación, el sedimento fue lavado 2 veces con buffer PE (80% de Etanol absoluto, 20 % buffer PE) con centrifugaciones durante 30 seg. Para eluir el ADN se agregaron 20 ml de agua y el sedimento se resuspendió agitando en un Vortex. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugaron durante 30 seg. y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo. Se repitió el paso de la elución del ADN de la resina con agua para mejorar el rendimiento.

Ligación del vector pET19b con los insertos NdeI/BamHI. La relación vector –inserto fue de 1:5. La mezcla de reacción de ligación de 10 ml de vol. final fue la siguiente: buffer 10X 1ml, ligasa 0,5ml, vector 50 ng (Cf 15ng/ml), insertos y agua para llevar a volumen. La reacción se llevó a cabo en un baño a 16-18°C durante la noche.

Expresión de las proteínas SR. Se llevó a cabo la transformación de la cepa BL21 con los productos de la ligación, en placas con medio LB agar suplementado con ampicilina y cloranfenicol, según el procedimiento descrito anteriormente. Se repicó una colonia de cada una de las placas con las bacterias transformadas, en 5 ml de medio LB-ampicilina-cloranfenicol y se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente se diluyeron los 5 ml de cada cultivo en Erlenmeyers con 100 ml de medio LB y los dos antibióticos. Se dejaron incubando del mismo modo. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 520 nm (crecimiento exponencial), se procedió a inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Se tomaron 20 ml de los cultivos para una muestra control sin inducción y se indujo la expresión de los 80 ml restantes por el agregado de IPTG a la concentración final de 400 mM. Se dejaron durante 4 horas en agitación. Luego se cosecharon las células y se lavaron con buffer de lisis en presencia de antiproteásicos (Aprotinina 25 U/ml, PMCF 0.1 mM y leupeptina 10 mg/ml). Se realizó el mismo procedimiento con las muestras no inducidas. Los precipitados se resuspendieron en 500 ml del buffer de lisis y se pasaron a un tubo Eppendorf. Finalmente las muestras fueron congeladas a –70°C.

Purificación de las proteínas recombinantes. los sedimentos guardados a –70°C se descongelaron para su posterior sonicación. Se realizó una centrifugación para la obtención de un precipitado conteniendo las proteínas insolubles en los cuerpos de inclusión y un sobrenadante con proteínas solubles. El sedimento fue tratado con buffer fosfato 10 mM, urea 8M pH 8 durante 2 horas en agitación, para la solubilización de los cuerpos de inclusión y desnaturalización de las proteínas. Luego se agregaron 500 ml de la resina de Niquel

y se dejó 2 horas más en agitación. La muestra fue colocada en una columna y se procedió a iniciar la purificación por columna de afinidad. Luego del percolado de 5 ml, se realizaron sucesivos lavados con una solución 20 mM imidazol en el mismo buffer. Posteriormente se realizaron las eluciones con soluciones de 50, 100 y 200 mM imidazol en el mismo buffer. Los eluidos fueron analizados por un gel de poliacrilamida. Por último se realizó una diálisis de las muestras con las proteínas recombinantes purificadas.

Ensayos quinasa in vitro. Los diferentes sustratos purificados (proteínas SR, proteínas sustrato universal para quinasas, mutantes de ASF, péptidos sintéticos) fueron ensayados con la proteína quinasa TcSRPK en una mezcla de reacción de 25 ml (que contiene 25 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 50 mM ATP y 5 mCi [g-P³²] ATP). Luego de una incubación a 30°C durante 30 min. se detuvo la reacción por el agregado de 6 ml de Buffer de Laemmli 5X y calentamiento a 95°C durante 5 min. Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE. Luego se tiñó el gel y se expuso con una placa autoradiográfica a -70°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se preparó un gel separador 12% acrilamida. Para ello se dispuso de las siguientes soluciones: gel separador: Tris HCl pH 8.8 1.5 M, SDS 10%, acrilamida-bis 30%, PSA (persulfato de amonio) 10% y TEMED 10%; gel stacking: H₂O, Tris pH 6.8 0.5 M, SDS 10%, acrilamida 30%, PSA 10% y TEMED. Las muestras fueron sembradas en el gel. La corrida fue iniciada a 40 mA. Se tiñó el gel con una solución de metanol, acético y Azul de Coomassie y se decoloró con metanol y acético.

Transformación de *S. Pombe*. La transformación de las levaduras fue llevada a cabo mediante el método de acetato de litio con algunas modificaciones. Un cultivo de 3 a 5 ml en medio YES fue crecido a 33°C durante 24 horas en agitación. Un cultivo de 150-200 ml fue iniciado luego mediante el agregado de una cantidad de células del cultivo pequeño de manera tal que la densidad óptica llegara a 0.5-1.5 x 10⁷ células/ml en 12 horas. Cuando se alcanzó esta densidad (DO 0.5), los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 40 ml de agua. Posteriormente el sedimento fue resuspendido en acetato de litio 0.1 M para obtener una densidad de 10⁹ células/ml. Se sacaron alícuotas de 100 ml. Luego de una hora de incubación a 30°C durante 90 min. en agitación, se agregó 1 mg del ADN plasmídico correspondiente en 15 ml de buffer TE a cada alícuota de 100 ml de células resuspendidas. Además se adicionaron 290 ml de polietilenglicol precalentado a 30°C y se agitó en un Vortex. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora con ocasional agitación a la temperatura adecuada. Luego de un golpe térmico a 43°C durante 15 min., las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. y luego se recuperaron en 10 ml de medio YEL suplementado con leucina durante 1 hora. Posteriormente a la centrifugación a 3000 rpm, el precipitado fue lavado con 40 ml de EMM (Medio mínimo de Edinburgh) y fue plaqueado en placas con EMM más tiamina 2 mM (suplementado, según la auxotrofia de la levadura: con histidina para 2D4). Las placas se incubaron a 30°C hasta que aparecieron colonias (4 días). **Buffer TE** (Tris/EDTA): 10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8.

Expresión de los genes *tcsrpk* y *tcsr* de *T. Cruzi* en *S. Pombe*. Los plásmidos recombinantes pREP1/-, pREP1/*TcSRPK* y pREP1/*TbSRPK* fueron transformados en las levaduras salvaje (cepa 1913); y en la cepa mutante 2D4 se transformaron pREP1/-, pREP1/*TcSRPK* y pREP1/*TcSR*. La expresión de los genes *Tcsrpk* y *TcSR* bajo el control del promotor nmt fue inducida por crecimiento de las células en un medio libre de tiamina.

Otros métodos. La concentración de proteínas para los ensayos quinasa fue determinada por el método de Bradford.

Resultados

Ensayo de especificidad de sustrato

TcSRPK ha sido clonada como una proteína quinasa y expresada en *Escherichia coli* como una proteína de fusión con una cola NH₂ terminal de seis residuos de histidinas (llamada His6-TcSRPK). La proteína His6-TcSRPK de la fracción soluble del lisado de bacterias fue purificada por una columna de Niquel y fue eluida de la misma con concentraciones crecientes de imidazol.

La secuencia proteica de TcSRPK sugiere una homología con la proteína TbSRPK, la cual es una quinasa específica de proteínas SR de *Trypanosoma brucei*. (**figura 1**).

MPKFNKKTGGWCAKKNKGSAPTKKKT KYIDPCGTNEVDASINTATEEVESH
 MPRPDRRAKYG RRAQNKI TTGGGGAKRKSPI APHVEKDGIDINALLEE IE

EE PLGQPHF SKIKRKKNDKLQLQE IG RLTLKPGMTVAQAHE KANKVYQQ KPL
 RNDSPA EEKVPKETT KKS RRRRKA EKVEGLAVKPGTTV AQARMLAS KMQQRH

QNIPDPSFEE EEEGYEEGEDHGGSEDEYS DTANERSVEYRKGGYHPVVVGE
 SASTNGPSQPAHQ RSEDEDEDDXDEEQDGXGEDYSDIAN ERPSEYR KGGYH
Phosphate anchor
VYHDRYRVVRK- - -LGWGYFSTVWLVDYVTK RYQALKVQKSAKHY
 PVVVGEVYNQRYRRKLGWGYFSTVWLVDYVEKVFQAMKVQKSAKHY

TEAAYDEIKLLGEIMSSDPDKTCCARMNDYFEHTGPNGVHVCMVFDVYGED
 TEAAYXEIKLLGEIMTADPEKVRRCARLNDHFEQQPNGKHVCMVFDVYGED
Linker loop
LLSLIDRYEYRGVPLPIVKCISRQLVGLEHLHSLDIIHTDLKPENVLLS SPKHA
 LLSLIERKYHGVPLPIVKCISRQLIGLEHVHSLDIIHTDLKPENVLLSAPKHA

I ISLMKRYHPPPLHQRLRLVERDPKTMTKSQRRRYKLLKA IEQ NGKKNENIS
 IVSQMKRFKPPPLHDRPSLVKRPDKTMTKSQRRRYKLL RAAGKG KDSAEGN

EKDNQCAT AKTHKNSI EQNREQDQA EAISESETSDWEI ERLHHVVLADFGN
 EEQNDE DI AREVHVPNEAAPQQS EKEPLSETDSEWEVERLHHVVLADFGN
Activation loop y P+1 loop
SCWTYRQFTDEVQTRQYRCPEVILGEPYSTPIDLWSAACL IFELITGEFLDPRK
 SCWTYRQFTDEVQTRQYRSPEVILGYPYSTSIDLWSAACMIFELITGEFLDPRK

GENYSRDEDHLALMTELLGDLVSMRLGEGKYRS QFYNSRGALRNIKDLNFWG
 GSDYSRDEDHLAL I SELLVLPVSMRLGDGKYRAQYYNSRGELRSIKDLNFWG

LDDVLYRKHKFTRKKAEEIADFLPMLEFDPQKRATATEMLANFEHFFEIK
 LEDVLYRKHKFTRKKAEEIAEFLLPMLELEPHNRATATDMLNMFQHF FEVQ

EDDYS PFCFV SSDADREMVEASTSN EEDSETSGDSNDADDESENTSLGRGK
 EDDYAPLCFVPSSDHRGG ERSSGNMEESEFSDTF EETDDYDRSRRLDRTYD

TRCGNKEMDSAQFLGTFPFL PGSSLEKRGLSL LDHDL LAGKELEDPAAHKSALE
 AMEDSLSRQDEETARYLAGHSLNEASLAKRGLTIL DIQAVLSGQQLEDEERQAA

VI HLLSEEAADTRGEGHADRDGDATSRVEELNNSIGDAGSD
 ATE IIRLLSEEADDSSDGHCADREDGDSNSSVDES DSSCTND

Figura 1. Comparación de la secuencia aminoacídica de TcSRPK (desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal) con la quinasa de proteínas SR: TbSRPK. En la figura se indican los aminoácidos homólogos en negrita y los diferentes dominios en azul. Se puede observar que las proteínas presentan una gran homología (aunque sus extremos son diferentes) y poseen los mismos dominios.

Debido a que todos los miembros de la familia de proteínas SRPK1 fosforilan específicamente varios miembros de la familia de proteínas SR, se examinó la actividad de fosforilación de TcSRPK usando proteínas SR como sustratos y otras proteínas, sustratos universales de quinasa.

Las proteínas SR son fosfoproteínas *in vivo* y contienen secuencias consenso de fosforilación: Ser-Pro-X-(Arg/Lys). Fueron purificadas según se indica en materiales y métodos, y una alícuota fue analizada por SDS-PAGE para confirmar que las proteínas esperadas se purificaron de forma homogénea.

Las siguientes proteínas de mamífero fueron ensayadas como sustratos: SF2/ASF y LBR (receptor de lámina B). SF2/ASF es un factor de "splicing" que contiene un dominio SR y LBR es una proteína integral de la membrana nuclear que posee dipéptidos SR/RS. Se realizó un control negativo sin enzima para SF2/ASF y TcSR. Además se ensayó una proteína SR de *Trypanosoma cruzi*, llamada TcSR.

De acuerdo a los resultados esperados en base a la secuencia primaria de TcSRPK, SF2/ASF (calle 6) y LBR (calle 1) fueron fosforiladas por TcSRPK, así como TcSR (calles 2, 3 y 4). Efectivamente los controles de TcSR y SF2/ASF (calle 5 y 7) dieron negativo (**figura 2**). **Estos resultados indican que la proteína TcSRPK es una quinasa de proteínas con dipéptidos SR/RS.**

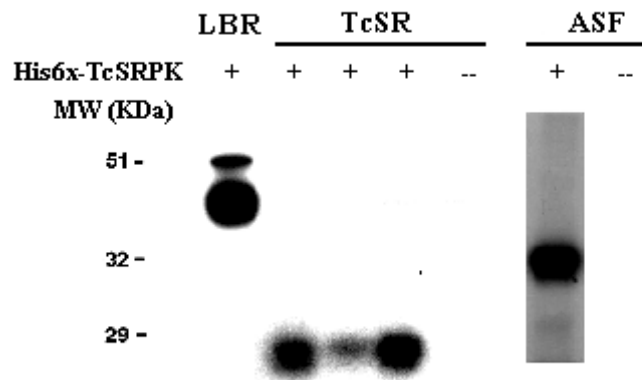


Figura 2. Ensayo de especificidad de sustrato de TcSRPK. La His6x-TcSRPK fue incubada con LBR, TcSR (3 clones independientes) y SF2/ASF en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP durante 30 min. a 30°C. Las muestras fueron analizadas en un gel de poliácridamida-SDS 12% y reveladas por autoradiografía.

Por otro lado se ensayaron los sustratos universales de quinasas de serina y treoninas: MBP (proteína básica de mielina), histona H1 y caseína como polipéptidos con serina/treonina. Consistente con los resultados obtenidos con otras quinasas de proteínas de esta familia (**Giannakouros, 1999**), histona H1 y caseína no fueron fosforiladas con TcSRPK. Por el contrario, MBP pudo ser fosforilada por la quinasa (**figura 3**). **Esto sugiere que TcSRPK tiene una gran especificidad de sustrato, en comparación con otras quinasas de proteínas SR, como hSRPK1, que tienen baja actividad sobre H1 y Caseína, y alta sobre MBP.**

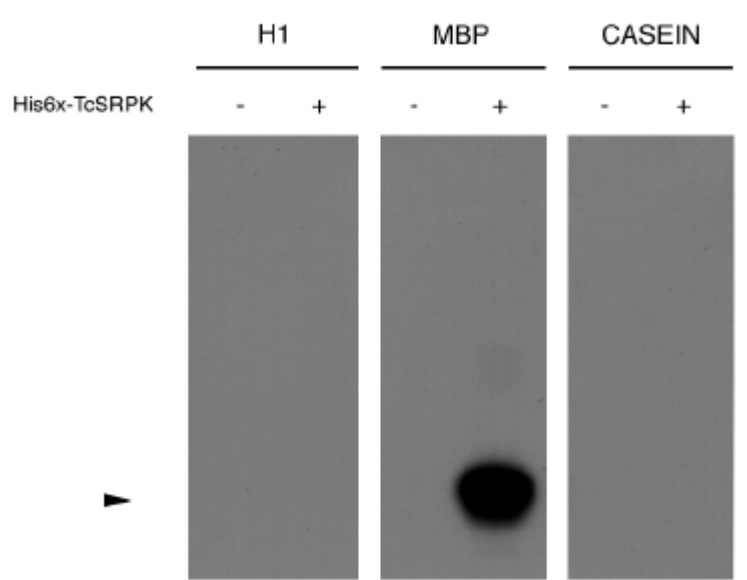


Figura 3. Ensayo con los sustratos universales de quinasas de serina y treonina. His6x-TcSRPK fue incubada con 1 mg de MBP, histona H1 y caseína en las mismas condiciones que el ensayo anterior. Las muestras fueron analizadas en un gel de poliácridamida-SDS 12% y reveladas por autoradiografía.

Ensayo de fosforilación in vitro con mutantes de SF2/ASF

Para avanzar en la caracterización de TcSRPK se utilizó un conjunto de proteínas mutantes de SF2/ASF (**Cáceres, 1993**) diseñadas de forma tal de poder estudiar la especificidad de las proteínas quinasas de

Ensayo con los péptidos sintéticos de TcSR

Para caracterizar mejor el consenso reconocido por la TcSRPK en un posible sustrato endógeno como la proteína SR de *Trypanosoma cruzi*, TcSR, se utilizó un conjunto de 4 péptidos correspondientes al dominio COOH terminal de TcSR los cuáles contienen un número variable de dipéptidos arginina/serina (**figura 6**). El ensayo se realizó incubando cada péptido (llamados 1, 2, 3, 4 y 5) individualmente con TcSR y TcSRPK según se indica en materiales y métodos.

Los péptidos 1, 2, 3 y 5 pudieron ser fosforilados por TcSRPK. El péptido 2 fue fosforilado en mayor grado que el resto de los péptidos, posiblemente debido a una cantidad de dipéptidos RS mayor. Sin embargo el cuarto péptido, correspondiente al péptido tres pero en el cual las argininas fueron reemplazadas por alaninas (R®A) no pudo servir como sustrato (**figura 6**). **Estos resultados sugieren nuevamente, que TcSRPK fosforila péptidos SR/RS de TcSR específicamente y que TcSR contiene en su dominio RS, blancos de fosforilación por parte de TcSRPK.**

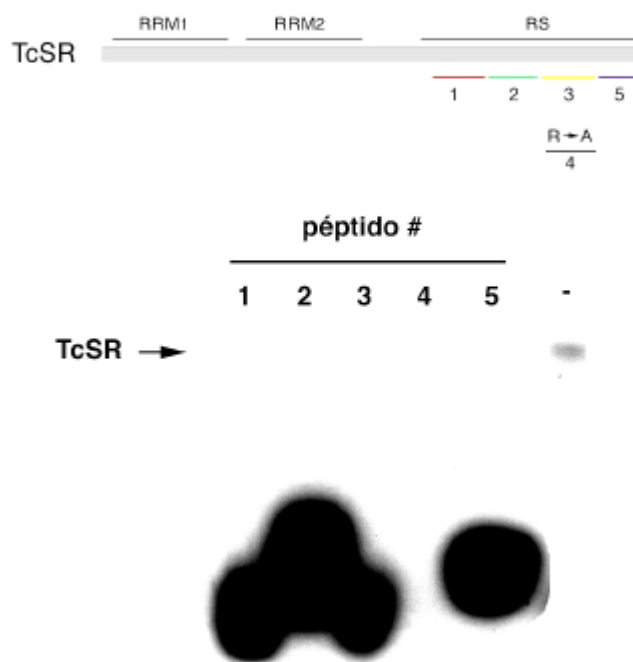


Figura 6. Esquema de la posición relativa de los péptidos en la molécula de TcSR. Fosforilación de TcSR por TcSRPK en presencia de diferentes péptidos sintéticos: Los distintos péptidos fueron incubados con TcSRPK (calles 1, 2, 3, 4 y 5) según las condiciones especificadas en materiales y métodos. La calle 6 solo contiene TcSR.

Ensayo de sobreexpresión en *Schizosaccharomyces Pombe*

La levadura de fisión *S. Pombe* ha sido utilizada, como sistema genético, para investigar el control del ciclo celular. Posee la ventaja de ser semejante a los sistemas de mamíferos, en cuanto a la aparición de intrones en los genes que codifican para proteínas.

En *S. Pombe* existen componentes proteicos similares a proteínas SR de mamíferos. En primer lugar, se han identificado varias proteínas con dominio RS: Prp2, esencial para el "splicing" del pre-ARNm in vivo; Srp1 y Srp2, las cuales contienen repeticiones RS. En segundo lugar se han descubierto quinases que fosforilan proteínas con dominios RS. Dsk1 es una proteína quinasa de *S. Pombe* que fosforila específicamente Prp2 in vitro y que ha sido implicada en el "splicing" del pre-ARNm por su homología de secuencia con SRPK1 humana (**Ren-Jan Lin, 2000**).

El análisis de secuencia indica que TcSRPK es una quinasa homóloga a la quinasa de proteínas SR humana, SRPK1, y de *S. Pombe*, Dsk1. En este ensayo se evidenció la similaridad funcional entre TcSRPK y la quinasa de proteínas SR de *Trypanosoma brucei*, TbSRPK. Primero se observó el fenotipo provocado por la sobreexpresión del gen *tcsrpk* y luego se lo comparó con el de la sobreexpresión del gen *tbsrpk*.

Se sabe (**Ren-Jan Lin, 2000**) que mutaciones en genes que codifican para proteínas involucradas en el procesamiento de los mensajeros inmaduros o que participan en la regulación del ciclo celular, producen fenotipos aberrantes como la elongación celular, probablemente a causa de un bloqueo del pasaje de G2 a M en el ciclo celular.

Debido a que las proteínas quinasa de proteínas SR están involucradas en el procesamiento de ARN, o “splicing”, es posible que tanto su eliminación como su sobreexpresión, produzcan fenotipos característicos de alteraciones en el ciclo celular. En base a esto, se decidió investigar en primer lugar, si la sobreexpresión de TcSRPK producía algún cambio en el fenotipo de una cepa salvaje de *S. pombe*.

Se sabe que la sobreexpresión de hSRPK1 (Ren-Jan Lin, 2000) produce la duplicación del tamaño poblacional. Si TcSRPK es efectivamente un homólogo de hSRPK1, entonces se espera obtener un resultado similar.

El plásmido pREP1/*TcSRPK* fue introducido en la cepa salvaje de *S. Pombe* 1913 y la expresión del gen *tcsrpk* fue inducida en ausencia de tiamina, según se indica en materiales y métodos. La mayoría de las células que sobreexpresaron TcSRPK presentaron elongación comparado con las células que fueron transformadas con el vector pREP1 (figura 7); la longitud celular promedio de la población se duplicó (de 7.19 a 14.25 mm) (tabla 1). Además se observó una población de células elongadas (más de 16 mm) representando el 40% de la población total (figura 9). Cuando la cepa salvaje 1913 fue transformada con el plásmido pREP1 *TbSRPK* se observaron resultados similares (figura 7); la longitud celular promedio aumentó más de un 50% (de 7.19 a 11.01 mm) en comparación con las células que llevaban el vector pREP1 solamente (tabla 1). **Por lo tanto la sobreexpresión de los genes de tripanosomátidos *tcsrpk* y *tbsrpk* en *S. Pombe* producen elongación celular.**

En la figura 8 se muestran estos resultados en un histograma. Las células que sobreexpresaron la proteína quinasa de *T. cruzi* presentan diferencias más significativas con respecto a las células transformadas con el vector pREP1, que las células que sobreexpresaron el gen *tbsrpk*.

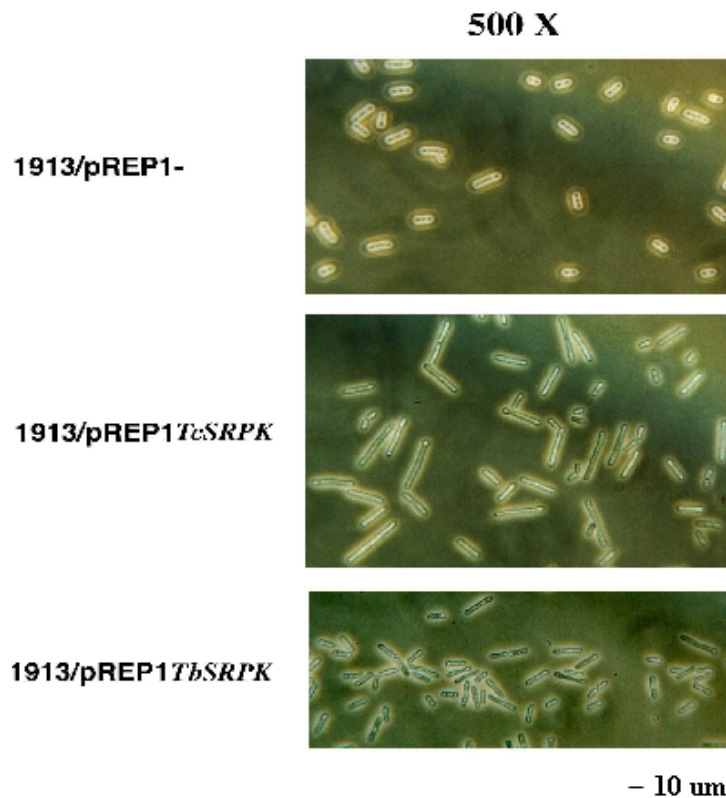
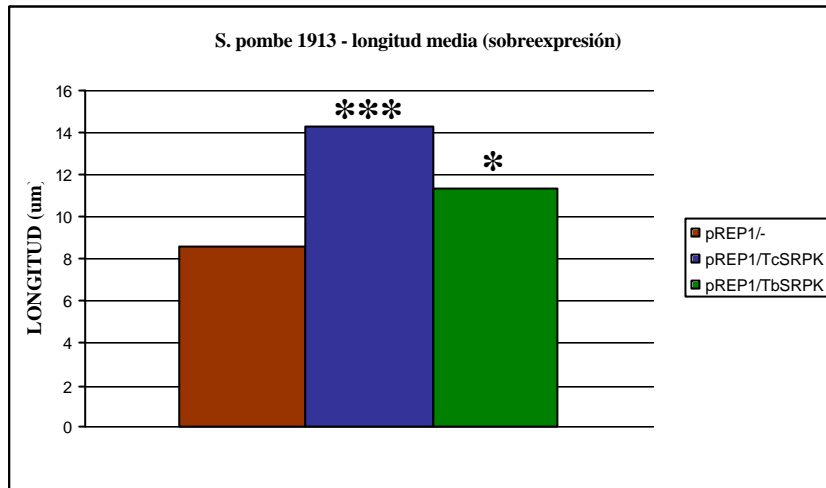


Figura 7. Efecto de la sobreexpresión de los genes *tcsrpk* y *tbsrpk* en la cepa salvaje 1913 de *S. pombe*. La cepa 1913 fue transformada con pREP1 *TcSRPK* y pREP1 *TbSRPK*. También se generó la cepa 1913 conteniendo el vector pREP1 como un control negativo. Primero se crecieron las células a 30°C en medio mínimo (EMM) con tiamina y luego se indujo la expresión de las proteínas TcSRPK y TbSRPK durante 21 horas en ausencia de tiamina, impidiendo la entrada de los cultivos en fase estacionaria, mediante diluciones periódicas de los mismos. Las imágenes de las células fueron obtenidas por un microscopio óptico. La magnificación es de 500 aumentos (500X). La barra de escala representa 10 mm. La sobreexpresión del gen *tcsrpk* produjo elongación celular comparadas con las células que llevaban el vector pREP1 solamente, bajo las mismas condiciones.

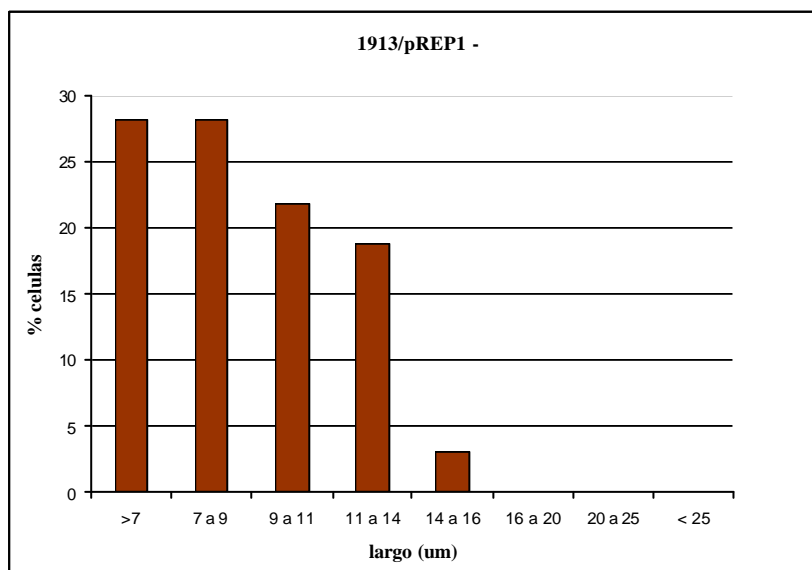
Tabla 1. Mediciones de la longitud celular

Cepa	N° de células	Promedio (mm)	Rango (mm)
1913/pREP1 -	109	7.19	(4-14.8)
1913/pREP1 TcSRPK	51	14.25	(3.2-35.5)
1913/pREP1 TbSRPK	113	11.01	(4.8-18.8)



ANOVA: *** = $p < 0.0001$; * = $p < 0.05$

Figura 8. El siguiente histograma, realizado mediante el test estadístico ANOVA, presenta la longitud media de las poblaciones de células de 1913/pREP1, 1913/pREP1 TcSRPK y 1913/pREP1 TbSRPK.



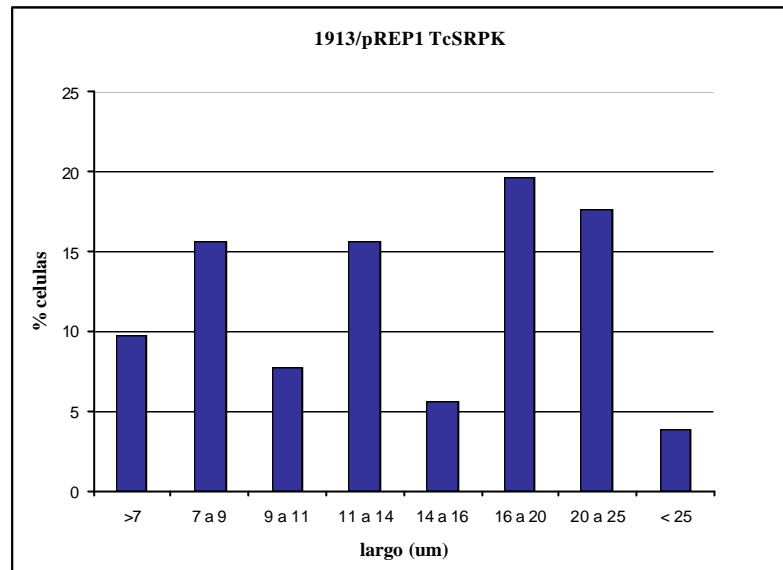


Figura 9. Distribución del tamaño de la población de células en la cepa 1913 con sobreexpresión de pREP1/TcSRPK y con pREP1/-. En los siguientes histogramas se presentan las poblaciones de células de 1913/pREP1/- y 1913/pREP1/TcSRPK con un rango de tamaño. Se observa una población de células de más de 16 mm de largo en 1913/pREP1/TcSRPK.

Ensayo de complementación en *Schizosaccharomyces pombe*

La complementación de un gen no funcional por otro es una forma de evaluar las homologías funcionales. Si TcSRPK es un homólogo funcional de Dsk1, debería compensar la pérdida de esta quinasa en la célula. Pero ocurre que Dsk1 no es esencial para la viabilidad de la célula; sin embargo la mutante nula *dsk1* es severamente afectada por la delección adicional del gen de una quinasa relacionada, *kic1*⁺. Con esta doble delección, las células crecen muy lentamente y forman microcolonias (Ren-Jan Lin, 2000). La complementación, revierte este fenotipo, permitiendo que las células crezcan normalmente.

Para llevar a cabo este ensayo se transformó la doble mutante nula *dsk1 kic1*, 2D4 (*Ddsk1 Dkic1*), con pREP1, pREP1 *TcSRPK*, pREP1 *TbSRPK* o pREP1 *TcSR* según se indica en materiales y métodos. Las transformantes fueron seleccionadas y reestriadas en placas con medio mínimo en presencia de tiamina (condición represible) para analizar su crecimiento. Cabe aclarar que el promotor de *nmf1* del vector pREP1 permite la transcripción basal de los genes que se encuentran río abajo, aún en presencia de tiamina.

Las células que llevaban el plásmido pREP1 *TcSRPK* y pREP1 *TbSRPK* formaron colonias normales, mientras que las que llevaban solamente el vector no crecieron. Interesantemente, TcSR logró compensar, aunque en menor medida que las quinazas, las deficiencias de esta cepa, produciendo la formación de colonias de tamaño cercano al normal (figura 10). Por consiguiente, la expresión de los genes *tcsrpk*, *tbsrpk* y *tcsr* complementan el defecto de crecimiento de la cepa mutante 2D4, sugiriendo que TcSRPK y TbSRPK son efectivamente, homólogos a las SRPKs de metazoos.

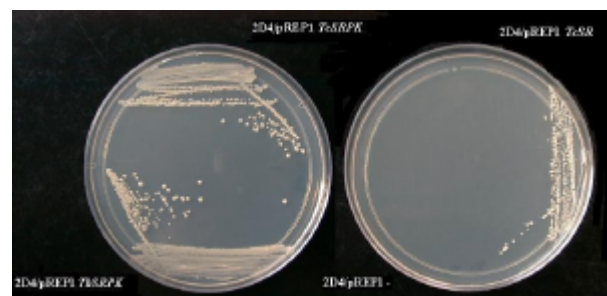


Figura 10. Efecto de la complementación de los genes *tcsrpk*, *tbsrpk* y *tcsr* en la cepa mutante 2D4 de *S. pombe*. La cepa 2D4 fue transformada con pREP1, pREP1 *TcSRPK*, pREP1 *TbSRPK* o pREP1 *TcSR*. Las transformantes fueron analizadas en placas con medio mínimo en presencia de tiamina e incubadas durante 3 días a 30°C. La expresión de los genes *tcsrpk*, *tbsrpk* y *tcsr* comple-

mentó el defecto de crecimiento de la cepa mutante $\Delta dsk1 \Delta kic1$ (2D4). Las células que llevaban los plásmidos pREP1 *TcSRPK*, pREP1 *TbSRPK* y pREP1 *TcSR* formaron colonias normales, mientras que las que solo llevaban el vector pREP1 no crecieron (bajo las mismas condiciones).

El mismo ensayo se llevó a cabo con dos mutantes del gen *tcsrpk*: una correspondiente al extremo N-terminal de la quinasa, *tcsrpk* ΔN y otra al extremo C-terminal, *tcsrpk* ΔC . La doble mutante nula *dsk1 kic1*, 2D4 ($\Delta dsk1 \Delta kic1$) fue transformada con pREP1, pREP1 *TcSRPK*, pREP1*TcSRPK* ΔN o pREP1*TcSRPK* ΔC . Las transformantes fueron seleccionadas según se explicó anteriormente. Las células que llevaban el plásmido pREP1 *TcSRPK* ΔN y pREP1*TcSRPK* ΔC prácticamente no crecieron, no pudieron revertir el fenotipo (figura 11). Esto demuestra que ambos extremos de la quinasa TcSRPK poseen dominios funcionales esenciales para la fosforilación de las proteínas SR y que ambos dominios deletionados (amino- y carboxi-terminales) son necesarios para el funcionamiento normal de la quinasa.



Figura 11. Efecto de la transformación de la cepa mutante 2D4 de *S. pombe* con el gen salvaje *tcsrpk* y con los genes mutantes *tcsrpk* ΔN y *tcsrpk* ΔC . La cepa 2D4 fue transformada con pREP1, pREP1 *TcSRPK*, pREP1 *TcSRPK* ΔN o pREP1*TcSRPK* ΔC . Las transformantes fueron analizadas según se detalla en la figura anterior. La expresión de los genes *tcsrpk* ΔN y *tcsrpk* ΔC no complementó el defecto de crecimiento de la cepa mutante $\Delta dsk1 \Delta kic1$ (2D4). Las células que llevaban los plásmidos pREP1 *TcSRPK* ΔN y pREP1 *TcSRPK* ΔC casi no crecieron, en comparación con las células que llevaban pREP1 *TcSRPK*.

Discusión

El trabajo presentado plantea la caracterización de una proteína novedosa de *Trypanosoma cruzi*. Las proteínas quinasas de proteínas SR o SRPKs han sido descritas en metazoos y aquí se demuestra la presencia de un homólogo en un protozoo, no sólo a nivel de secuencias génica y proteica, sino también a nivel funcional.

TcSRPK fosforiló la proteína SR humana ASF/SF2 y la proteína TcSR, in vitro. A pesar de que la proteína LBR no pertenece a la superfamilia de los factores de "splicing" con dominios SR, pudo ser fosforilada por la proteína quinasa de *Trypanosoma cruzi*, ya que posee dipéptidos SR repetidos. Interesantemente, TcSRPK tiene la misma especificidad de sustrato que otras proteínas quinasas de proteínas SR (como hSRPK1) ya que pudo fosforilar proteínas fuera de la familia SR, como MBP, pero no histona H1 o caseína, sustratos universales de quinasas. Esto demuestra que TcSRPK es preferentemente una quinasa de proteínas con dipéptidos SR/RS.

Por el ensayo con diferentes mutantes del dominio RS de SF2/ASF, se encontró que la delección de todos los dipéptidos RS o la mutación de las argininas a glicinas impidió la fosforilación. Esto indica que las argininas de los dipéptidos SR/RS son importantes para el reconocimiento de las serinas. Cuando los residuos de serina fueron reemplazados por treonina hubo una leve fosforilación debido a que la quinasa fue capaz de modificar esos residuos. Alternativamente es posible que TcSRPK pudiera modificar las serinas no mutadas que se encontraban fuera del dominio SR. Por consiguiente, TcSRPK es específica de dipéptidos SR/RS.

Además, el análisis de un conjunto de péptidos del dominio N-terminal de TcSR, los cuáles contenían un número variado de dipéptidos SR/RS, indicó que TcSRPK pudo fosforilar cierto número de dipéptidos SR.

Estos resultados sugieren que TcSRPK fosforila péptidos SR/RS de TcSR específicamente y que TcSR contiene en su dominio RS, sitios de fosforilación por parte de la quinasa.

El ensayo de sobreexpresión en *S. pombe* demostró que TcSRPK fue capaz de elongar las células. La sobreexpresión de TcSRPK, produjo el mismo fenotipo que el obtenido al sobreexpresar hSRPK, en la misma cepa (**Ren-Jan Lin, 2000**). Esto sugiere que ambas proteínas están involucradas en procesos relacionados con la maduración de mensajeros, hecho demostrado para hSRPK1.

En el ensayo de complementación, TcSRPK pudo revertir el fenotipo de la cepa 2D4 de *S. Pombe* teniendo en cuenta el tamaño de las colonias. Esto, junto a los resultados anteriores, obtenidos en ensayos *in vitro*, sugieren que TcSRPK es efectivamente una proteína homóloga a hSRPK. Una observación interesante, viene del hecho que TcSR, una proteína SR de *T. cruzi*, fue capaz de complementar parcialmente a 2D4. La complementación por parte de TcSR sugiere que las proteínas SR y las quinasas están involucradas en la misma vía, y pueden compensar la ausencia de Dsk1.

Estos resultados son relevantes en cuanto a que TcSRPK es el primer miembro de esta familia que se describe en un protozooario. Todas las proteínas quinasas de proteínas SR descritas hasta el momento son de metazoos. Como se dijo anteriormente, el *Trypanosoma cruzi* procesa sus mensajeros inmaduros mediante un mecanismo conocido como “*trans*-splicing”, mientras que los mamíferos lo hacen mediante “*cis*-splicing”. La conservación a nivel de secuencia (génica y proteica) y a nivel funcional de TcSRPK y hSRPK sugieren que ambas reacciones de “splicing” están relacionadas.

Otra observación importante de estos ensayos en levadura de fisión es la conservación de las quinasas específicas de proteínas SR a nivel molecular y celular, a través de la evolución. La evidencia de los últimos años sugiere que las proteínas SR y sus quinasas respectivas existen en *T. cruzi*. Los patrones de fosforilación e interacciones de este sistema de proteínas están conservados desde los tripanosomátidos hasta los mamíferos.

En un futuro, se intentará estudiar la función de TcSRPK en ensayos *in vivo* (en cultivos del parásito), sobreexpresando o eliminando TcSRPK. Será interesante estudiar la fisiología del parásito en esas condiciones.

Referencias

- Brener Z.** 1973. Annu. Rev. Microbiol. 27:347-383
- Cáceres J. and Krainer A.** 1993. Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. The EMBO Journal. 12:4715-4726
- Cáceres J., et al.** 1996. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine splicing factors. The Journal of Biological Chemistry. 271:24569-24575
- Chagas C.** 1909. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218
- Chiale P. Y Rosembaum M. B.** 1989. Clinical and pharmacological characterization and treatment of potentially malignant arrhythmias of chronic chagasic cardiomyopathy. Ed. E. M. Williams and T. J. Campbell. Handbook of experimental pharmacology. Springer-Verlag KG, Berlin, 601-620
- Cramer P., et al.** 1999. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA Pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. Molecular Cell. 4:251-258.
- Giannakouros T., Nikolakaki E., Papoutsopoulou S.** 1999. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. Biochemical and Biophysical Research Communications, 255: 602-607
- Graveley B.** 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. RNA (2000), 6: 1197-1211
- Guthrie C., Fink G.** Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press. Vol 194. 1991. pág. 795-823.
- Hoare C.** 1964. J. Protozool, 11:206-207
- Hoare C.** 1972. The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications, USA.
- Kinsey M.** 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. Gene 123:127-130
- Krainer A.** Eukariotic mRNA Processing. IRL Press at Oxford University Press. 1999. Chapter 6 y 10
- Levine N., et al.** 1980. J. Protozool. 27:37-54
- Laranja F. S., et al.** 1956. Circulation 14:1035-1060
- Ley V., et al.** 1990. J. Exp. Med. 171:401-413
- Lombardero O.** 2000. Los nombres científicos de los parásitos y su significado. EUDEBA/Manuales
- Moreno S., et al.** Molecular Biology of The Fission Yeast *S. pombe*. pág. 800

- Ortega-Barria E., Pereira M.** 1991. Cell 67:411-21
- Polzansky G., et al.** 1980. J. Protozool, 27:37-54
- Ren-Jang Lin, et al.** 1998. Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein-specific. The Journal of Biological Chemistry. 273:5963-5969
- Ren-Jang Lin, et al.** 2000. Biochemical and genetic conservation of fission yeast Dsk1 and human SR Protein-Specific Kinase 1. Molecular and Cellular Biology, 20: 816-824
- Romaña C.** 1963. Enfermedad de Chagas. López Libreros Ed, Buenos Aires
- Rosebaum M. B.** 1964. Prog. Cardiovasc. Dis. 7:99-225
- Stojdl D. F., Bell J. C..** 1999. SR protein kinases: the splice of life. Biochem. Cell Biol. 77: 293-298
- Vickerman K.** 1994. International J. Parasitology. 24 (8):1317-1331
- Xiang-Dong Fu, et al.** 1994. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. Nature. Vol 369: 678-682
- Xiang-Dong Fu, et al.** 1994. Purification and characterization of a kinase specific for the serine and arginine pre-mRNA splicing factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:10824-10828
- Xiang-Dong Fu, et al.** 1998. SRPK2: A differentially expressed SR protein specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. The Journal of Cell Biology. 140:737-750
- Xiang-Dong Fu, et al.** 1999. Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:5440-5445
- Zingales B. and Colli W.** 1985. Curr. Top. Microbiol. Inmunol. 117:129-152

REFERENCIAS