Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio funcional de la familia de enzimas Aurora quinasa en Trypanosoma cruzi

Fassolari, Matías

2013-05-07

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Fassolari, Matías. (2013-05-07). Estudio funcional de la familia de enzimas Aurora quinasa en Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Fassolari, Matías. "Estudio funcional de la familia de enzimas Aurora quinasa en Trypanosoma cruzi". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-05-07.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio funcional de la familia de enzimas Aurora quinasa en *Trypanosoma cruzi*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Matías Fassolari

Director de Tesis: Dr. Guillermo D. Alonso

Consejero de estudios: Dr. Silvia Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres"

Buenos Aires, 2013

Dedicada a todos los que hicieron
posible que hoy pueda estar escribiendo
estas últimas palabras de mi Tesis Doctoral.
¡Muchas gracias!

A mis padres y hermanos.
Gracias por estar siempre a mi lado y por toda la ayuda brindada.

A Sandra.
Por ser mi otra mitad y por haberme dado lo más importante de mi vida, a Bruno.

A través de estas líneas deseo agradecer y brindar el merecido reconocimiento al Dr. Héctor N. Torres. Quien ha sido el responsable del inicio de esta línea de investigación, mostrando, como siempre lo hizo, una enorme pasión por las tareas que se desarrollaban dentro del laboratorio.

Guillermo Daniel Alonso

Estudio funcional de la familia de enzimas Aurora quinasas en *Trypanosoma cruzi*

Resumen

Las proteínas de la familia Aurora quinasa son un grupo de enzimas con gran relevancia en el proceso de división celular. Estas enzimas fueron descriptas en una gran variedad de organismos y han mostrado estar altamente conservadas en la evolución. El número de miembros de esta familia varía entre organismos y van desde uno en levaduras hasta tres en mamíferos. Entre los procesos donde están involucradas se destacan la maduración y división del centrosoma, condensación de la cromatina, ensamblado del huso mitótico, corrección de errores en la unión de los microtúbulos al cinetocoro e iniciación de la citocinesis. En este trabajo estudiamos tres Aurora quinasa (TcAUK1, -2 y -3) en *Trypanosoma cruzi*, determinando su organización génica y perfil de expresión a lo largo del ciclo de vida del parásito. También, se han iniciado los estudios funcionales de estas enzimas mediante experimentos de localización subcelular y sobreexpresión. De esta manera, se pudo determinar que las Aurora quinasa de *T. cruzi* están reguladas no tan solo a través de los niveles de proteína, sino también a través de su localización subcelular, y que la sobreexpresión de cada una de ellas conduce a alteraciones del ciclo celular y la curva de crecimiento.

Palabras clave:

Trypanosoma cruzi, Enfermedad de Chagas, Aurora quinasa, ciclo celular, citoquinesis.

Functional study of the family of Aurora kinases enzymes in *Trypanosoma cruzi*

Abstract

Aurora kinase protein family is a group of enzymes that play a key role during cell division. These enzymes were described in most of the studied organisms and have been shown to be highly conserved along evolution. The number of members of this family varied between organisms, ranging from one in yeast to three in mammals. Among the processes where they are involved, it is worth to mention, centrosome maturation and division, chromatin condensation, mitotic spindle assembly, control of kinetochore-microtubule attachments and initiation of cytokinesis. In this work, we study three Aurora kinases (TcAUK1, -2 and -3) in *Trypanosoma cruzi*, determining their genomic organization and gene expression profile throughout the life cycle of the parasite. Also, we have initiated functional studies of these enzymes by subcellular localization experiments and protein overexpression. Thus, it was found that Aurora kinases in *T. cruzi* are regulated not only by variation of their protein levels, but also through their subcellular localization. The overexpression of each of these enzymes leads to cell cycle disturbances and growth curve alterations.

Key words

Trypanosoma cruzi, Chagas disease, Aurora kinase, cell cycle, cytokinesis.

Abreviaturas

BLAST, Basic Local Alignment Search Tool

BSA, seroalbumina bovina

DAPI, 4',6-Diamidino-2-fenilindol

DTT, ditiotreitol

GFP, Green Fluorescent Protein

IPTG, isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosido

LB, medio Luria-Bertani

LIT, Liver InfusionTryptose (medio a base de triptosa e infusión de hígado)

BHT, Brain Heart Tryptose (medio a base de triptosa, infusión de corazón e infusión de cerebro)

PCR, Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo

E-64, trans-epoxysuccinil-L-leucil-amido-(4-guanidino) butano

SL, Spliced Leader

5' UTR, 5' untranslated region (region 5' no traducible)

3' UTR, 3' untranslated region (region 3' no traducible)

SDS, dodecil sulfato sódico

SFB, suero fetal bovino

TcAUK, Auora kinasa de *Trypanosoma cruzi*

X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

GST, Gluotation-S-transferasa

DIC, contraste de interferencia

Merge, superposición

NP-40, Nonidet P40

nt, nucéotidos

INTRODUCCIÓN 1
1. Enfermedad de Chagas 2
1.1. Etiología 2
1.2. Clínica 3
1.3. Epidemiología 5
2. Los Tripanosomátidos 7
2.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* 10
2.2. Aspectos biológicos generales de los Tripanosomátidos 12
2.3. El núcleo de los Tripanosomátidos 16
2.4. El citoesqueleto de los tripanosomátidos 18
2.5. Ciclo celular en Tripanosomátidos 21
3. Las proteínas Aurora quinasas 31
3.1. Aurora A 33
3.2. Aurora B 35
3.3. Aurora C 39
3.4. Proteínas Aurora quinasa en eucariotas inferiores 39
HIPOTESIS Y OBJETIVOS 42
MATERIALES Y MÉTODOS 43
1. Reactivos 44
1.1. Soluciones 44
1.2. Medios de cultivo 45
2. Herramientas moleculares 46
2.1. Cepas bacterianas 46
2.2. Cepas de levaduras 46
2.3. Líneas celulares de mamíferos 46
2.4. Vectores 46
2.5. Primers 47
2.6. Anticuerpos 48
3. Clonado de genes y expresión de proteínas recombinantes 48
3.1. Manipulación de bacterias 48
3.2. Manipulación de ácidos nucleicos 50
4. Técnicas analíticas 53

4.1. Ácidos Nucleicos 53
4.2. Proteínas 56
5. Cultivo de células 60
5.1. Células de mamíferos 60
5.2. Parásitos 60
6. Técnicas de biología celular 61
RESULTADOS 64
1. Búsqueda y detección de genes Aurora quinasa en T. cruzi 65
1.1. Identificación de los genes 65
1.2. Amplificación de los genes y confirmación de su identidad 67
2. Análisis de las secuencias de los genes TcAUKs 69
2.1. Estructura de dominios proteínas quinasas 69
2.2. Comparación de secuencias entre PKA y TcAUKs 70
2.3. Comparación de secuencia TcAUKs y genes Aurora de otros organismos 72
3. Organización genómica de los genes TcAUKs 78
4. Perfil de expresión de los genes TcAUKs 81
5. Estudio de la localización celular de las enzimas TcAUKs 85
5.1. Localización subcelular de TcAUK1 87
5.2. Localización subcelular de TcAUK2 98
5.3. Localización subcelular de TcAUK3 104
6. Estudio del fenotipo de sobreexpresión de las proteínas TcAUKs 108
6.1. Análisis funcional TcAUK1 108
6.2. Análisis funcional TcAUK2 119
6.3. Análisis funcional de TcAUK3 127
DISCUSIÓN 135
Bibliografía 146

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, endémica en el sur y centro del continente Americano donde hay registros de su existencia desde tiempos muy remotos [1]. Sin embargo, fue descubierta y descripta recién a principios del siglo XX por el físico brasilero Carlos Chagas, de aquí el nombre coloquial de Mal o Enfermedad de Chagas [2]. En este trabajo original C. Chagas describió en gran detalle tanto el ciclo de transmisión de la enfermedad como las manifestaciones clínicas agudas en humano.

1.1. Etiología

La Enfermedad de Chagas es una zoonosis transmitida a humanos, y a otras 150 especies de mamíferos, principalmente por grandes insectos reduvideos de la subfamilia Triatominae. De todas las especies pertenecientes a esta familia son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* los tres principales vectores que transmiten *T. cruzi* a humanos [3]. La preponderancia de la especie de insecto transmisora muestra una distribución geográfica más o menos definida, siendo *T. infestans* el principal transmisor en las regiones endémicas que se encuentran por debajo del Amazonas. Mientras que *R. prolixus* y *T. dimidiata* prevalecen como transmisores en la región norte de Sudamérica y América central [4]. La transmisión vectorial ocurre dentro de tres ciclos solapados: doméstico, peri doméstico y selvático [5]. Dentro de estos ciclos existen unidades ecológicas compuestas por mamíferos domésticos o silvestres y por insectos vectores silvestres, ambos infectados con *T. cruzi*. Esto hace que la transmisión continua del parásito esté asegurada independientemente de la presencia del ser humano.

Existen otras formas de transmisión del parásito que son independientes de insectos vectores. Principalmente encontramos a la transfusión sanguínea y a la vía congénita, ambas considerablemente menos frecuentes que la transmisión vectorial. Sin embargo, estas dos formas muestran una eficiencia de transmisión de la enfermedad relativamente baja (20% para las transfusiones y 1-5% las congénitas) en donde factores como concentración parasitaria, componentes de la sangre transfundida, estado inmunológico de la madre infectada, factores placentarios y cepa de *T. cruzi* determinan el grado de la eficiencia de transmisión [6, 7]. Por otro lado, cabe destacar que estas dos formas de transmisión son las principales vías de infección en zonas urbanas y en países no endémicos. Otra forma de transmisión del parásito, que es muy poco frecuente y se detectó sólo en la región Amazónica, es por la ingesta de comida o líquido (jugo de caña de azúcar, jugos frutales y carne poco cocida) contaminado con *T. cruzi* [8].

Cualquiera sea la vía de transmisión al ser humano, una vez ingresado el parásito todas las células nucleadas son potenciales blancos de infección. Con el desarrollo de una respuesta inmune, la parasitemia declina hasta concentraciones imperceptibles y la cantidad de parásitos en los tejidos disminuye considerablemente. Sin embargo, en la mayoría de los casos los parásitos no son

totalmente eliminados y persisten en tejidos específicos indefinidamente durante toda la vida del hospedador.

Figura 1. Imagen de un ejemplar de *Triatoma infestans* y de choza de adobe con techo de paja con corrales circundantes donde se produce los ciclos doméstico y peri doméstico de la Enfermedad de Chagas.

T. cruzi en realidad es una especie que consiste en un conjunto de cepas, poblaciones y aislados que circulan entre los mamíferos hospedadores y los insectos vectores. La heterogeneidad de cepas, las cuales generalmente muestran una distribución discreta, es una de las principales causas de la variaciones en las manifestaciones clínicas de esta enfermedad y las diferencias geográficas en morbilidad y mortalidad [9].

1.2. Clínica

La Enfermedad de Chagas puede dividirse en dos fases clínicas bien determinadas, y definidas por la presencia o ausencia de parasitemia. La fase inmediata a la infección es la fase aguda de la enfermedad, en la cual se puede detectar la presencia de parásitos mediante frotis sanguíneo. Mientras que una vez que la parasitemia es imperceptible se considera que se entra en la fase crónica de la enfermedad.

La fase aguda suele durar entre 4-8 semanas y en la mayoría de los infectados suele cursar de forma asintomática. En el caso que se desarrollen síntomas, estos suelen aparecer 1-2 semanas post-infección (en el caso de transmisión vectorial) o unos pocos meses después de la transfusión de sangre contaminada. Entre los síntomas que ocurren en este período se destacan: fiebre prolongada, malestar, hepatomegalia, esplenomegalia, polilinfoadenopatía, edema subcutáneo local o generalizado; y, en el caso de transmisión vectorial, la reacción cutánea en el sitio de la picadura del insecto infectado (chagoma) o la reacción de la conjuntiva ocular como consecuencia del contacto con el parásito (signo de Romaña). Es en esta fase donde la enfermedad es activamente tratada con drogas tripanosidas, y donde muchas veces se logra la cura de la infección aguda o se previene la aparición de manifestaciones crónicas de la enfermedad [3]. En el 90% de los casos esta fase remite espontáneamente, aún en individuos que no hayan recibido tratamiento con drogas [10]. Muchas características de la enfermedad, en cuanto al curso de la fase aguda,

cambian cuando la infección es por vía congénita. En este caso algunos síntomas suelen ser más severos e incluso pueden aparecer síntomas que rara vez ocurren en pacientes adultos, como complicaciones neurológicas [10].

El 60% de los individuos infectados nunca desarrollan manifestaciones clínicas en la fase crónica de la enfermedad, en lo que se denomina la forma indeterminada de la Enfermedad de Chagas. En el porcentaje restante de pacientes las manifestaciones clínicas aparecen muchos años después de la infección inicial [11], dando lugar a 3 formas de la fase crónica: cardíaca, digestiva y cardiodigestiva. La forma cardíaca es la más frecuente y grave manifestación de la fase crónica del Mal de Chagas, desarrollándose en el 20-30% de los individuos con serología positiva y el curso clínico puede variar desde síntomas leves, arritmias cardíacas, tromboembolismos hasta insuficiencia y falla cardíaca con muerte súbita [12]. La muerte súbita es la principal causa de muerte en los pacientes con la forma cardíaca de la Enfermedad de Chagas (2/3 del total de muertes), seguido por la falla cardíaca refractaria (15-30%) y los tromboembolismos (10-15%). La forma digestiva de la fase crónica de la enfermedad se observa casi exclusivamente en la región al sur de la Cuenca Amazónica, con una incidencia del 10-15%. En esta forma se observan tanto alteraciones funcionales como anatómicas, principalmente en el esófago y el colon. La patogénesis de las alteraciones en órganos digestivos se debe, en todos los casos, a denervación intrínseca del sistema parasimpático. En ambos casos, esófago y colon, las alteraciones clínicas son modificaciones en la movilidad peristáltica y agrandamiento de las viseras. La asociación de enfermedad cardíaca con megaesófago y/o megacolon define la forma cardiodigestiva de la Enfermedad de Chagas.

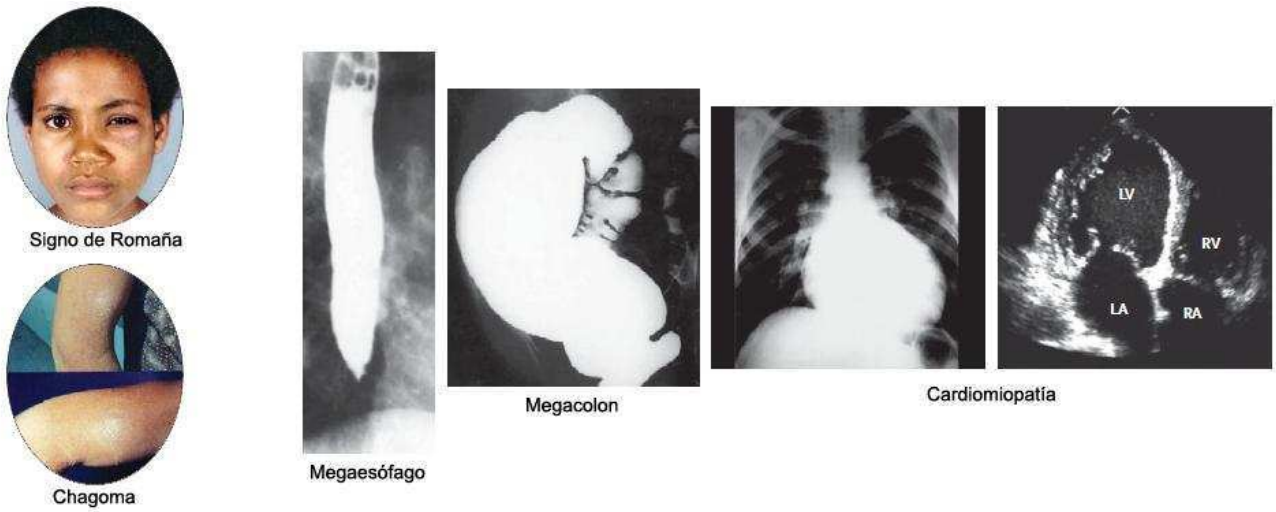


Figura 2. Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas. Síntomas de la fase aguda como el Signo de Romaña y el Chagoma. Imágenes radiográficas de manifestaciones crónicas como el megaesófago, megacolon y cardiomiopatía. Imagen ecográfica del corazón, donde se observan ambas aurículas (LA y RA) y ambos ventrículos (LV y RV) con sus cavidades dilatadas. Modificado de [8].

1.3. Epidemiología

Previo a la década de 1970 y 1980 la Enfermedad de Chagas poseía un patrón epidemiológico circunscripto a las regiones rurales en Latinoamérica, donde la transmisión de la enfermedad principalmente ocurría por vía vectorial. Con la masificación de la migración hacia las urbes que se produjo durante estas décadas la epidemiología de la enfermedad se modificó, principalmente porque la infección comenzó a transmitirse en las ciudades vía transfusión sanguínea. Para entonces la prevalencia de la infección en Latinoamérica era de 17 millones de casos, con 100 millones de personas (25% de la población total) en riesgo de contraer la infección; mientras que la incidencia de la enfermedad se estimaba en 700.00-800.00 nuevos casos por año, con una cantidad de muertes anuales por la forma cardíaca de la enfermedad que rondaba los 45.000 casos [13]. Los arriba explicitados son los primeros datos estadísticos exactos que se recolectaron en los países de la región, como parte de un estudio transnacional desarrollado entre 1980-85 que permitió dimensionar la prevalencia y la distribución de la Enfermedad de Chagas. Cabe destacar, sin embargo, que tanto la prevalencia como la incidencia y la mortalidad de la enfermedad sufren variaciones constantes como consecuencia de la migración, el efecto de los programas de control, y cambios en las condiciones socioeconómicas.

A partir de las estadísticas confeccionadas a principio de 1980, se establecieron distintas iniciativas regionales (Países del Cono Sur, Países Andinos, Países de América Central, Amazonia) con programas concretos para erradicar la enfermedad. Con este objetivo, los programas diseñados apuntan a eliminar la transmisión de la enfermedad por vía vectorial y por transfusión sanguínea. En el primer caso se busca interrumpir el ciclo doméstico y peri-doméstico de la transmisión de *T. cruzi* mediante el control químico de los insectos vectores, el mejoramiento habitacional y la educación en salud de la población. Para evitar la transmisión por transfusión sanguínea se desarrollaron e implementaron políticas para la detección serológica en las unidades transfusionales de los bancos sanguíneos.

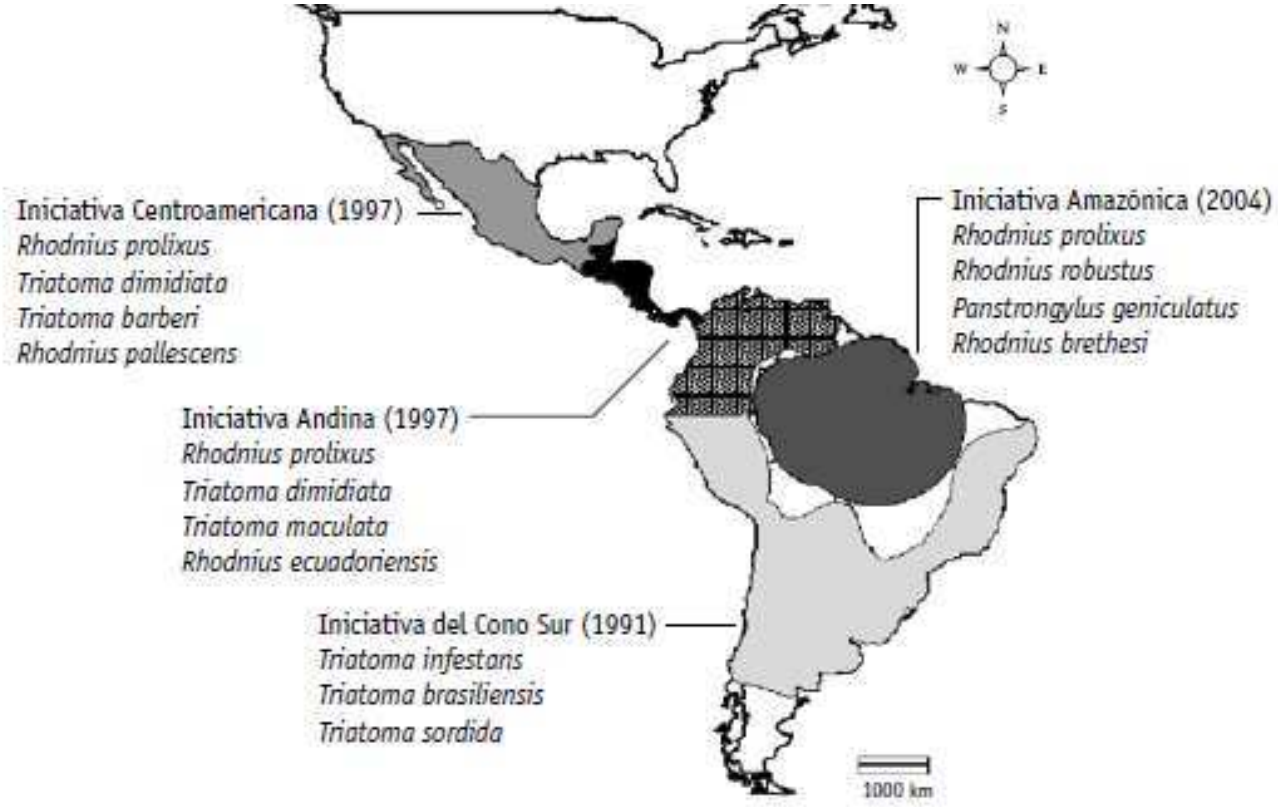


Figura 3. Mapa de iniciativas. Áreas geográficas de las distintas iniciativas regionales, donde se aplicaron programas interestatales conjuntos. Se detallan los principales vectores de cada región. Tomado de [14].

Como consecuencia de la implementación de las medidas de control, entre el período 1980-1985 y el año 2005 se observa una considerable reducción de la población infectada con *T. cruzi* (Tabla 1). Sin duda, uno de los mayores logros de la iniciativa de los países del Cono Sur fue la interrupción total de la transmisión vectorial intradomiciliaria en Uruguay (1997), Chile (1999) y Brasil (2006) [14]. También durante el período 1991-2006 hubo una notable reducción de la transmisión vectorial en regiones de Paraguay, Argentina, Bolivia y Perú. Mientras que en todos los países se logró una cobertura cercana al 100% en el monitoreo de las unidades transfusionales.

Tabla 1. Prevalencia de la infección por *T. cruzi* en humanos en Argentina y América Latina.

	Período 1980-85			**Año 2005**		
	Población en riesgo	**Porcentaje**	**Individuos infectados**	**Población en riesgo**	**Porcentaje**	**Individuos infectados**
Argentina	6.900.000	23	2.640.000	7.300.000	19	1.600.000
América Latina	99.895.000	25	17.395.000	28.000.000	20	7.694.000

La puesta en práctica de las iniciativas regionales modificó drásticamente el modelo epidemiológico de la enfermedad (Tabla 2). A modo de ejemplo, en Argentina la tasa media de transmisión domiciliaria paso de ser del 30% en 1980 a 1% en 2002. Lo que equivale a un 98 % de reducción de la infestación domiciliaria causada por el principal vector del país, *T. infestans*.

En la última década el incremento de la migración poblacional desde América Latina hacia países no endémicos produjo la dispersión de la infestación, principalmente por vía congénita y de transfusiones sanguíneas [15]. Esto llevó a que en países como Estados Unidos, Canadá y España se detectaran casos agudos de la enfermedad. Para enfrentar este problema, recientemente la Organización Mundial de la Salud lanzó la Red Global para la Eliminación de la Enfermedad de Chagas (GNChE), lo que refleja el grado de importancia que supone que la enfermedad haya sobrepasado los límites de la región endémica convirtiéndose en un asunto a ser atendido en todo occidente.

Tabla 2. Cambios en los parámetros epidemiológicos en América Latina, 1990-2006 [14].

Parámetro epidemiológico	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45.000	21.000	12.500
Nuevos casos anuales	700.000	200.000	41.200
Prevalencia (millones)	30	18	15
Población en riesgo (millones)	100	40	28
Distribución (países)	18	16	15

2. Los Tripanosomátidos

Los Tripanosomátidos son organismos protozoarios flagelados pertenecientes al Orden Kinetoplástida. Los organismos pertenecientes a este grupo se definen por la presencia de una organela característica, el kinetoplasto. A su vez, los organismos pertenecientes a este Orden pueden ser divididos, basándose en caracteres morfológicos y por el ciclo de vida, en dos subórdenes: Bodonina y Tripanosomatina. Los primeros incluyen dos familias de biflagelados (Bodonidae y Cryptobiidae) con gran variedad de estilos de vida, que van desde organismos de vida libre (*Bodo* y Dimastigella, entre otros) hasta parásitos de peces y caracoles (*Ichthyobodo* y *Cryptobia*, entre otros). El otro suborden (Tripanosomatina) comprende una única familia de organismos uniflagelados, Tripanosomatidae. Aquí, entre otros, se encuentran los tripanosomas y *Leishmania sp.*, parásitos obligados de gran importancia médica y veterinaria. Los Tripanosomátidos infectan toda clase de vertebrados y algunos invertebrados que actúan como organismos vectores. Los Tripanosomátidos cuyo ciclo de vida se restringe al parasitismo de invertebrados insectos reciben la clasificación de parásitos monogenéticos (*Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* y *Blastocrithidia*), mientras que los que alternan entre un insecto vector y

organismos vertebrados o plantas se denominan digenéticos (tripanosomas, *Leishmania sp.* y *Phytomonas sp.*) [16].

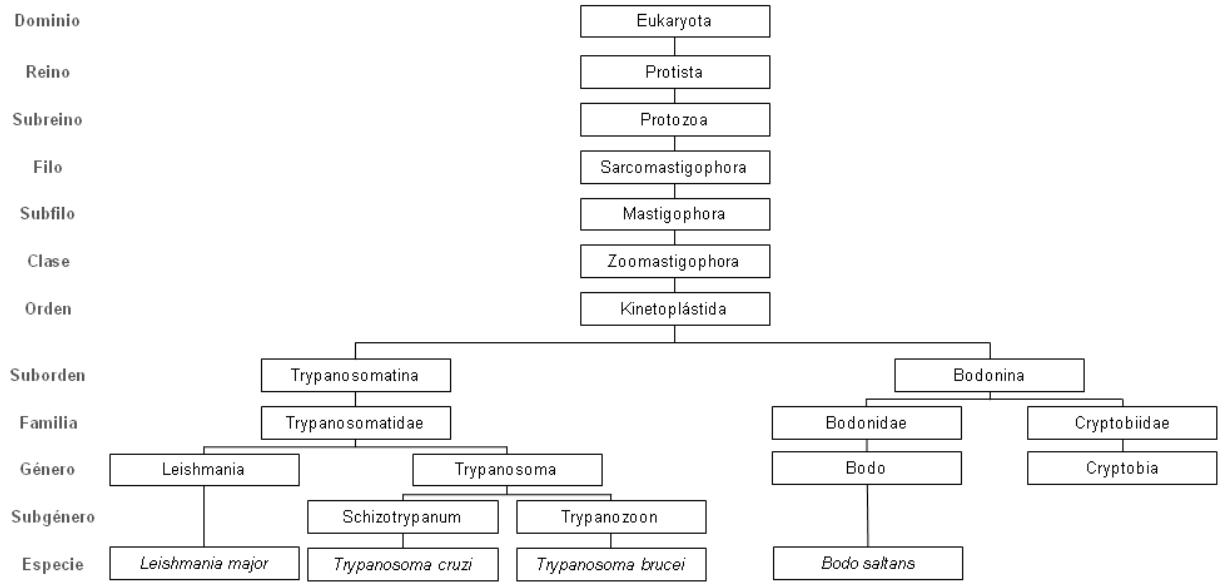


Figura 4. Ubicación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*. Dentro del género Tripanosoma también deben ser incluidos los subgéneros Megatrypanum (*T. theileri*), Tejeraia (*T. rangeli*), Dutonella (*T. vivax*), Nannomonas (*T. congolense*), Picomonas (*T. suis*).

La asignación de los organismos a distintos Géneros dentro de la Familia Trypanosomatidae fue desarrollada por Hoare y Wallace (1966) sobre la base de rasgos morfológicos. Estos estaban definidos por la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto y por la forma general del cuerpo celular. Como mínimo cada género posee dos tipos morfológicos, reflejo de la etapa del ciclo de vida y condiciones fisiológicas de las células. Algunos tipos morfológicos son exclusivos de un único Género, mientras que otros son compartidos por distintos Géneros. En la Figura 5 se esquematizan los distintos tipos morfológicos de esta Famili, detallando los Géneros a los cuales pertenecen. En total los tipos morfológicos descriptos son seis, cada cual mostrando rasgos estructurales particulares:

- Choanomastigote: el borde del bolsillo flagelar se extiende en forma de collar alrededor del flagelo.
- Amastigote: célula redonda con un flagelo de poca longitud que no protruye fuera del bolsillo flagelar.
- Ophistomastigote: posee un flagelo que corre desde el extremo posterior en un bolsillo flagelar prolongado y estrecho, atravesando la célula y emergiendo en el extremo anterior.
- Promastigote: célula ahusada en la que el flagelo emerge desde el extremo anterior. El kinetoplasto se encuentra próximo al extremo anterior y distante del núcleo.

- Epimastigote: célula ahusada en la cual el cuerpo basal del flagelo y el kinetoplasto se encuentran localizados adyacentes al núcleo. El flagelo emerge de un bolsillo flagelar próximo al centro de la célula y se asocia a la membrana hasta quedar libre.
- Tripomastigote: célula ahusada con el cuerpo basal y el kinetoplasto localizados en el extremo posterior de la célula, por detrás del núcleo. El flagelo emerge desde un bolsillo flagelar muy corto y corre a lo largo de la célula asociado a la membrana.

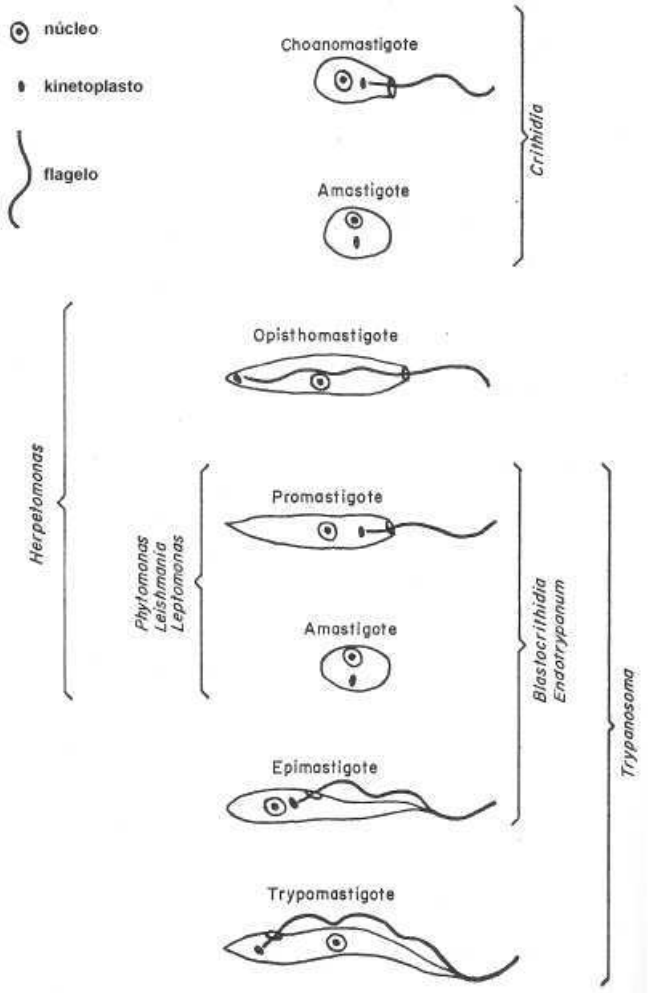


Figura 5. Tipos morfológicos que adoptan los Géneros de la Familia Trypanosomatidae. Se esquematizan las formas celulares de los distintos tipos morfológicos adoptados por cada Género. Tomado de [17].

Los tripanosomas también se clasifican en dos grupos según el curso de desarrollo que siguen dentro del insecto vector. Están los tripanosomas que completan su desarrollo en el intestino del insecto y luego son transmitidos al mamífero por las heces contaminadas; mientras que, por otro lado están los tripanosomas que completan su desarrollo en las glándulas salivales del vector y son transmitidos al hospedador vertebrado por inoculación con la saliva durante la picadura. El primer grupo se denomina Stercoraria e incluye a *Trypanosoma cruzi*, mientras que el segundo grupo se

llama Salivaria e incluye a *Trypanosoma brucei* [17]. Esta no es la única diferencia en el ciclo de vida entre los tripanosomas. *T. cruzi* adopta una tipo morfológico que se aloja dentro de las células del hospedador mamífero en donde es capaz de reproducirse, y esto lo ubica dentro del Subgénero Schizotrypanum. En cambio, *T. brucei* no posee ningún estadio intracelular durante su ciclo vital sino que se reproduce libre en la circulación sanguínea del hospedador mamífero [18]. Por consiguiente, si bien *T. cruzi* y *T. brucei* pertenecen al mismo Género, las diferencias en el desarrollo de sus respectivos ciclos de vida se traduce en variaciones considerables en distintos aspectos de la biología de los mismos.

En *T. cruzi* es bien conocida la existencia de la diversidad en el genoma y la multiplicidad de genotipos y fenotipos. Estudios de evolución y genética molecular establecieron seis grupos distintos de la especie *T. cruzi*. Estos grupos reciben el nombre de unidades discretas de tipificado (DTU, de sus siglas en inglés), que describen a grupos de reservorios que son genéticamente más similares entre sí que con cualquier otro reservorio y son identificables por la presencia de marcadores moleculares comunes. De este modo, *T. cruzi* se subdivide en seis DTUs que van desde TcI a TcVI [19, 20]. La pronunciada heterogeneidad de los aislados naturales de TcV y TcVI sugiere que estos DTUs son híbridos y que derivaron de TcII y TcIII. El resto de los DTUs, TcI, TcII, TcIII y TcIV poseen predominancia de alelos homocigotas [21].

2.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi adquiere distintas etapas de desarrollo durante su complejo ciclo de vida. Mediante técnica de teñido con Giemsa y observación por microscopía óptica es posible distinguir con relativa facilidad las tres formas principales del parásito [2]: (1) Amastigote, forma redonda con un flagelo de corta longitud que no sobresale del bolsillo flagelar y el kinetoplasto anterior al núcleo. Esta forma es replicativa y se encuentra dentro de las células del hospedador mamífero. (2) Tripomastigote, forma ahusada de 25 µm de longitud con el kinetoplasto ubicado posterior al núcleo. Esta forma es la infectiva (no replicativa) y puede ser observada en (i) el intestino posterior, heces y orina del insecto vector, (ii) en las células y torrente sanguíneo del hospedador mamífero, (iii) en la fase estacionaria de crecimiento de un cultivo axénico, y (iv) en el sobrenadante de cultivo de células de mamíferos infectadas. A su vez, los tripomastigotes pueden ser subdivididos en sanguíneos (son los que se diferencian a partir de los amastigotes intracelulares) y metacíclicos (son los que provienen de la diferenciación de los epimastigotes a través de un proceso denominada metaciclogénesis). (3) Epimastigote, forma ahusada de 20-40 µm de longitud con el kinetoplasto ubicado anterior al núcleo. Esta forma replicativa se observa durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos axénicos y en el intestino del insecto vector.

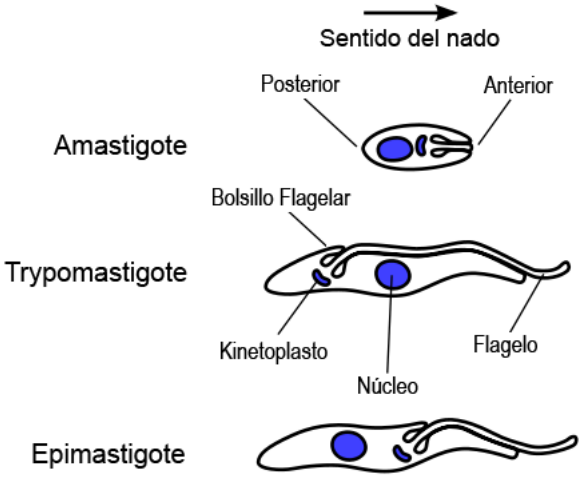


Figura 6. Esquema de las tres principales formas que adopta *T. cruzi* durante su ciclo de vida. El sentido del nado es lo que determina la polaridad de la célula, siendo su extremo anterior el que se corresponde con el movimiento hacia adelante. Se marcan las estructuras cuyas modificaciones definen a las distintas formas del parásito: flagelo, núcleo, kinetoplasto y bolsillo flagelar.

El ciclo de vida de este organismo se puede describir de la siguiente manera (Figura 7). Un vector hematófago que porta al parásito se alimenta de un mamífero no infectado. Mientras se alimenta, el insecto excreta las heces con tripomastigotes (1). Como consecuencia del prurito debido a la picadura el mamífero se rasca e hace ingresar a los parásitos a su torrente sanguíneo, a través de la lastimadura producida por la picadura. Una vez en la circulación sanguínea, los tripomastigotes ingresan a las células del mamífero y se diferencian a la forma amastigote (2). Los amastigotes se dividen repetidas veces por fisión binaria hasta alcanzar una gran densidad (3) y, entonces se diferencian a tripomastigotes. El movimiento de los mismos, sumado a la alta densidad en que se encuentran, provoca la ruptura de la célula hospedadora y los parásitos son liberados al torrente sanguíneo, desde donde pueden ingresar a otras células y así propagar la parasitemia (4). Si un insecto vector que no porta parásitos, se alimenta de un mamífero infectado, junto con la sangre ingerirá también tripomastigotes (5). Cuando estos llegan al estómago del insecto se diferencian a la forma epimastigote (6), que una vez en el intestino se dividen repetidas veces por fisión binaria (7). Son estos epimastigotes que al llegar al recto del insecto vuelven a diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos, y así cerrar el círculo del ciclo de vida de este parásito (8).

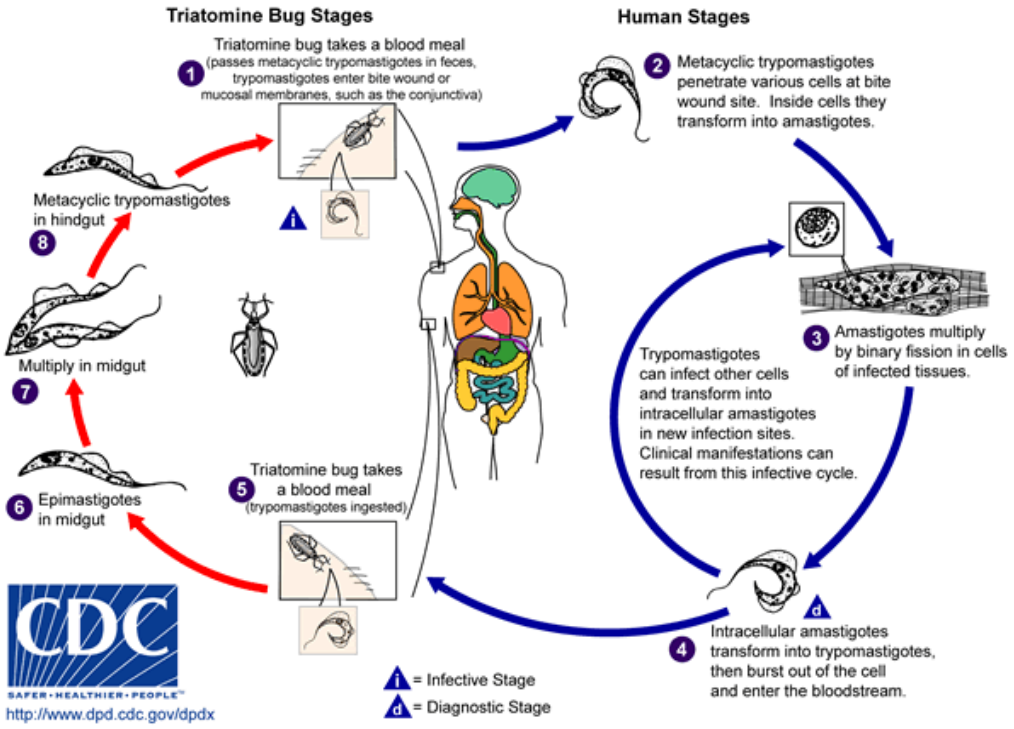


Figura 7. Esquema del ciclo de vida del protozoo *T. cruzi*. Los números se corresponden con los del texto.

2.2. Aspectos biológicos generales de los Tripanosomátidos

durante El estilo de vida los Tripanosomátidos alternan entre entornos muy disímiles con transiciones temporalmente acotadas, esto hace que estos organismos compartan características biológicas particulares que no se observan en ningún otro eucariota. Estas características van desde organelas y estructuras celulares especiales hasta novedosos procesos metabólicos y formas alternativas de mecanismos de regulación. A continuación serán descriptas aquellas organelas y estructuras comunes a los Tripanosomátidos, y luego se realizará un detalle de los rasgos distintivos de los procesos metabólicos que se dan en estos organismos. A su vez, en cada uno de estos apartados se destacaran las particularidades distintivas que presenta *T. cruzi* respecto a los demás Tripanosomátidos.

2.2.1. Organelas y estructuras celulares

Las células tripanosomátidas se caracterizan por poseer un único flagelo que nace en una estructura similar a los centrosomas de las células de mamíferos, y que se denomina cuerpo basal. El flagelo emerge de la célula a través de una región especializada de gran importancia estructural y metabólica, denominada bolsillo flagelar (FP, de sus siglas en inglés). Otra peculiaridad de estos organismos es que poseen una única mitocondria de gran tamaño y que se extiende por todo el cuerpo celular, por lo que se la conoce con el nombre de mitocondrion [22].

Como organismos pertenecientes al Orden Kinetoplastida, los Tripanosomátidos se identifican por la presencia del kinetoplasto. Esta estructura se encuentra dentro de la matriz de la mitocondrion, en las cercanías del cuerpo basal. Estructural y molecularmente el kinetoplasto es un arreglo complejo de fibrillas de ADN circular fuertemente compactado y entrelazado (K-DNA) [23]. Dos tipo de subestructuras pueden ser identificadas en el kinetoplasto: los minicírculos y los maxicírulos, cada uno compuesto por una única molécula de ADN [24]. Los maxicírculos poseen entre 20 a 40 Kbp y se encuentran unas pocas docenas de idénticas copias por cada kinetoplasto. Los minicírculos están presentes en varios miles de copias por kinetoplasto, poseen un tamaño que varía entre 0,5 y 10 kb (dependiendo de la especie) y son heterogéneos en sus secuencias [25]. El número de minicírculos y maxicírculos, e incluso la longitud de los mismos, son rasgos característicos y exclusivos de cada especie de Kinetoplástido. En *T. cruzi* el K-DNA representa entre el 20 y el 25% del ADN total de la célula y consiste en una red de 20.000-30.000 minicírculos asociados entre ellos y con moléculas lineales largas, junto con unas pocas docenas de maxicírculos. El rango de tamaños de los minicírculos va desde 0,5 a 2,5 kb, mientras que los maxicírculos poseen un tamaño que varía entre 20-40 Kbp [26]. Asociadas al ADN del kinetoplasto también se encuentran proteínas que participan en distintos procesos que se producen en esta organela, entre las que se destacan: topoisomerasa tipo II, ADN polimerasa, *minicircle originbinding protein*, proteínas condensadoras del K-DNA, proteínas asociadas a kinetoplasto, una *nicking enzyme*, proteínas *heat shock* mitocondriales, y un grupo de proteínas de unión al kinetoplasto [27].

Los peroxisomas en tripanosomátidos son organelas con estructura esférica y matriz homogénea que se encuentran esparcidas en forma aleatoria por toda la célula [28]. En tripanosomátidos digenéticos (*T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania*) el peroxisoma muestra resultados negativos en ensayos enzimáticos y citoquímicos para la detección de la enzima catalasa, proteína que es marcador molecular de esta organela en todas las restantes células eucariotas. Otro rasgo distintivo de esta organela en tripanosmátidos es la presencia en la misma de las enzimas glucolíticas involucradas en la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato [29], enzimas que en el resto de los eucariotas se localizan en el espacio citoplasmático. Debido a este rasgo diferencial, los peroxisomas de los tripanosomátidos son conocidos con el nombre de glicosomas. La concentración de vías metabólicas que en otras células ocurren en el citoplasma (fijación de CO_2, rescate de purinas y biosíntesis *de novo* de pirimidinas) es también un rasgo característico del glicosoma de los tripanosomátidos [29].

Otro componente vacuolar localizado por todo el citoplasma de los tripanosomátidos es una estructura electron-densa denominada acidocalcisoma, denominación otorgada por su capacidad de transportar protones y calcio [30]. Estas organelas actúan como reservorios de calcio, sodio, potasio, zinc, hierro y compuestos fosfóricos. También se encuentran involucradas en procesos como la homeostasis del pH y la osmorregulación, esto último en íntima asociación con la vacuola

contráctil. Esta última estructura está formada por ramificaciones tubulares conectadas a una vacuola central que generalmente está ubicada cerca del bolsillo flagelar. Tanto el acidocalcisoma como la vacuola contráctil de epimastigotes de *T. cruzi* poseen en su membrana la proteína aquoporina, un transportados de agua involucrado en el proceso de osmorregulación [31].

El bolsillo flagelar es una estructura de suma importancia para la biología de los tripanosomátidos. Esta estructura es de total relevancia en dos rasgos biológicos separados, uno es a nivel metabólico y otro a nivel morfológico. En este apartado será explicitada su relevancia en el metabolismo de la célula, mientras que su importancia en la morfología será tratada más adelante. Esencialmente el bolsillo flagelar es una depresión en la parte anterior de la célula por donde emerge el flagelo [32]. Esta región es la única en toda la célula donde la membrana plasmática no se encuentra revestida internamente por la capa de microtúbulos denominada corset subpelicular. Es esto lo que permite que la región del bolsillo flagelar sea el único lugar por donde la célula realice el intercambio de sustancias con el medio extracelular. La vía secretoria en *T. cruzi* comprende al retículo endoplásmico, el complejo de Golgi y un sistema de vesículas que salen de las cisternas del Golgi y migran hacia el bolsillo flagelar, donde se fusionan con la membrana y liberan su contenido. La internalización de macromoléculas en tripanosomátidos, al igual que en el resto de los eucariotas, se da por vía endocítica. La actividad endocítica en estos parásitos se encuentra restringida sólo a la región del bolsillo flagelar. Lo que varía entre las distintas especies de tripanosomátidos es si la internalización se produce en forma global dentro del bolsillo flagelar o, como sucede en epimastigotes de *T. cruzi*, se produce a través de una invaginación de la membrana que recibe el nombre de citostoma-citofaringe. Independientemente del lugar físico por donde se produzca la endocitosis, el mecanismo se conserva en todos los tripanosomátidos. Una vez que las macromoléculas se unen a la membrana son rápidamente internalizadas en pequeñas vesículas endocíticas, que luego se fusionan unas con otras para formar una estructura tubular formando el equivalente a los endosomas tempranos de otras células eucariotas. El destino final de todas las macromoléculas internalizadas son unas estructuras vesiculares esféricas localizadas en la parte posterior de la célula, que reciben el nombre de reservosomas [33]. Esta organela posee una matriz ácida donde se detectan tanto proteínas como inclusiones lipídicas. El componente proteico está compuesto por enzimas como proteasas e hidrolasas lisosomales, por lo que estas organelas son consideradas el principal sitio de degradación y regulación proteica.

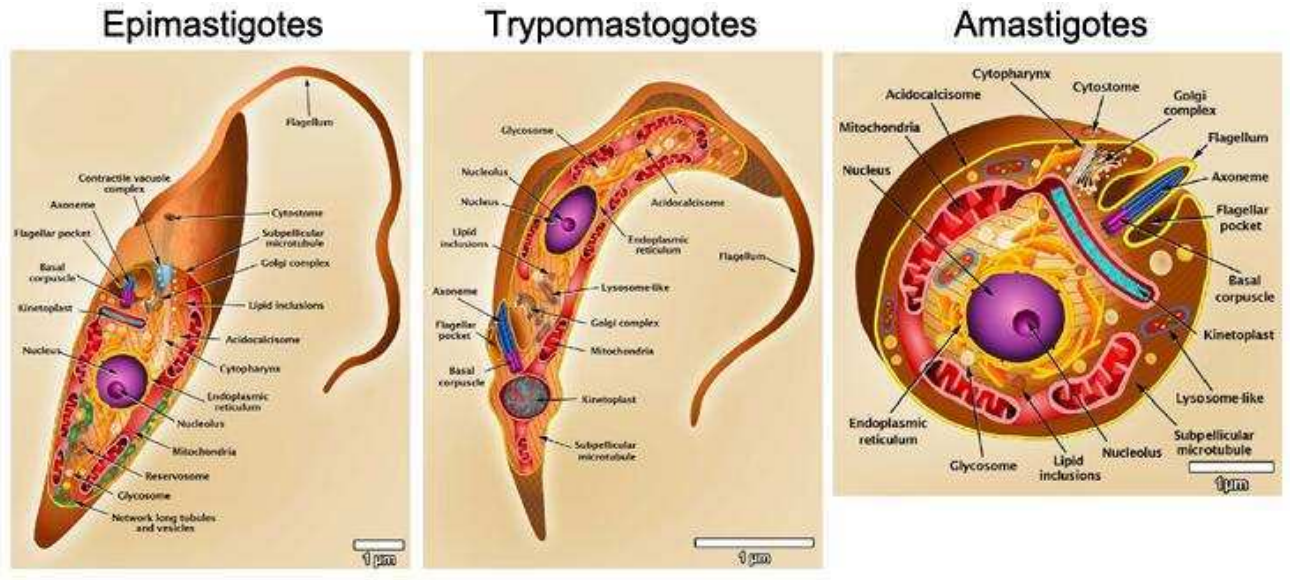


Figura 8. Gráfico de las tres principales formas que adopta *T. cruzi* durante su ciclo de vida, identificando todas las organelas y estructuras presentes en estas células. Tomado de [34].

Organelas y estructuras como el núcleo, el citoesqueleto y el flagelo serán descriptos con gran detalle en apartados venideros debido a la relevancia que poseen para el desarrollo y la explicación de los resultados obtenidos en este trabajo.

2.2.2. Procesos genéticos en Tripanosomátidos

Los maxicírculos del kinetoplasto son considerados homólogos al ADN mitocondrial del resto de las células eucariotas, en el sentido en que codifican para los típicos genes mitocondriales como son los ARNr y distintos componentes proteicos de la cadena respiratoria. Sin embargo, algunos genes codificantes de proteínas tienen la particularidad de estar encriptados dentro de la secuencia de los maxicírculos. Para transformarse en genes codificantes funcionales sufren una modificación post-transcripcional que consiste en inserciones/deleciones de residuos de uridina, proceso conocido como edición del ARN. En este proceso participan unos pequeños ARN guías (ARNg) que son codificados mayoritariamente por los minicírculos. El proceso de edición consiste en una serie de pasos de ligación y clivaje mediados por enzimas, con los sitios específicos de edición determinados por el apareamiento de bases entre el ARN a ser editado y el ARNg afín. De este modo, el mecanismo de edición es capaz de corregir marcos de lectura, crear codones de inicio de la traducción y, en el caso de la edición masiva, convertir genes encriptados en ARNm traducibles [35].

Otro rasgo distintivo de los tripanosomátidos es el mecanismo de la expresión génica. Los marcos abiertos de lectura en Kinetoplástidos se encuentran organizados en largos arreglos que son transcriptos como ARN precursores policistrónicos (unidades transcripcionales) [36], que luego son procesados por *trans-splicing* (que se produce de forma cotranscripcional) y poliadenilación para

generar ARNm individuales [37]. La regulación de la expresión génica en estos organismos se da a nivel post-transcripcional, siendo la única excepción los genes que codifican las principales proteínas de superficie en *T. brucei* (EP y VSGs) y otros genes de la misma unidad transcripcional [38]. Durante el proceso de *trans-splicing* un pequeño fragmento de ARN de 39 ntd denominado *Spliced Leader* (SL), que lleva un *cap* trimetilo, es agregado al extremo 5' del ARNm. El sitio aceptor para el SL es un dinucleótido AG ubicado inmediatamente *downstream* a un tracto de polipirimidina [37]. El sitio de poliadenilación se ubica entre 100-300 ntd *upstream* de la señal de *trans-splicing* del gen adyacente *downstream*. La poliadenilación de un gen depende del correcto *splicing* del gen inmediatamente *downstream*, impidiéndose de esta forma la regulación independiente del procesamiento de genes adyacentes. La eficiencia constitutiva de la señal de *splicing* depende de la longitud y composición del tracto de polipirimidinas y de secuencias en el 5'-UTR [39, 40]. Los mecanismos de la regulación post-traduccional de la expresión génica en tripanosomátidos no están del todo dilucidados. Sin embrago, sí está claro que sucede a nivel de la estabilidad del ARNm, la regulación del comienzo de la traducción y la estabilidad de la mismas proteínas recién traducidas [41].

2.3. El núcleo de los Tripanosomátidos

2.3.1. Organización de la cromatina

Con el advenimiento de la era genómica se desarrollaron una gran cantidad de Proyectos Genomas para distintos organismos eucariotas, incluyendo entre estos a los tripanosomátidos. Así, en el año 2005 fue completada la secuenciación del genoma de *T. brucei* [42], *T. cruzi* [43] y *Leishmania major* [44]. Los tripanosomátidos son organismos diploides. *T. cruzi* posee un genoma de tamaño haploide de entre 43-50 megabases, que se reparten entre 30 a 40 cromosomas [45]. El número exacto de cromosomas todavía no se determinó, así como existen otras imprecisiones en cuanto a otros rasgos del genoma de este organismo. La cepa elegida para la realización del Proyecto Genoma de *T. cruzi* fue CL Brener, un miembro del linaje TcVI que es un híbrido entre los linajes TcII y TcIII (el cual a su vez parece ser un híbrido derivado de TcI). Debido a esto, *T. cruzi* es heterocigoto en la mayoría de los *loci*, con pares de cromosomas homólogos de distinto tamaño [43]. Esto, junto a la alta proporción de secuencias repetitivas presentes en el genoma de *T. cruzi* (20-40%), hicieron muy complejo el análisis y el ensamblaje de los *contigs* para el armado final del genoma de *T. cruzi*. El resultado es que hoy día todavía no se pudo obtener una lectura acabada y precisa de la composición genética y organización génica en este parásito.

El genoma de los tripanosomátidos está organizado en largos y discretos *clusters* de genes (DGCs, de sus siglas en inglés), que contienen decenas de genes codificantes de proteínas dispuestos en una orientación cabeza/cola. Las regiones que separan DGCs adyacentes se denominan regiones de cambio de hebra (SSRs, de sus siglas en inglés), y pueden ser tanto convergentes (DGCs con

genes orientados hacia el SSR) como divergentes (DGCs con genes orientados en sentido contrario al SSR). Aunque se sabe que la transcripción de los genes de los DGCs es policistrónica, todavía no se ha podido determinar la existencia de secuencias específicas para la iniciación o terminación de la transcripción [46]. Existen indicios y distintas evidencias indirectas que atribuyen a las SSRs divergentes como sitios de iniciación de la transcripción, mientras que las SSRs convergentes serían sitios de terminación de la transcripción [47].

La unidad básica de compactación de la cromatina en tripanosomátidos, al igual que en todos los eucariotas, es el nucleosoma. Este está conformado por el típico octámero de histonas (formado por dos unidades de H2A, H2B, H3 y H4), con H1 actuando como la histona *linker* de los nucleosomas [48]. Por otra parte, las histonas de tripanosomátidos presentan en su extremo N-terminal una gran divergencia respecto a las histonas de levaduras y mamíferos, y la histona H1 no presenta su dominio globular y sólo conserva el extremo N-terminal de la H1 de humanos [49]. Por microscopía electrónica en núcleos interfásicos de *T. brucei* y *T. cruzi* es posible diferenciar claramente áreas con distinta electrodensidad en el nucleoplasma [50, 51]. El material electrondenso se localiza en *clusters* en la periferia nuclear. La cromatina en tripanosomátidos en forma global se encuentra empaquetada más laxamente que la cromatina de mamíferos [52]. Los cromosomas no pueden ser distinguidos bajo microscopía debido a que no se condensan hasta individualizarse en ningún estadio de su ciclo de vida. A pesar de esto, la distribución de la cromatina en tripanosomátidos no es igual en todas las etapas del ciclo de vida.

2.3.2. Dinámica del núcleo y la cromatina

El núcleo como organela muestra un cambio en su morfología entre las formas replicativas (epimastigote y amastigote) y la forma infectiva (tripomastigote). En los primeros posee una forma esférica, mientras que en tripomastigotes adquiere una forma alargada con su eje principal paralelo al eje longitudinal de la célula. Por otra parte, la variación en la localización relativa que adopta el núcleo respecto al kinetoplasto entre las distintas formas del ciclo de vida se debe a la migración de ésta última organela, mientras que el núcleo permanece estático [53].

Distintos trabajos han demostrado que la cromatina de *T. cruzi* es una estructura dinámica con regiones que alternan el grado de condensación ante distintas condiciones. Spadiliero y colaboradores, en dos trabajos [54, 55] y dos enfoques distintos, demostraron que epimastigotes en fase exponencial de crecimiento muestran una cromatina más laxa que epimastigotes de fase estacionaria y tripomastigotes. También demuestran que la histona H1 se encuentra más débilmente unida al nucleosoma que en células eucariotas superiores y, en parte a esto, adjudican el grado de compactación más laxa que muestran los tripanosomátidos en general, en concordancia con trabajos similares realizados en *T. brucei* [56]. En un estudio más profundo, que abarcaba todas las formas de desarrollo de *T. cruzi*, se demostró que durante el proceso de

diferenciación de las formas replicativas a la forma infectiva el núcleo sufre una extensiva reorganización. El nucléolo se desensambla y la heterocromatina, que en las formas replicativas se localiza en la periferia nuclear, se extiende por todo el nucleoplasma a la par que el núcleo se alarga. El cambio del estado cromatínico entre las distintas formas se correlaciona con los niveles de transcripción en cada una de ellas. Las formas replicativas, donde la heterocromatina se encuentra confiscada en la periferia nuclear, muestran mayores niveles de transcripción respecto a la forma tripomastigote donde el núcleo es altamente heterocromatínico [50]. El posicionamiento de los cromosomas en epimastigotes de *T. cruzi* también se modifica durante el ciclo celular. Durante la fase G1 los cromosomas se encuentran esparcidos por todo el nucleoplasma, mientras que durante las fases S y G2/M se ubican en la periferia del núcleo. Este reacomodamiento está relacionado con el proceso de replicación. La síntesis de ADN se produce en la periferia nuclear y los cromosomas recién sintetizados migran hacia la región central del núcleo para adoptar la disposición de la cromatina característica de G1. En la forma tripomastigote, el estadio no replicativo del parásito, los cromosomas se localizan esparcidos por todo el volumen del núcleo [57].

En mamíferos y otras células eucariotas la estructura de la cromatina y todos los procesos llevados a cabo en el núcleo están determinados por las histonas y las modificaciones post-traduccionales que les ocurren, principalmente en sus extremos N-terminal [58]. En tripanosomátidos también se ha demostrado la existencia de modificaciones post-traduccionales de las histonas, y el rol que estas cumplen en determinados procesos celulares [59]. Incluso en estos organismos se han descriptos modificaciones de histonas nunca antes reportadas en otros eucariotas [60]. En forma complementaria a la modificación de las histonas, en la regulación de los procesos nucleares también están involucradas proteínas denominadas “variantes de histonas”. Son proteínas con una secuencia similar a las histonas canónicas, pero codificadas por genes diferentes. Estas proteínas reemplazan a su correspondiente canónica dentro del nucleosoma para cumplir funciones exclusivas en procesos nucleares determinados. En tripanosomátidos sólo se ha detectado una única variante de las histonas H2A, H2B y H3. Mientras que la variante de H2A parece ser el homologo a H2A.Z, las variantes de H2B y H3 son específicas de tripanosomátidos [48]. A pesar de haber identificado estas variantes de histonas en tripanosomátidos, a la fecha no se ha descripto el involucramiento de estas en algún proceso celular.

2.4. El citoesqueleto de los tripanosomátidos

Los organismos tripanosomátidos se caracterizan por adoptar morfologías bien definidas y específicas en distintas fases de su ciclo de vida. A pesar de esta variación, todos los tipos celulares comparten estructuras citoesqueléticas de gran importancia para la biología de estos organismos.

La forma y la silueta de las células se encuentran determinadas por la presencia de un arreglo de microtúbulos que subyacen a la membrana plasmática. Este arreglo recibe el nombre de corset subpelicular y estructuralmente es una lámina de microtúbulos regularmente espaciados, interconectados entre sí y con la membrana plasmática por medio de cortos filamentos de naturaleza incierta [27]. Es este corset el que le otorga la rigidez necesaria a estas células para poder afrontar los cambios de condiciones físico-químicas del entorno variable al cual se exponen. Sin embargo esto, el corset subpelicular no es una estructura del todo rígida, sino que por el contrario posee la flexibilidad necesaria como para permitir que las células sufran el cambio morfológico que se observa durante el proceso de diferenciación. Esta flexibilidad viene otorgada por el hecho de que los microtúbulos del corset muestran una longitud variable, y en el punto donde un microtúbulo finaliza se observa la continuidad de los que se encuentran inmediatamente adyacentes. Esto produce un patrón de interdigitación que permite los cambios morfológicos que se dan en la longitud de las células sin que se produzcan regiones débiles en el arreglo cortical [61]. El corset subpelicular se mantiene intacto durante la división celular. Para que cada célula hija reciba el número exacto de microtúbulos que conforman esta estructura, nuevos microtúbulos son agregados durante el ciclo celular e intercalados con los ya existentes. Para el momento en que la célula se divide, un corset completo es heredado en forma semiconservativa durante la citoquinesis [62].

El corset subpelicular, que abarca casi la totalidad del cuerpo celular, sólo se ve interrumpido en la región de la base del flagelo. El esqueleto del flagelo está formado por un axonema, con la estructura típica de nueve dobletes externos rodeando a un par central de microtúbulos (9+2), y una estructura filamentosa que se encuentra unida a éste. Este filamento se denomina *Paraflagellar Rod* (PFR) y se encuentra físicamente interconectado con el axonema a través de numerosos filamentos [28]. El PFR está compuesto por un gran número de proteínas, de las cuales muy pocas fueron caracterizadas. Entre estas se encuentran las dos proteínas mayoritarias, denominadas PFR 1 y 2, con pesos moleculares respectivos de 73 y 79 kDa y naturaleza altamente antigénica [28]. Aunque se sabe que el PFR es necesario para la normal motilidad del flagelo [63], hasta la fecha la función exacta de esta estructura no fue del todo dilucidada. El flagelo nace a partir de una estructura denominada cuerpo basal (BB), al cual se encuentra anclado. Cercano y en paralelo al cuerpo basal se encuentra el pre-cuerpo basal, con estructura idéntica al BB, y del cual va a surgir el nuevo flagelo cuando la célula comience a dividirse [64]. El cuerpo basal y el pre-cuerpo basal se encuentran físicamente conectados, y ambos a su vez también lo están con el kinetoplasto. Esta conexión se da a través de un complejo denominado *Tripartite Attachment Complex* (TAC), compuesto por: un sistema de filamentos que van desde el extremo proximal del cuerpo basal hasta la membrana mitocondrial externa adyacente, otro sistema de filamentos que unen una de las caras del kinetoplasto con la membrana mitocondrial interna, y una región de la

membrana mitocondrial ubicada entre el cuerpo basal y el kinetoplasto que muestra un perfil lineal sin crestas [65]. En el espacio comprendido entre el cuerpo basal y el pre-cuerpo basal nace un grupo de cuatro microtúbulos especializados, denominado *Microtubule Quartet* (MtQ) [66], que atraviesa el bolsillo flagelar para insertarse entre los microtúbulos del corset subpelicular [64]. En su sitio de nucleación, el MtQ se encuentra físicamente interconectado con el cuerpo basal y el pre-cuerpo basal. En aquellas formas del parásito en donde el flagelo emerge desde el lateral de la célula, como ocurre en epimastigotes y tripomastigotes, una porción importante de éste permanece unido al cuerpo celular a través de una región denominada *Flagellum Attachment Zone* (FAZ) [62]. LA conformación del FAZ comprende la participación de estructuras presentes tanto en el cuerpo celular como en el lumen del flagelo, que forman una especie de costura en el corset subpelicular del cuerpo celular. Del lado del cuerpo celular está constituido por el MtQ y una estructura filamentosa exclusiva de esta zona, que se encuentra inmersa dentro del corset subpelicular. Por el lado del flagelo se observan unos elementos filamentosos que conectan el PFR con la membrana flagelar [67]. A su vez, en esta zona las membranas del flagelo y el cuerpo celular se encuentran unidas a través de uniones tipo *macula adherens*, cerrando de esta forma todo el sistema de interconexión entre el flagelo y el cuerpo celular.

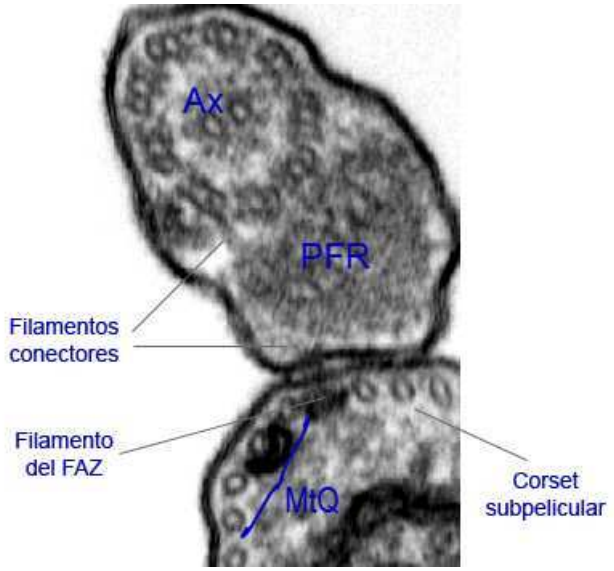


Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de la región del FAZ. En la imagen se señalan las estructuras citoesqueléticas que conforman el FAZ. En el flagelo se observan el axonema (Ax) y el Paraflagellar Rod (PFR) con los filamentos conectores. En el cuerpo celular se señalan microtúbulos del corset subpelicular, el Microtubule Quartet (MtQ) con la estructura filamentoso del FAZ (filamento del FAZ).

Como se explicitó anteriormente, el bolsillo flagelar es una región sumamente importante para la biología de la células en dos niveles distintos, metabólico y estructural. En este segundo caso su importancia radica en que es la región de la célula en donde se alojan todas las estructuras descriptas en el párrafo anterior y que son fundamentales para el proceso de morfogénesis y

división celular, como se verá posteriormente. El bolsillo flagelar es una región bien concreta que posee límites bien definidos. El límite proximal está dado por el cuerpo basal, mientras que el distal está definido por el punto en donde el flagelo emerge de la célula (región del cuello). En cada uno de estos límites existen arreglos fibrilares que llevan a una fuerte interconexión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto subyacente. Estos dos puntos provocan una división física de la membrana plasmática en tres dominios funcionalmente diferentes: la membrana celular, la membrana del bolsillo flagelar y la membrana flagelar [68]. En la región del cuello, justo en el punto donde el flagelo sobresale del cuerpo celular, existe una estructura anular que rodea la cara citoplasmática de la membrana del bolsillo flagelar y que se denomina collar del bolsillo flagelar (FPC). Inmediatamente por encima de esta estructura, y dentro de la región del cuello flagelar existe un elemento en forma de horquilla, denominado *Bilobe* [69]. La región circular de la horquilla se encuentra en íntimo contacto con el collar del cuello flagelar, mientras que los dos brazos corren en paralelo hacia el cuerpo celular. Uno de los brazos corre en íntima relación con el MtQ, mientras que el otro lo hace al filamento del FAZ [70].

2.5. Ciclo celular en Tripanosomátidos

El ciclo celular en los tripanosomátidos en sus mecanismos básicos es igual al de otras células eucariotas. Sin embargo, la presencia de ciertas organelas y estructuras hacen que estas células muestren algunas variaciones y ciertos procesos exclusivos. Estas diferencias se dan sobre todo en las fases S y M del ciclo celular, y se deben principalmente a la presencia del kinetoplasto y del flagelo. Los tripanosomátidos poseen un único núcleo, kinetoplasto, flagelo y aparato de Golgi, que deben ser duplicados durante el ciclo celular y correctamente segregados durante la mitosis para la formación de dos nuevas células hijas completas y viables. Es por esto que los eventos más importantes del ciclo celular y en los cuales me voy a focalizar son los de duplicación y segregación de estas organelas.

La duplicación de las organelas son procesos bien definidos en el tiempo y que ocurren en forma secuencial y precisa. Entre los distintos tripanosomátidos es *T. brucei* en el cual se realizaron la mayor cantidad de estudios sobre la progresión del ciclo celular y los mecanismos involucrados en este. Realizando una comparación con los demás tripanosomátidos se observan diferencias en cuanto al orden de la secuencia de duplicación de las distintas organelas. En la forma procíclica de *T. brucei* el primer evento morfológico que sucede durante el ciclo celular es la duplicación del cuerpo basal con nucleación y crecimiento del nuevo flagelo que, junto con la posterior duplicación del aparato de Golgi, suceden en la fase G1 [71]. Luego la secuencia de eventos continúa con la replicación de ADN en el kinetoplasto y en el núcleo. Aquí surge un rasgo distintivo en el ciclo celular de los tripanosomátidos, y es que el núcleo y el kinetoplasto poseen fases de síntesis independientes y desfasadas en el tiempo. En la forma procíclica de *T. brucei* la fase S del kinetoplasto comienza antes y dura menos que la del núcleo. Esto se traduce en que en estas

células primero sucede la segregación del kinetoplasto (fase G2 del ciclo celular), y luego la mitosis nuclear (fase M del ciclo) [71]. En epimastigotes de *T. cruzi* la secuencia de eventos durante el ciclo celular es idéntica a la de la forma procíclica de *T. brucei*, con la excepción que primero comienza la fase S en el núcleo y luego en el kinetoplasto [72]. En la forma promastigote de *Leishmania mexicana* la secuencia de eventos es distinta a las anteriores. En estas células las fases S del núcleo y del kinetoplasto ocurren al mismo tiempo y la mitosis del núcleo ocurre antes que la división y segregación del kinetoplasto.

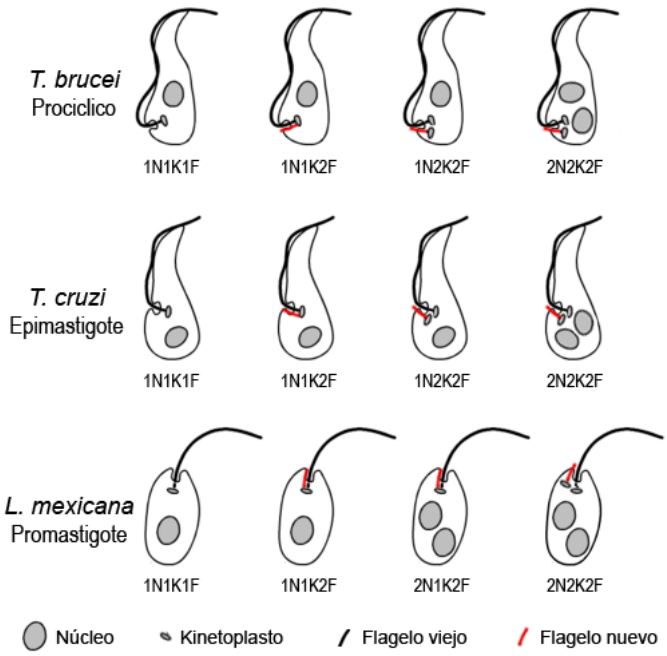


Figura 10. Secuencias de eventos durante el ciclo celular de tripanosomátidos. Esquema que muestra la secuencia de duplicación de las organelas y estructuras más importantes en las formas de distintos tripanosomátidos.

Independientemente de las diferencias temporales en la secuencia de eventos de duplicación de las organelas y estructuras entre los distintos géneros, el número de núcleos (N), kinetoplastos (K) y flagelos (F) son muy útiles como marcadores celulares para ubicar células individuales dentro del ciclo celular mediante la mera observación por microscopía. Otro parámetro de utilidad para esto último es determinar si el núcleo y/o el kinetoplasto ya han duplicado su genoma, y esto puede ser medido a partir de imágenes de fluorescencia donde el ADN haya sido marcado con DAPI. Todos estos parámetros mensurables son de gran importancia desde un punto de vista práctico ya que permiten analizar profundamente el fenotipo del ciclo celular entero a nivel de células individuales, algo que no puede ser realizado en otros tipos celulares.

A continuación se realizará una descripción de todos los eventos relevantes del ciclo celular de las células de tripanosomátidos como son duplicación del flagelo, síntesis de ADN, segregación del

kinetoplasto, mitosis del núcleo y citoquinesis.Por último se hará una breve reseña de los mecanismos regulatorios del ciclo celular presentes en estos organismos.

2.5.1. Duplicación del flagelo y estructuras relacionadas

En todos los tripanosomátidos el nuevo flagelo comienza a formarse previamente al inicio de la fase S del ciclo celular, durante la fase G1 [72-74], siendo el primer evento citológico detectable. Al comienzo del ciclo celular las células poseen un único cuerpo basal, que sostiene el axonema del flagelo, y un pre-cuerpo basal. Hacia el fin de la fase G1 el pre-cuerpo basal madura para convertirse en un cuerpo basal, a partir del cual el nuevo flagelo comenzará a formarse. Ni bien el axonema del nuevo flagelo comienza a ensamblarse, su extremo superior se conecta a la cara lateral del viejo flagelo, por medio del denominado conector flagelar [75]. Inmediatamente después se forman dos nuevos pre-cuerpos basales [76]. Para cuando la célula transita la fase S del ciclo celular, el nuevo flagelo ya atraviesa el bolsillo flagelar preexistente y sigue posicionado anterior al viejo flagelo [64]. Hacia el final de la fase S, el nuevo complejo cuerpo basal/flagelo cambia su ubicación rotando alrededor del viejo flagelo para establecerse en una posición posterior al mismo. Este movimiento rotacional provoca que el único bolsillo flagelar se divida en dos entidades separadas [76]. La conexión que existe entre el cuerpo basal y el kinetoplasto a través del TAC provoca que el nuevo cuerpo basal arrastre al kinetoplasto recién duplicado, provocando la división y segregación del mismo. Este reacomodamiento de estructuras durante la formación del nuevo flagelo es de relevante importancia para la correcta colocación de las mismas previo a la división de la célula y su correcta segregación a las dos células hijas.

La biogénesis del nuevo flagelo es a través del mecanismo conocido como transporte intrafagelar (IFT). Esto es el transporte de moléculas del axonema y del PFR hacia el extremo distal del flagelo, a través de motores moleculares de la familia de la kinesina II, en donde son ensamblados [77]. En la forma procíclica de *T. brucei* donde la elongación del nuevo flagelo fue impedida por el silenciamiento de genes responsables del IFT, se observó que las células mostraban un nuevo FAZ más corto y una disminución del tamaño celular [78]. Esta disminución se debe a una deslocalización del punto de entrada del surco de clivaje durante la citoquinesis. Así se determinó que la crecimiento del nuevo flagelo controla la elongación del FAZ asociado, y se le adjudica al FAZ ser la estructura que marca el punto donde se producirá el corte durante la división de la célula [79]. Debido a que las células sin flagelo mostraban una deslocalización en la segregación del cuerpo basal y del kinetoplasto también se sugiere que el FAZ podría estar implicado en el establecimiento de la polaridad celular [78].

2.5.2. Síntesis de ADN

En tripanosomátidos la replicación del ADN nuclear y del K-DNA son dos procesos independientes pero a la vez coordinados. Durante el transcurso del ciclo celular, la fase S en cada una de estas

organelas muestra un desfasaje temporal en el comienzo y distintos períodos de tiempo en su duración. De esta forma, en tripanosomátidos se puede hablar de un ciclo nuclear y un ciclo del kinetoplasto como eventos separados, y que suceden de una forma temporalmente desfasada pero en una secuencia determinada. La fase S del kinetoplasto, a su vez, se encuentra coordinada con el ciclo de duplicación del complejo cuerpo basal/flagelo de forma de asegurar que el genoma kinetoplastídico sea correctamente heredado en las células hijas [80]. Los mecanismos moleculares de replicación del genoma en cada una de estas organelas son diferentes. La replicación del ADN nuclear es un mecanismo del cual se sabe muy poco y hasta la fecha no ha surgido ningún trabajo que aporte datos relevantes sobre este proceso. El análisis de la base de datos de los proyectos genomas de los tripanosomátidos muestra la conservación de muchos componentes moleculares de la maquinaria de replicación de eucariotas superiores, pero sin embargo muchos otros parecen estar ausentes [73].

La replicación del ADN en el kinetoplasto es un mecanismo bastante estudiado debido a la singularidad de esta organela a lo largo de la evolución, lo que le otorga una gran relevancia biológica. El conocimiento que hay hasta el momento sobre el mecanismo se debe a varios estudios realizados en el organismo *Crithidia fasciculata*, complementado con unos pocos realizados en *T. brucei*. Los dos tipos de moléculas de ADN, los maxicírculos y los minicírculos, poseen mecanismos de duplicación particulares. Los maxicírculos son replicados mientras aún permanecen anclados a la red del kinetoplasto, a diferencia de los minicírculos que para ser replicados son liberados fuera de la red [81]. Sobre la replicación de los maxicírculos no existe mucha más información, salvo que ésta es unidireccional y se inicia en un origen discreto ubicado en la región no codificante [82]. Por estudios bioquímicos se identificaron múltiples proteínas que forman parte del kinetoplasto y son homólogas a enzimas encargadas de la replicación del ADN en otros eucariotas, mientras que por inmunofluorescencia se determinó la localización de las mismas dentro de la organela [83]. Sin embargo, la participación de muchas de ellas en el proceso de duplicación de los minicírculos todavía no fue probado en forma directa, y el rol que se les atribuye se basan en la extrapolación de la función de los homólogos en otros eucariotas. A pesar de esto, en la actualidad existe un modelo con alto consenso respecto del mecanismo de replicación de los minicírculos, y es el siguiente (esquematizado en Figura 11). Antes de ser replicado, y por acción de una topoisomerasa tipo II, cada minicírculo individual es liberado a la matriz mitocondrial en una región específica que se encuentra entre el K-DNA y el cuerpo basal (zona kinetoflagelar, KFZ). Aquí, la proteína UMSBP (*Universal Minicircle-Sequence-Binding Protein*) se une al origen de replicación y desencadena el inicio de la replicación. Junto a UMSBP, posiblemente se ensamble una maquinaria en el origen de replicación, de la cual formarían parte una proteína primasa (que sintetiza los *primers* de ARN) [84] y las ADN polimerasas del tipo IB y IC [85]. Una vez formados, los dos minicírculos hijos migran hacia lados opuestos del disco kinetoplastídico, una región

denominada *antipodal site* y que es un ensamblaje de proteínas que continuarán con el procesado de los minicírculos recién sintetizados. Este procesamiento incluye la remoción del los *primers* de ARN a través de la enzima SSE-1, rellenado de los *gaps* entre los fragmentos de Okazaki por una polimerasa β y empalme de los *nicks* resultantes por medio de una ligasa kβ [86]. Finalmente, los minicírculos aún con la presencia de un *nick* o un *gap*, son enganchados por acción de la topoisomerasa II en la periferia de la red del kinetoplasto adyacente a los *antipodal site*.

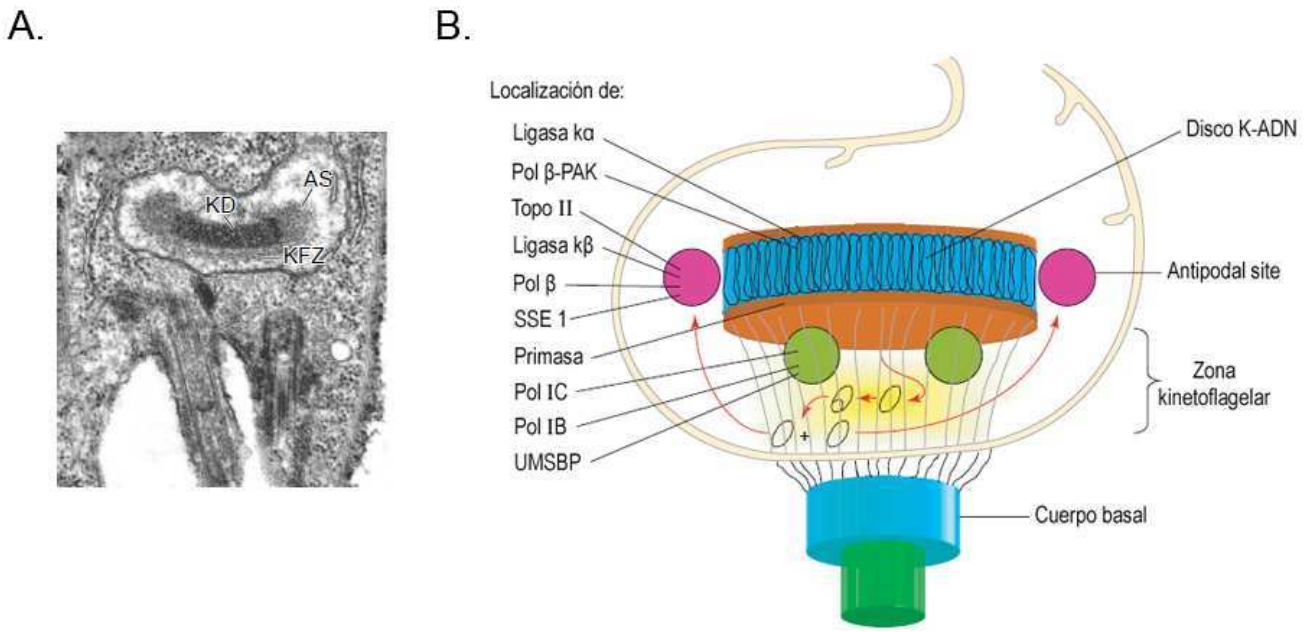


Figura 11. Replicación de los minicírculos en el kinetoplasto. A. Microscopía electrónica que muestra al disco kinetoplastídico (KD) y las regiones lindantes donde se produce la duplicación de los minicírculos, la zona kinetoflagelar (KFZ) y los *antipodal setes* (AS). **B.** Esquema de la localización que adoptan los minicírculos durante su duplicación y la ubicación de las enzimas que participan en el proceso. También se marcan los estructuras que rodean al disco kinetoplastídico. Modificado de [86].

En *T. cruzi* (al igual que en *C. fasciculata*) a medida que los minicírculos nuevos son agregados, el kinetoplasto realiza un movimiento rotatorio [87]. Por lo que los minicírculos nuevos se van distribuyendo de forma homogénea alrededor de toda la periferia de la red, mientras que en el centro van quedando los minicírculos que aún no fueron replicados. Se piensa que el sistema logra diferenciar entre los minicírculos ya replicados de los que aún no lo fueron por la presencia de *gaps* o *nicks* en los primeros [81]. Una vez que todos los minicírculos fueron replicados, el kinetoplasto de tamaño doble se dobla hasta adquirir una forma casi circular. Luego se produce la escisión a lo largo del diámetro para formar dos progenies con igual carga de K-DNA [88].

2.5.3. <u>División del núcleo y del kinetoplasto</u>

La segregación del kinetoplasto, luego de haber duplicado su contenido de ADN, es mediada por la separación de los complejos cuerpo basal/flagelo [53]. El movimiento rotacional que el nuevo

complejo cuerpo basal/flagelo realiza para pasar de una posición anterior a una posterior respecto al viejo complejo se produce en el mismo momento en que el K-DNA se está duplicando, y a través del TAC el movimiento se propaga al kinetoplasto [89]. En la forma procíclica de *T. brucei*, donde el mecanismo de segregación está mejor estudiado, la separación de los cuerpos basales posee dos fases. Durante la primera la separación entre ambos alcanza una distancia de aproximadamente 2 µm, y el kinetoplasto aún permanece unido por un delgado hilo formado sólo por maxicírculos (estructura denominada *nabelschnur*). En la segunda fase, la migración de los cuerpos basales es más rápida y la distancia entre ambos llega a 4,5 µm. Hay fuertes evidencias que atribuyen esta propiedad bifásica de la separación de los cuerpos basales al corte final del hilo que mantiene unido a ambos kinetoplastos hijos, siendo esto lo que provoca el aumento de la velocidad de migración de los cuerpos basales.

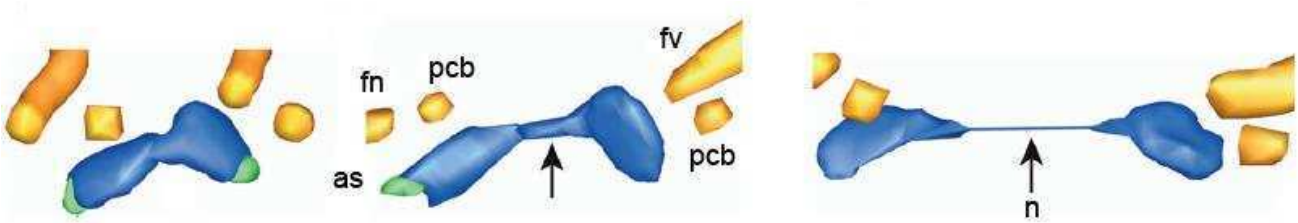


Figura 12. Reconstrucción 3D de la división del kinetoplasto. De izquierda a derecha, secuencia de movimientos que realizan el kinetoplasto (azul) y estructuras citoesqueléticas relacionadas: flagelo nuevo (fn), flagelo viejo (fv), pre-cuerpo basal (pcb). También se marcan los *antipodal sites* (as, en verde) y el *nabelschnur* (n, flechas).

Dos propiedades particulares caracterizan al núcleo celular de los tripanosomátidos durante la mitosis: la no desintegración de la membrana nuclear y la no condensación de los cromosomas [26]. A pesar de no desintegrar su envoltura, durante la mitosis el núcleo altera la morfología esférica que posee durante la interfase celular. Así, al inicio de la mitosis el núcleo se elonga hasta que su envoltura forma un istmo entre lo que van a ser los dos núcleos hijos [51]. La segregación de los cromosomas durante la mitosis está mediada por un mecanismo dependiente de microtúbulos [90]. Durante esta fase M aparecen en el plano ecuatorial del nucleoplasma unas placas de estructura laminar, que en *T. cruzi* son un total de 10 [91]. La ultraestructura de las mismas se encuentra bien definida y comprende dos láminas electron-densas externas de 50 nm de grosor, separadas de una única lámina electron-densa central por dos zonas intermedias electron-lúcidas. Se cree que estas placas se comportan como cinetocoros, y existen numerosas observaciones en este sentido [51, 92, 93]. Dentro del núcleo en división se forma un huso de microtúbulos similar al huso mitótico de los metazoos. Este huso queda confinado dentro del núcleo durante toda la división, con sus polos en el lado nucleoplásmico de la envoltura nuclear [91]. Los polos no son centros organizadores de microtúbulos (MTOC) como en otros eucariotas, sino que son unas estructuras anulares donde convergen los microtúbulos que conforman el huso. En *T.*

cruzi, de cada uno de los polos irradian alrededor de 60 microtúbulos definidos en dos grupos: los microtúbulos cinetocóricos y los microtúbulos polares. Los primeros nacen en los polos y se insertan en las placas electron-densas, con una relación de cuatro microtúbulos por cada lámina externa. Los microtúbulos polares nacen en el polo del huso y llegan hasta la zona ecuatorial, donde se interdigitan con los microtúbulos polares que viene del polo opuesto [62]. La secuencia de eventos de la mitosis nuclear continúa con la separación de las placas electron-densas en dos mitades simétricas y su migración hacia polos opuestos. Cuando estas placas se encuentran bien alejadas del plano ecuatorial, el núcleo adquiere su máxima elongación, mientras que los polos del huso desaparecen. La región media del núcleo en división (el istmo) se encuentra atravesado por una gran cantidad de microtúbulos, que se extienden entre las placas de polos opuestos [91].

Independientemente de la especie de tripanosomátido que se trate, en todos los casos el número de microtúbulos del huso mitótico y de placas electron-densas son menores al número total de cromosomas dentro del núcleo. Este dato sugiere que la segregación de los cromosomas durante la mitosis en estos organismos debe ser diferente a lo que sucede en organismos superiores. Trabajos realizados por el grupo del Dr. Gull, utilizando sondas específicas para FISH y marcando el huso mitótico con un Ac contra β-tubulina, describen la dinámica de segregación de los cromosomas en *T. brucei*. Este organismo posee en su genoma dos tipos de cromosomas [42]: los minicromosomas (MCs), que en interfase se ubican en la periferia nuclear cerca de la envoltura nuclear; y los *large housekeeping chromosomes* (MBCs), de localización nuclear difusa. Durante la fase M, los MCs y MBCs se concentran en la proximidad del plano ecuatorial del núcleo. Posteriormente, los cromosomas segregan en dos grupos hacia los polos opuestos. Aquí existe una diferencia en la cinética de migración entre los MCs, que migran más rápido, y los MBCs, que lo hacen con mayor lentitud. Esta diferencia es atribuida a distintos mecanismos de segregación entre ambos tipos cromosómicos. Se postula que los minicromosomas interaccionan con los microtúbulos de forma directa y son acarreados a los polos por motores moleculares tipo dineina, mientras que los MBCs segregan a través de la interacción con los cinetocoros y la despolimerización de los microtúbulos cinetocóricos [94]. Este modelo, aunque no del todo probado, se ajusta perfectamente al problema de la desproporción del número de microtúbulos/cinetocoros con el de cromosomas, ya que postula que más de un cromosoma puede interaccionar con un mismo microtúbulo.

2.5.4. Citoquinesis en tripanosomátidos

El mecanismo de la citoquinesis en tripanosomátidos es muy diferente al de células de mamíferos, a la vez que difiere entre las distintas especies e incluso entre distintos estadios de la misma especie. Todas las formas replicativas de *T. brucei* y la forma epimastigote de *T. cruzi* se dividen a través de un surco de división que ingresa desde la parte anterior hasta la posterior, provocando la división longitudinal de la célula. Sin embargo, las formas amastigotes de *T. cruzi* y *Leishmania*

muestran el patrón de división de constricción central observado en las células de mamíferos, aunque no hay evidencia de que se trate de un anillo de constricción de actomiosina como en esta últimas células. Los componentes moleculares del surco de división en tripanosomátidos todavía no han sido identificados, hasta la fecha sólo unos pocos reguladores de este evento fueron descriptos en *T. brucei* [95, 96].

En la formación del surco de división en *T. brucei* juegan un rol fundamental el nuevo flagelo y el FAZ asociado. Ambas estructuras definen la posición y la dirección de la entrada del surco [78, 79], lo que determina el eje de corte de ambas células hijas. Este ingresa entre el viejo y el nuevo flagelo, para avanzar hasta el extremo posterior de la célula dividiéndola en dos células hijas que quedan orientadas con sus flagelos apuntando en sentido opuesto. En este punto los flagelos parecen cumplir un rol fundamental para la escisión final de ambas células, y se atribuye al batido de éstos ser la fuente de la fuerza mecánica necesaria para la separación final de las células [97].

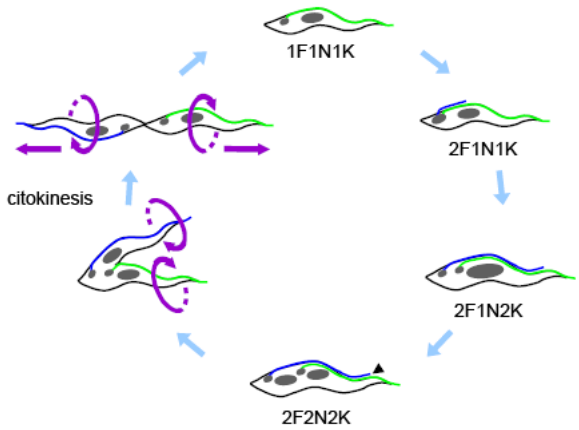


Figura 13. Esquema del ciclo celular de la forma procíclica de *T. brucei*. Se muestran las principales etapas del ciclo celular (1F1N1K-2F2N2K) y se detalla la separación de las células durante la citoquinesis. Las flechas violetas esquematizan el movimiento de los flagelos y el sentido opuesto de la fuerza que éste ejerce. Modificado de [97]

2.5.5. Regulación del ciclo celular en tripanosomátidos

Los eventos del ciclo celular son conducidos por la activación e inactivación secuencial de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y, a la vez, son monitoreados por *checkpoints* específicos de cada fase. Estos *checkpoints* son vías de señalización que censan los errores ocurridos durante procesos puntuales y detienen el ciclo hasta que estos errores sean remendados, o si esto no sucede llevan a la muerte celular programada o apoptosis [98]. Las vías de señalización que ejecutan los *checkpoints* están gobernadas principalmente por mecanismos de fosforilación y defosforilación, ejecutados por proteínas quinasas y fosfatasas específicas [99]. En la mayor parte de los eucariotas el número de *checkpoints* a lo largo del ciclo celular son tres [100]. El primero opera al final de la fase G1 (punto de restricción) cuando la célula toma la decisión de

continuar con el ciclo y duplicar su ADN, y lo que se censa es si las condiciones del entorno son favorables para que la célula se divida. El segundo opera en el límite entre las fases G2 y M, verificando si el ADN fue correctamente duplicado antes de ingresar en la mitosis. El tercero se encuentra dentro de la fase M, en la transición entre la metafase y la anafase, donde el sistema controla la correcta orientación bipolar de los cromosomas, es decir que los cinetocoros de cada cromátida hermana interaccionen con microtúbulos de polos opuestos.

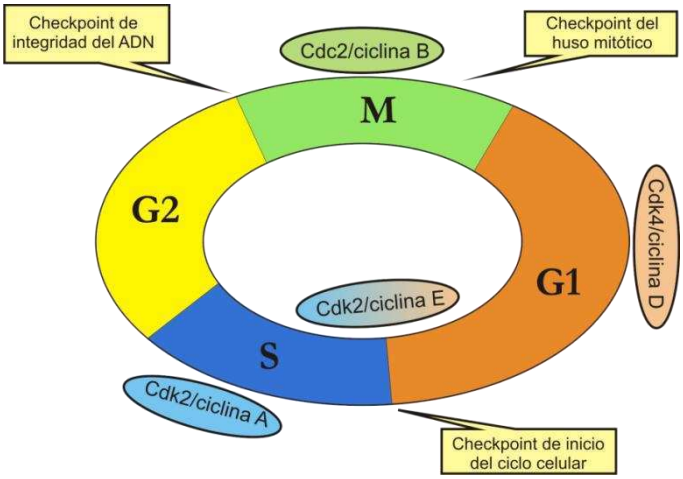


Figura 14. Fases del ciclo celular en eucariotas. Se detallan los complejos CDK/ciclina de cada fase del ciclo y la ubicación de los *checkpoints* dentro del mismo.

Los mecanismos de regulación del ciclo celular en eucariotas se encuentran bien conservados en la evolución. Los parásitos protozoos son tal vez el grupo de organismos eucariotas que más divergieron. Sin embargo, muchas de las moléculas claves – como las CDKs y las ciclinas – han sido identificadas en estos organismos [101-105], sugiriendo que el control del ciclo celular utiliza una maquinaria molecular semejante a la de células de mamíferos. Específicamente en tripanosomátidos el ciclo celular se encuentra regulado por CDKs, aunque lo modulación de la actividad de estas CDKs parece haber evolucionado con características especificas de este grupo taxonómico. La mitad de las CDKs de *T. brucei* (denominadas CRKs) poseen inserciones en sus dominios catalíticos, y la mayoría muestran sus extremos N- y C-terminales más extensos. Por otra parte, el motivo PSTAIRE (sitio de unión a las ciclinas) muestran una considerable divergencia respecto a las CDKs de otros eucariotas [73].

A partir de los proyectos genoma de los tripanosomátidos (TriTryps) [42-44] fue posible identificar secuencias homólogas de numerosos genes involucrados en la regulación del ciclo celular en eucariotas superiores (Tabla 3). Sólo en *T. brucei* se realizó un análisis funcional de algunas de estas secuencias. Si bien se avanzó en el conocimiento de la función de muchas proteínas [106], todavía no ha sido posible integrar los distintos genes como componentes de vías de señalización y procesos celulares definidos.

Tabla 3. Proteínas regulatorias del ciclo celular en *T. brucei*

Etapa del ciclo celular	Productos génicos	Homólogos en humanos	Función
Transición G1/S	CYC2	Ninguno	Ciclina de G1
	CRK1	No conocido	CDK de G1
	CRK2	No conocido	CDK G1
Replicación del ADN y progresión de la fase S	Orc1/Cdc6	ORC1	Complejo origen replicación
	Orc1b	Ninguno	Complejo origen replicación
	Orc4	ORC4	Complejo origen replicación
	Tb3120	None	Complejo origen replicación
	Tb7980	None	Complejo origen replicación
	Mcm2-7	Mcm2-7	Componente del CMG
	Cdc45	Cdc45	Complejo origen replicación
	GINS	GINS	Complejo origen replicación
	TLK1	TLK1, TLK2	*Tousled-like kinase*
	Asf1A, Asf1B	Asf1A, Asf1B	Chaperona de la histona H3
Transición G2/M	CYC6	Ciclina B	Ciclina mitótica
	CYC8	Ciclina B	Ciclina mitótica
	CYC3	Cdk1	CDK mitótica
	CYC9	Ninguno	CDK mitótica
Mitosis	AUK1, CPC1, CPC2	Aurora B, Ninguno, Ninguno	*Chromosomal Passenger*
	TLK1	TLK1, TLK2	*Tousled-like kinase*
	KIN-A	Ninguno	Quinasa divergente
	KIN-B	Ninguno	Quinasa divergente
	Kif3-1	MCAK	Kinesia-13
	APC1, Cdc27	APC1, Cdc27	Complejo promotor de anafase
	SMC3, SCC1	SMC3, SCC1	Cohesina
	Separasa	Separasa	Proteasa
	NOP86	Ninguno	Proteína nucleolar
Citoquinesis	AUK1, CPC1, CPC2	Aurora B, Ninguno, Ninguno	*Chromosomal Passenger*
	PLK	PLK1	*Polo-like kinase*
	MOB1	MOB1	No conocida
	PK50, PK53	NDR1	*Nuclear DBF-2-related kinase*
	TRACK	RACK1	Quinasa Rho
	RHP	RhoA	GTPasa tipo RhoA
	CFB2	Ninguno	Proteína F-box
	ARL2	Arl2	GTPasa pequeña
	AIR9	Ninguno	Proteína asociada a microtúbulos
	KAT80,KAT60	P80 y p60 kataninas	Kataninas
	SPA	Spastina	Spastina

El ciclo celular es una secuencia estrictamente ordenada de eventos celulares consecutivos, y la principal función de los *checkpoints* es la de asegurar que un evento concluya de manera exitosa previo al comienzo del evento siguiente [107]. El ciclo celular de tripanosomátidos cuenta con eventos extras respecto al ciclo de otros eucariotas, que son el ciclo de síntesis de ADN y segregación del kinetoplasto. Estos dos eventos se encuentran coordinados con los demás eventos del ciclo celular. En *T. brucei* la síntesis de ADN en el kinetoplasto comienza antes que la síntesis de ADN nuclear y el kinetoplasto segrega previo a la mitosis nuclear. Estudios realizados sobre la forma procíclica de *T. brucei* demostraron que células a las cuales se les inhibe la síntesis de ADN nuclear no realizan mitosis. Sin embargo, células que no realizan la mitosis nuclear son capaces de proseguir en el ciclo y dividirse por citoquinesis [108]. Los autores concluyen que los tripanosomátidos conservan el *checkpoint* de entrada a mitosis, por el cual las células dividen su núcleo una vez que se produce la replicación completa del ADN. Por otra parte, en este trabajo se demuestra que el *checkpoint* de citoquinesis en esta forma de *T. brucei* es independiente de la mitosis nuclear, y en cambio está gobernado por el proceso de división y segregación del kinetoplasto. Un dato relevante surgido del estudio de la regulación del ciclo celular en la forma sanguínea de *T. brucei*, es que en estas células la citocinesis no se produce si la mitosis nuclear se encuentra inhibida [101]. Por lo que *T. brucei* no sólo difieren en cuanto al control del ciclo celular con otros eucariotas, sino que también muestra diferencias entre distintos estadios de desarrollo de su ciclo de vida.

3. Las proteínas Aurora quinasas

Las proteínas Aurora quinasas son un grupo de serina/treonina quinasas que se encuentran bien conservadas a lo largo de la evolución, y desde su descubrimiento hasta la fecha son uno de los grupos de quinasas más intensamente estudiados. El primer gen definido como Aurora quinasa fue descubierto en un rastreo de mutantes de *D. melanogaster* con defectos en el huso mitótico, en donde el fenotipo consistía en la formación de husos mitóticos monopolares [109]. Es en este trabajo donde los genes Aurora quinasas son bautizados, sin embargo el primer trabajo donde se observa el fenotipo resultante de la mutación de genes Aurora quinasa es en la levadura *S. cereviciae*. Este trabajo, donde se describe el desarrollo de una técnica para identificar colonias de levaduras con poliploidia, se detecta el gen causante del fenotipo y se le otorga el nombre de *Increase-in-Ploidy 1* (Ipl1) [110]. A partir de estos trabajos iniciales, se sucedieron varios estudios donde se identificaron genes Aurora quinasa en distintos organismos. Un rasgo de esta familia de proteínas es que el número de miembros que la componen varía según el organismo. En levaduras se identificó un único gen perteneciente a esta familia, el ya nombrado Ipl-1 en *S. cereviciae* y el gen *Aurora-related-kinase* (Ark1) en *Schizosacharomyces pombe* [111]. En organismos metazoos como *D. melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Xenopus laevis* esta familia se encuentra compuesta de dos miembros [109, 112-116]. El mayor número de genes Aurora quinasa

encontrados en un organismo metazoo corresponde a humanos, donde tres miembros de esta familia fueron identificados y descriptos [117]. Debido a que los genes de esta familia fueron identificados de forma independiente en los distintos organismos es que la nomenclatura es muy confusa, aunque en la actualidad está ampliamente consensuado denominarlas Aurora A, B y C [99].

Tabla 4. Nomenclatura de los genes Aurora quinasas

Mamíferos	Otros nombres	*Xenopus*	*C. elegans*	*Drosophila*	*S. cerevisiae*
Aurora A	Aurora-2, HsAIRK1, ARK1, Aik, BTAK, STK-15 (humanos); ARK1, Ayk1, IAK1 (ratón)	Eg2	AIR-1	Aurora	Ipl1p
Aurora B	Aurora-1, HsAIRK2, ARK2, Aik2, AIM-1, STK-12 (humanos); ARK2, STK-1 (ratón); AIM-1(rata)	AIRK2	AIR-2	IAL	
Aurora C	Aurora-3, HsAIRK3, AIE2, Aik3, STK-13 (humanos); AIE1 (ratón)				

La regulación de la progresión de la fase M se basa en dos mecanismos: la fosforilación/defosforilación de proteínas y la proteólisis. A su vez estos dos mecanismos están estrechamente conectados, debido a que los componentes de la maquinaria proteolítica son blanco de fosforilación de quinasas, mientras que la regulación negativa de la acción de las quinasas es a través de su degradación por el sistema proteolítico. Las quinasas de la familia Aurora pertenecen al grupo funcional de enzimas quinasas involucradas en regular procesos de la mitosis celular, dentro del cual también se incluyen las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs), las quinasas de la familia Polo y las de la familia NIMA.

Desde un enfoque estructural, las proteínas Aurora se pueden dividir en una región C-terminal en donde se localiza el dominio catalítico y, por tanto, es una región altamente conservada; mientras que la región N-terminal es más divergente y es la región a través de la cual estas proteínas son reguladas [118]. La función que cumplen estas enzimas en la división celular se encuentra altamente conservada en la evolución. La función que desarrollan estas proteínas viene dada tanto por su actividad catalítica como por la localización que adoptan. Un rasgo distintivo de las Aurora quinasas es que muestran un comportamiento dinámico en cuanto a su ubicación dentro de la célula, y que sigue un patrón predeterminado durante la progresión del ciclo celular [117]. Una consecuencia de este comportamiento es que cada una de las proteínas Aurora se encuentra involucrada en varios eventos que se desarrollan durante la mitosis. El control de la función de

estas enzimas se da a distintos niveles: i) expresión génica, aumentando los niveles de proteína durante la fases G2 y M del ciclo celular; ii) modificación post traduccional, la forma fosforilada de las enzimas es la que posee el pico de actividad catalítica; iii) localización subcelular, variando la localización de la enzima se determina el proceso celular en el cual se encuentra involucrada. El nivel de expresión de las proteínas se encuentra determinado por el proceso de degradación de la mismas a través de la maquinaria del proteasoma [119]. Dentro de la estructura primaria de las proteínas Aurora existen numerosos residuos serina y treonina que son blanco de fosforilación [120]. Para que estas enzimas alcancen su máximo de actividad deben encontrarse fosforiladas en un residuo treonina específico, que se localiza dentro del dominio catalítico y que es modificado por un evento de autofosforilación cruzada. La fosforilación en otros residuos de la proteína, dependiendo de cuales, puede aportar a los mayores niveles de actividad o bien a promover su degradación vía proteasoma [121]. La interacción de estas enzimas con proteínas *partners* influye en los tres niveles de su regulación como es el reconocimiento por la maquinaria de degradación proteasomal, el perfil de fosforilación y la determinación de la localización subcelular.

3.1. Aurora A

En humanos este gen fue identificado por formar parte de la región cromosómica 20q13, la cual se encontró amplificada con mucha frecuencia en cáncer de mama [122]. La proteína humana Aurora quinasa A -y sus ortólogos en otros organismos- es conocida como la Aurora polar, por su localización en los centrosomas durante la división celular [114], aunque también se observó que durante la mitosis localiza en la zona media del huso mitótico [118]. El centrosoma es una estructura celular en la cual se pueden definir tres áreas: dos centriolos, una matriz que conecta a ambos centriolos y el material pericentriolar. La Aurora A es detectada en el centrosoma una vez que este se duplica y permanece en esta estructura desde el final de la fase S hasta el comienzo de la fase G1 del siguiente ciclo celular [123]. La Aurora A participa de los procesos subsiguientes que le suceden a los centrosomas duplicados. Durante la fase G2 los dos centrosomas se separan, moviéndose por fuera de la envoltura nuclear hasta ubicarse cada uno en extremos opuestos. De esta forma quedan establecidos los polos del futuro huso mitótico (bipolar). El movimiento de los centrosomas depende de microtúbulos y se encuentra bajo control de motores moleculares. Los resultados obtenidos en el trabajo original en *D. melonagster* [109], donde la mutación de Aurora A provoca la formación de huso mitótico unipolar, fue el primer indicio de que esta proteína estaría involucrada en la separación de los centrosomas. Hoy día se sabe que la Aurora A mediante su actividad quinasa provoca la separación de los centrosomas [114], posiblemente mediante la fosforilación de proteínas relacionadas a kinesinas [112]. Esta proteína también parece ser necesaria para el mantenimiento del huso bipolar un vez que éste ya se encuentra formado [124]. El mantenimiento de huso bipolar se debe al anclaje de los centrosomas al cortex de las células a través de los microtúbulos astrales del huso mitótico. En un análisis detallado de todos los

mutantes Aurora en el trabajo original de *D. melanogaster* se encontraron dos en los cuales el número y la longitud de los microtúbulos astrales se encontraban disminuidos. La causa de esto era la menor cantidad en los centrosomas de dos proteínas encargadas de mantener el número y la longitud de los microtúbulos astrales, D-TACC y MSPS [125]. Por lo que Aurora A cumpliría su función de mantención del huso bipolar a través de reclutar hacia los centrosomas a proteínas encargadas de la formación de los microtúbulos astrales. Junto a estas proteínas, muchas otras son reclutadas hacia los centrosomas en un proceso denominado maduración. Durante éste un gran número de proteínas son incorporadas dentro del material pericentriolar y contribuyen a aumentar la actividad de nucleamiento de microtúbulos por parte del centrosoma. Aurora A participa de este proceso de maduración en los centrosomas a través del reclutamiento de distintas proteínas como centrosomina y γ-tubulina [126]. El mecanismo por el cual Aurora A recluta a las proteínas parece ser dual, ya que algunas son blanco de fosforilación por esta quinasa mientras que otras son reclutadas de forma no dependiente de la actividad quinasa de esta enzima [125, 127]. Aurora A también es necesaria para el correcto ensamblado del huso mitótico. El ensamblado del huso involucra microtúbulos, motores moleculares y otras proteínas asociadas a microtúbulos, y es un proceso regulado de forma coordinada por proteínas quinasas y fosfatasas [99]. Una de estas quinasas es la Aurora A, que participa en este proceso fosforilando proteínas tipo kinesinas (Eg5) así como proteínas estabilizadoras y asociadas a microtúbulos (XMAP125/chTOG y HURP) [128]. Es en su participación en este proceso donde se realizaron los mayores avances en el conocimiento de la regulación de Aurora A. La condensación de los cromosomas durante la mitosis provoca la formación de una gradiente de Ran-GTP que favorece el ensamblado de microtúbulos en la proximidad de los cromosomas. La alta concentración de Ran-GTP libera a la proteína TPX2 de su unión a las importinas α y β. Una vez libre, TPX2 interacciona físicamente con la Aurora A y la dirige hacia los microtúbulos del huso mitótico [129]. TPX2 también posee un efecto directo sobre la actividad catalítica de Aurora A, ya que promueve su autofosforilación en el dominio catalítico (residuo Treonina288) [130]. La unión de TPX2 promueve un cambio conformacional en el dominio catalítico de Aurora A que mantiene oculto al residuo treonina fosforilado [131]. De esta forma contrarresta el efecto de la fosfatasa PP1 que, al estar este residuo accesible, lo desfosforila manteniendo a la Aurora A en su forma inactiva [121].

Aurora A también participa en la regulación de la progresión del ciclo celular, más precisamente estimulando el ingreso de la célula a la fase M del ciclo. La entrada de la célula a la mitosis es controlada por la activación de CDK1, cuya actividad es regulada de forma directa por las ciclinas mitóticas (ciclinas A y B) y por la fosfatasa Cdc25 [132]. La cascada de señalización disparada por la maquinaria que chequea la concreción de la síntesis de ADN y la correcta reparación del daño en el ADN (*checkpoint* de integridad del ADN) finaliza con las proteínas quinasas Wee-1 y Myt1, que fosforilan a CDK1 e inhiben su actividad. Estas fosforilaciones son contrarrestadas por acción

de la fosfatasa Cdc25, cuyo pico de actividad sucede durante la mitosis y responde a su fosforilación por la misma CDK1 y por la proteína *Polo-like kinase-1* (PLK1) [99]. A su vez, PLK1 fosforila a la proteína Wee-1 marcándola para que sea degradada vía proteasoma [133]. Para encontrarse activa, PLK1 debe ser fosforilada en un residuo treonina específico ubicado dentro de su sitio activo. La quinasa responsable de esto es la Aurora A [134], que en este caso actúa favorecida por un modulador positivo de su actividad y a la vez sustrato de ella, la proteína Bora [135, 136]. También existe evidencia de que la Aurora A es capaz de fosforilar directamente y contribuir a la activación de Cdc25 [137]. Ante daño al ADN los niveles celulares de Aurora A se incrementan y su actividad catalítica se ve inhibida [138], cerrándose de esta forma el circuito por el cual Aurora A contribuye a la regulación de la entrada a mitosis. Cuando la célula se encuentra preparada para dividir su ADN, la Aurora A se encuentra activa y fosforila a la proteína PLK1. Esta fosforilación promueve la activación de PLK1, que a su vez fosforila y activa a la fosfatasa Cdc25. Por último, se produce la desfosforilación y activación de CDK1 con la subsecuente progresión de la fase M. Si existe un daño en el ADN, se dispara la maquinaria que monitorea esto y la proteína Aurora A es inhibida. Por lo que toda la vía de señalización para que la célula ingrese en mitosis queda estancada.

Los niveles celulares de la Aurora A caen abruptamente hasta casi desaparecer al reingresar la célula en la fase G1. Esto se produce por la degradación de la proteína mediada por proteasoma. En este proceso se encuantra involucrada una proteína perteneciente a la familia de las E3 ligasas, denominada *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C) [139]. Este complejo es fundamental para la salida de la mitosis y el reinicio del ciclo celular, mediando la degradación de muchas proteínas de expresión y función específica durante la mitosis celular. Esta degradación de Aurora A en la salida de mitosis es en parte mediada por la propia PLK-1, que fosforila y activa al APC/C [140].

3.2. Aurora B

En humanos el gen Aurora B fue identificado por primera vez en un *screening* por PCR para quinasas que se encontraban sobreexpresadas en tumores [141]. Si la Aurora A es conocida como la “Aurora polar”, a la Aurora B se la conoce como la “Aurora ecuatorial”, por su localización en el plano medio de la célula en división. Esta Aurora forma un complejo, denominado *Chromosomal Passenger Complex* (CPC), junto a otras tres proteínas: *Inner Centromeric Protein* (INCENP), Survivina y Borelina [142]. De los cuatro miembros, Aurora-B es el único que posee actividad catalítica. Los otros tres miembros controlan la localización, la actividad enzimática y la estabilidad de la Aurora B [143]. El CPC muestra un comportamiento muy dinámico durante el transcurso de la mitosis, variando su localización en correlación a su participación en distintos procesos que se dan en forma secuencial durante la división celular. Al inicio de la mitosis el CPC se encuentra disperso por toda la cromatina; durante la prometafase se mueve desde los brazos de los cromosomas

hasta ubicarse en la cromatina centromérica; en la transición entre metafase y anafase localiza en los microtúbulos centrales del huso mitótico; para finalmente concentrarse en el plano medio de la célula durante la telofase y la citoquinesis. Estas localizaciones se correlacionan con las distintas funciones que cumple la Aurora B durante la mitosis: modificando histonas en la cromatina (profase), corrigiendo interacciones cinetocoros/microtúbulos erróneas (metafase), regulando la citoquinesis en el plano medio de la célula.

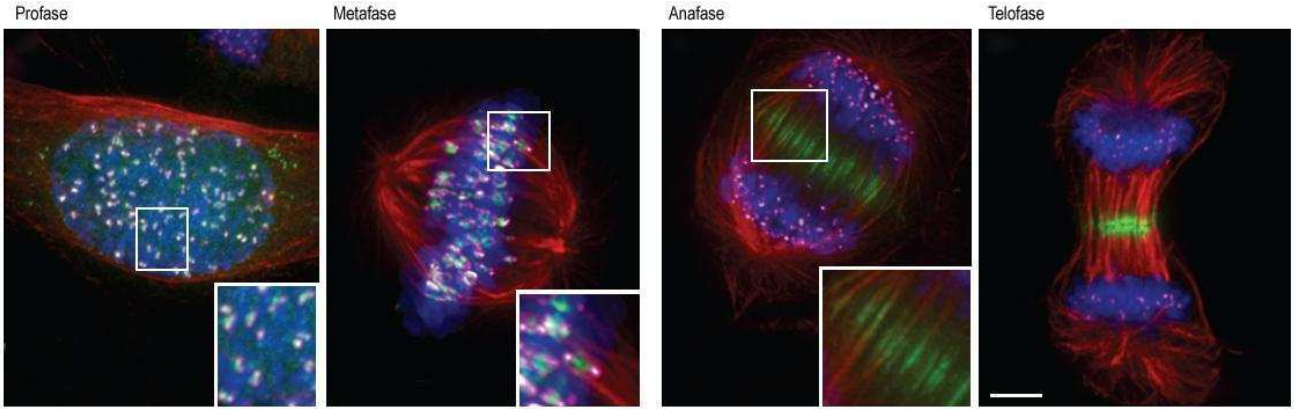


Figura 15. Localización del CPC durante la mitosis. Imagen de inmunofluorescencia en células HeLa durante distintos estadios de la mitosis, donde se muestra la localización de Aurora B (verde), cinetocoros (rosa), microtúbulos (rojo) y ADN (azul). Adaptado de [142].

Todo lo anterior demuestra que para que la división celular sea exitosa, Aurora B debe actuar sobre el sustrato correcto en el lugar correcto y en el momento preciso. Como se dijo más arriba, Aurora B es dirigida por sus distintas localizaciones subcelulares a través de su asociación con los otros componentes del CPC. La proteína que cohesiona a todo el complejo es INCENP, que interacciona con la Aurora B a través de su conservado dominio C-terminal y une a Survivina y Borelina por medio de su dominio N-terminal [144]. El modulo que se conforma entre el dominio N-terminal de INCENP más las proteínas Survivina y Borelina es el responsable de las distintas localizaciones que adopta el CPC a lo largo del ciclo celular [145]. Lo que determina, a su vez, hacia dónde se dirige el complejo y cuándo lo hace es resultado de distintas modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas INCENP, Borelina y Survivina [146-149]. Llamativamente, entre estas modificaciones se incluyen fosforilaciones mediadas por la misma Aurora B [150].

Aurora B muestra su pico de expresión durante la transición G2/M, y su actividad quinasa es máxima durante la mitosis [141, 151]. En la estimulación de la actividad de Aurora B cumple un rol fundamental su interacción con los otros componentes del CPC. La unión de Aurora B a INCENP provoca que la enzima incremente sus niveles de actividad y fosforile a la propia INCENP y un residuo treonina (posición 232) de su propio sitio activo, produciéndose de esta manera la activación completa de la Aurora B [152]. Desde un punto de vista del mecanismo, la unión a

INCENP provoca un cambio conformacional de Aurora B y esto es lo que provoca el aumento en la actividad de esta enzima. Otras quinasas son capaces de fosforilar a la Aurora B, o a algún otro componente del CPC, y provocar un aumento en el poder catalítico de la enzima [153, 154].

Al inicio de la mitosis el CPC se puede observar disperso en la cromatina y aquí es donde cumple con su primera función. La Aurora B cataliza la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10), la cual es una marca epigenética clásica de los cromosomas mitóticos [155]. En un principio se creía que esta modificación disparaba *per se* la condensación de los cromosomas previa a la mitosis. Sin embargo, hoy en día se cree que el papel que juega el CPC en la arquitectura de los cromosomas mitóticos es a través del reclutamiento de la proteína condensina [156]. Por otra parte, la fosforilación de H3S10 promueve la disociación del CPC de los brazos cromosómicos para su relocalización en los centrómeros. La marca centromérica para el reclutamiento del CPC es la fosforilación de la treonina 3 de la histona H3 y la treonina 120 de la histona H2A (H3T3 y H2AT120, respectivamente) [157]. Justamente es la propia Aurora B la que promueve de forma indirecta la fosforilación de estos residuos.

Una vez que la membrana nuclear de deshace durante la profase, los cromosomas comienzan a unirse con los microtúbulos polares del huso. En un principio esta interacción es desordenada y se forman interacciones cinetocoro/microtúbulo “monotélicas” (un cinetocoro hermano unido y otro libre). A medida que prosigue la mitosis, el cinetocoro libre se une a un microtúbulo del polo opuesto formando una interacción cinetocoro/microtúbulo “anfitélica” (cada cinetocoro hermano unido a microtúbulos de polos opuestos). Al final esto resulta en el posicionamiento de los cromosomas metafásicos en el plano medio entre los dos polos opuestos del huso (plano metafásico). Puede suceder que ambos cinetocoros hermanos se unan a microtúbulos pertenecientes al mismo polo del huso (interacción "sintélica") o bien que uno de los cinetocoros hermanos se una a dos microtúbulos provenientes de polos opuestos (interacción merotélicas), provocando que el cromosoma no pueda ubicarse en el plano metafásico. El CPC actúa desestabilizando y reparando estas interacciones erróneas. Aurora B fosforila distintas proteínas componentes del cinetocoro produciendo una disminución de su afinidad por los microtúbulos y también inhibe en estas regiones la acción de proteínas estabilizadoras de microtúbulos [158]. Paralelo a esto, la actividad enzimática de Aurora B es necesaria para el reclutamiento hacia los cinetocoros de distintos componentes del *checkpoint* del huso mitótico [159]. Cuando la interacción anfitélica se establece, el empuje de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos provoca el alejamiento de los cinetocoros de la región interna de los centrómeros. Esto significa el alejamiento de la Aurora B respecto a sus sustratos, los cuales son desfosforilados por la proteína fosfatasa PP-1. Ahora la interacción cinetocoro/microtúbulo queda estabilizada y los cromosomas vi-orientados en el plano metafásico están preparados para segregar durante la anafase mitótica [160].

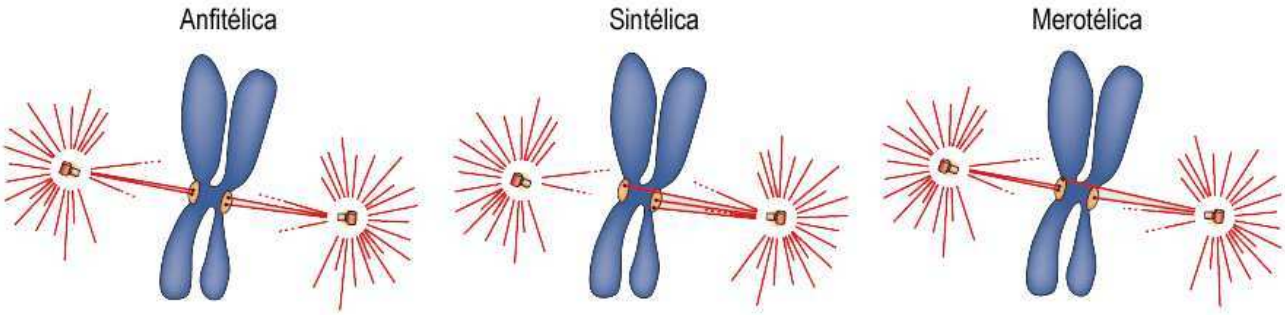


Figura 16. Esquema de las posibles interacciones cinetocoros/microtúbulos polares. Se muestran las tres posibles interacciones de los cromosomas mitóticos y lo microtúbulos polares del huso mitótico. 1) Anfitélica, cada cinetocoro hermano unido a un microtúbulos de polaridad opuesta. 2) Sintélica, los dos cinetocoros hermanos unidos a microtúbulos provenientes del mismo polo. 3) Merotélicas, uno de los cinetocoros hermanos unido a dos microtúbulos de polaridad opuesta.

Mientras que las cromátidas hermanas son atraídas hacia polos opuestos al comienzo de la anafase, el CPC pasa a localizarse en la región central del huso mitótico. Esta relocalización se da a expensas de la remoción activa de este complejo desde los cromosomas, en parte producto de la ubiquitinación de la Aurora B [161]. A la vez que el anclado de este complejo a la región central del huso requiere la interacción de INCENP y la Aurora B con proteínas de la familia de las kinesinas [162]. El CPC favorece la formación de la región central del huso a través de la actividad enzimática de Aurora B, que fosforila a distintas proteínas encargadas del agrupamiento de los microtúbulos y la estabilización de esta región [163]. Hacia el final de la anafase el CPC también se localiza en el cortex ecuatorial y, finalmente, se concentra en el cuerpo medio de la célula durante la telofase y la citoquinesis [142]. La citoquinesis requiere del ensamblado y constricción de un anillo contráctil en el plano ecuatorial de la célula. Este anillo está compuesto por actina, miosina y otras clases de filamentos citoesqueléticos. La constricción de este anillo se encuentra bien coordinada con el proceso de segregación de los cromosomas para asegurar que cada célula hija reciba la carga genética que le corresponde. El CPC desarrolla un papel fundamental en esta coordinación actuando sobre distintos procesos: reclutando distintos factores a la región central del huso que favorecen el ensamblado del anillo contráctil; fosforilando a través de Aurora B a distintas proteínas asociadas a microtúbulos, favoreciendo la interacción de estas con el citoesqueleto; contribuyendo al ingreso del surco de clivaje mediante la regulación del ensamblado de filamentos intermedios [158, 164].

La Aurora B, que muestra su pico de expresión durante la división celular, es degradada al inicio de la fase G1 mediante la acción del proteasoma. La ubiquitinación de esta proteína es llevada a cabo por el complejo APC/C [165] al igual que sucede con Aurora A y otras proteínas involucradas en la regulación de procesos mitóticos.

3.3. Aurora C

La Aurora quinasa C muestra una expresión localizada en células germinales masculinas y parece estar involucrada en la división meiótica, cumpliendo una función similar a la de la Aurora B en mitosis. De hecho, Aurora C es capaz de comportarse como la Aurora B y rescatar el fenotipo de células somáticas *knock out* para esta enzima [166]. La Aurora C es necesaria para la espermatogénesis y su mutación lleva a infertilidad masculina debido a la generación de espermatozoides poliploides [167].

3.4. Proteínas Aurora quinasa en eucariotas inferiores

En organismos eucariotas inferiores también fueron identificados y, en algunos casos, estudiados los genes Aurora quinasa. Entre estos organismos se encuentran el alga biflagelada *Chlamydomonas*, el mycetozoa *Dictyostelium discoideum* y distintas familias de parásitos. En Chlamydomonas el único gen Aurora identificado tiene un rol preponderante en los procesos celulares morfogenéticos que regulan el comportamiento del flagelo [168]. En D*. discoideum* también fue descripto un único gen Aurora quinasa, que posee características funcionales tanto de la Aurora A como de la Aurora B [169]. Este gen muestra una localización dual durante la mitosis, donde se ubica tanto en los centrosomas como en asociación con los cromosomas. También forma un complejo con un gen homólogo de INCENP, y este complejo muestra una localización y un comportamiento dinámico similar al que desarrolla la Aurora B humana.

Dentro de los parásitos, en distintos organismos se detectaron genes de la familia Aurora quinasa. En algunos organismos sólo se identificó a estos genes, mientras que ningún ensayo funcional fue realizado. Este es el caso del único gen quinasa que posee el kinetoplástido *Leishmania major*, el cual fue identificado en el año 2001 [170] y a partir de allí no se desarrolló ningún trabajo que estudie su función. Otro parásito donde se identificaron genes Aurora, pero poco se sabe de su funcionalidad, es el apicomplexa *Plasmodium falciparum* [171]. En éste fueron detectados tres genes Aurora (Pfark-1, -2 y -3), y el estudio funcional realizado sobre estas proteínas es muy preliminar y sólo se basó en la expresión de las mismas fusionadas a GFP para ver su localización subcelular. Mientras los autores definen a Pfark-1 como un gen Aurora típico de otros organismos en su comportamiento, a los otros dos les adjudican una función más específica con la biología particular de este organismo. Un trabajo más profundo se realizó sobre el único gen Aurora identificado en el protozoo binucleado *Giardia lamblia* [172]. Este gen Aurora también muestra un comportamiento dual mostrando una localización similar a lo observado para las Auroras A y B. Sin embargo, el rol más importante que le atribuyen a esta enzima es el de localizar en estructuras citoesqueléticas exclusivas de este organismo (discos parentales), y a partir de allí involucrarse en el desensamblado y reorganización de los microtúbulos durante la mitosis. También le otorgan a la enzima funciones extramitóticas relacionadas con la dinámica de los microtúbulos.

En *Trypanosoma brucei* tres genes Aurora fueron identificados [173]. Al silenciar por ARNi estos genes, sólo con uno se observó un efecto fenotípico determinante que consistió en el arresto de las células en las fases G2/M. En base a este resultado, los autores definen a este gen (TbAUK1) como el único gen Aurora funcional en este organismo. A partir de este primer trabajo se sucedieron otros, en los cuales se fue ampliando cada vez más el conocimiento sobre la funcionalidad de esta enzima. En este primer trabajo se analizó la función de la proteína en la forma procíclica del parásito. Células con TbAUK1 silenciada mostraron impedimento de iniciar la mitosis nuclear y la citoquinesis. Estudios de localización de la proteína mostraron que la misma se asocia el huso mitótico durante la mitosis, que junto al hecho que las células silenciadas son incapaces de formar el huso, hace concluir a los autores que TbAUK1 cumple un rol importante en el ensamblado del huso y que sería el homólogo funcional a la Aurora B humana. Vale la pena mencionar que el estudio de localización lo realizaron sobre células que sobreexpresaban TbAUK1 fusionada a un tag de HA y que ésta sobreexpresión no provocó alteración aparente en el fenotipo celular. En un segundo trabajo los autores estudiaron el rol de TbAUK1 en la forma sanguínea de *T. brucei* [174]. Nuevamente mediante la sobreexpresión de la enzima fusionada a HA, observaron que ésta mostraba la misma localización que en la forma procíclica y tampoco producía un efecto en el fenotipo celular. Sin embargo, el silenciamiento del gen por ARNi produjo un fenotipo en algunos aspectos distinto al observado en la forma procíclica. Las células silenciadas mostraban una aberración en la carga cromosómica bastante más severa que en el caso de la forma procíclica, con la presencia de múltiples kinetoplastos y de voluminosos agregados nucleares poliploides. Los autores concluyen en este caso que la ausencia de TbAUK1 produce múltiples rondas de síntesis del ADN nuclear sin segregación de la cromatina (por ausencia de huso mitótico) y también múltiples rondas de duplicación del kinetoplasto sin que pueda realizarse la citoquinesis. La diferencia respecto a la forma procíclica es que el núcleo no se ve impedido de seguir duplicando su ADN y que la duplicación del kinetoplasto no se encuentra acoplada a la citoquinesis. Por otra parte, en esta forma sanguínea silenciada aparecieron efectos a nivel estructural, con células que adquirieron una forma redondeada en su parte posterior consecuencia de una desorganización de las fibras de microtúbulos. En base a todo lo observado los autores concluyeron que en la forma sanguínea, la ausencia de TbAUK1 afecta la mitosis en un nivel distinto que en la forma procíclica y que TbAUK1 parece jugar un rol en la regulación de la dinámica del citoesqueleto teniendo un efecto directo sobre la organización de los microtúbulos. Basándose en el antecedente de que la Aurora B forma el complejo CPC, en un siguiente trabajo los autores estudiaron si TbAUK1 se encontraba acomplejada a otras proteínas [175]. Mediante marcado endógeno, purificación por afinidad y posterior cromatografía líquida seguida de espectrometría de masa, los autores lograron identificar cuatro proteínas que interaccionan con TbAUK1 (TbKIN-A, TbKIN-B, TbCPC1 y TbCPC2). TbKIN-A y -B mostraron ser proteínas tipo kinesinas, mientras que TbCPC1 y TbCPC2 son proteínas sin ningún ortólogo en organismos

superiores pero que se encuentran muy bien conservadas entre los kinetoplástidos. Mediante distintos ensayos para confirmar la interacción entre estas proteínas y TbAUK1, más estudios de localización subcelular para las distintas proteínas, los autores concluyeron que: i) TbKIN-A y -B no conforman un complejo estable con TbAUK1, pero si son importantes para la localización de TbAUK1 en los cromosomas y el huso mitótico; ii) TbCPC1 y TbCPC2 conforman un complejo con TbAUK1 al estilo del CPC de metazoos, donde las tres proteínas se mantienen fuertemente asociadas durante todo el transcurso de la mitosis y la citocinesis.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La familia de proteínas Aurora quinasas participa de la regulación de procesos relacionados con el desarrollo del ciclo de vida y la diferenciación entre estadios en el parásito responsable de la Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general avanzar en la elucidación de procesos vitales en el desarrollo del ciclo de vida de *T. cruzi*, como lo son la progresión del ciclo celular y la diferenciación entre estadios. Para cumplir con este objetivo general se estudiara, más específicamente, la familia de proteínas Aurora quinasas abordando los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar el patrón de expresión de la familia de proteínas Aurora quinasa en las diferentes formas presentes durante el ciclo de vida de *T. cruzi*.
2. Estudiar la localización subcelular de las Aurora quinasas en *T. cruzi*. Dentro de este objetivo particular, también se propone estudiar posibles variaciones de su localización durante las diferentes etapas del ciclo celular.
3. Iniciar la caracterización funcional de esta familia de proteínas mediante su sobreexpresión en la forma epimastigote del parásito y posterior análisis fenotípico.
4. Búsqueda de posibles sustratos endógenos para las Aurora quinasa de *T. cruzi*.

Teniendo en cuenta que los objetivos antes expuestos aportarían información sobre la regulación de procesos claves en el ciclo de vida del *T. cruzi*, se propone como un objetivo suplementario poner en evidencia nuevos blancos terapéuticos que puedan ser utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, y eventualmente otras tripanosomiasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1. Soluciones

- Buffer PBS 10 X: NaCl 8% (m/v); KCl 0,2% (m/v); Na_2HPO_4 1,4% (m/v); KH_2PO_4 0,2% (m/v).
- PBT: buffer PBS 1 X; Tritón X-100 0,2% (v/v).
- Buffer TBS 10 X: Tris-HCl 0,5 M pH 7,40; NaCl 1,5 M.
- TBS-T: Buffer TBS 1 X; Tween 0,05% (v/v).
- Buffer CHURCH: buffer fosfato 0,25 M pH 7,20; EDTA 1 mM; BSA 1% (m/v); SDS 7% (m/v).
- Buffer MOPS 10 X: MOPS 0,2 M; $NaCH_3CO_2$ 80 mM pH 7,00; EDTA 10 mM.
- Tris-Glicina 10X: Tris base 0,25 M; glicina 1,92 M.
- TAE 50 X: Tris base 24,2% (m/v); ácido acético glacial 5,71% (v/v); EDTA 50 mM pH 8,00.
- Buffer TE 10 X: Tris-HCl 0,1 M pH 8,00; EDTA 10 mM.
- Buffer de corrida en SDS-PAGE: Tris-Glicina 1 X; SDS 0,1%.
- Buffer de electrotransferencia de proteínas: Tris-Glicina 1 X; metanol 20%.
- Solución de bloqueo en Western blot: TBS-T 1 X; leche descremada en polvo 5%.
- Solución de bloqueo en Inmunofluorescencia: PBS 1 X; BSA 1%.
- Rojo Ponceau S: Rojo Ponceau S 0,5 % (m/v); metanol 40%; acido acético 10%.
- Azul Coomassie para tinción de SDS-PAGE: Coomassie R-250 0,1% (m/v); metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v).
- Solución de desteñido SDS-PAGE: Metanol 45% (v/v); ácido acético 10% (v/v).
- Arul Coomassie coloidal: Metanol 18% (v/v); $(NH_4)_2SO_4$ 17% (m/v); H_3PO_4 2% (v/v); Coomassie Blue G-250 0,5 g/L.
- TFB I: KCH_3CO_2 30 mM; $MnCl_2$ 50 mM; KCl 0,1 M; $CaCl_2$ 10 mM; glicerol 15% (v/v). Ajustar a pH 5,80 con ácido acético 0,2 M.
- TFB II: MOPS 10 mM; $CaCl_2$ 75 mM; KCl 10 mM; glicerol 15% (v/v). Ajustar a pH 7,00 con NaOH 1 M.
- Buffer de electroporación epimastigotes de *T. cruzi*: PBS 1X; $CaCl_2$ 0,1 mM; $MgCl_2$ 0,5 mM.
- Solución 1: Tris-HCl 25 mM pH 8,00; EDTA 10 mM; glucosa 50 mM.
- Solución 2: NaOH 0,2% (m/v); SDS 1% (m/v).
- Solución 3: KCH_3CO_2 3 M. Ajustar pH a 5,20 con ácido acético glacial.

- Buffer de siembra para proteínas 5X: Tris-HCl 0,3 M pH 6,80; SDS 10% (m/v); glicerol 50% (v/v); azul de bromofenol 0,002% (m/v); DTT 0,15 M.
- Buffer de siembra para ADN 6X: azul de bromofenol 0,26% (m/v); xylen cyanol 0,25% (m/v); glicerol 30% (v/v).
- Buffer de siembra para ARN 2X (para volumen final de 610 µl): formamida 400 µl; buffer MOPS 80 µl; formaldehido 122 µl; azul de bromofenol 1,5 mg; bromuro de etidio 8 µl.
- Buffer HANK's: KCl 5,4 mM; Na_2HPO_4 0,3 mM; KH_2PO_4 0,4 mM; $NaHCO_3$ 4,2 mM; NaCl 0,137 M; glucosa 5,6 mM.
- Solución de Tripsina: Tripsina 0,25% en buffer HANK's.
- Mezcla 30% acrilamida: acrilamida 29% (m/v); N,N'-metilenbisacrilamida 1% (m/v).
- Solución para preparar geles resolutivos para SDS-PAGE con Tris-glicina: cantidad necesaria de mezcla 30% acrilamida; Tris pH 8,80 0,375 M; SDS 0,1% (m/v); persulfato de amonio 0,1% (m/v); TEMED 0,04% (v/v).
- Solución para preparar geles concentradores 5% para SDS-PAGE con Tris-glicina: mezcla 30% acrilamida 17% (v/v); Tris pH 6,80 0,13 M; SDS 0,1% (m/v); persulfato de amonio 0,1% (m/v); TEMED 0,1% (v/v).

1.2. Medios de cultivo

- LB: peptona de carne 1% (m/v); extracto de levaduras 0,5% (m/v); NaCl 1% (m/v).
- LB-Agar: LB; agar 1,5% (m/v).
- 2xYT: peptona de carne 1,6% (m/v); extracto de levadura 1% (m/v); NaCl 0,5% (m/v).
- SOB: peptona de carne 2% (m/v); extracto de levadura 0,5% (m/v); NaCl 0,05% (m/v); KCl 2,5 mM; $MgCl_2$ 10 mM.
- LIT: *Liver Infusion* (Difco) 0,5% (m/v); triptosa 0,5% (m/v); NaCl 0,4% (m/v); KCl 0,04% (m/v); Na_2HPO_4 0,8% (m/v); ajustar pH a 7,2.
- BHT: *Brain Heart Infusion* (Difco) 3,3% (m/v); triptosa 0,3% (m/v); Na_2HPO_4 0,4% (m/v); KCl 0,04% (m/v); glucosa 0,03% (m/v).
- YPAD: Extracto de levadura (Difco) 1% (m/v); peptona de carne 2% (m/v); adenina 0,01% (m/v); glucosa 2% (m/v). Para medio sólido también se agregó agar a concentración final 2% (m/v).
- SD –U: *Yeast Nitrogen Base* (sin aminoácidos, Sigma) 0,67% (m/v); ácido succínico 1% (m/v); NaOH 0,6% (m/v); *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement without uracil* 0,0192% (m/v); glucosa 2% (m/v). Para medio sólido también se agregó agar a concentración final 2% (m/v).
- Iscove´s Modified Dulbecco's Medium (DMEM) de Gibco.

- Minimum Essential Medium (MEM) de Gibco.

2. Herramientas moleculares

2.1. Cepas bacterianas

- E. coli DH5 α: *F'/endA1, hsdR17, supE44, thi-1 recA1, gyrA relA1 ΔlacIZYA-argFU169 deoR (Δ80dlacΔ(lacZ)M15).*
- E. coli BL21 (DE3): *F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm (DE3).*
- E. coli BL21 (DE3) pLysS: *F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R).*
- E. coli Origami B: *F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm lacY1 aphC gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R).*

2.2. Cepas de levaduras

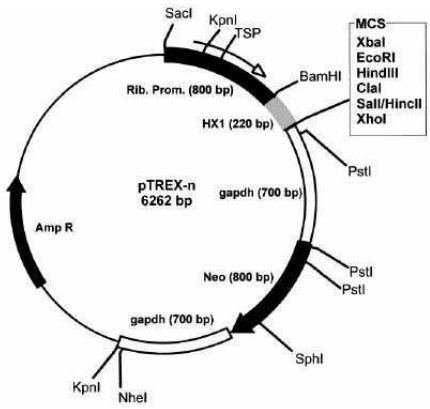
- KT1113: MATα leu2 ura3 his3
- KT1829: MATα leu2 ura3 his3 ipl1-2

2.3. Líneas celulares de mamíferos

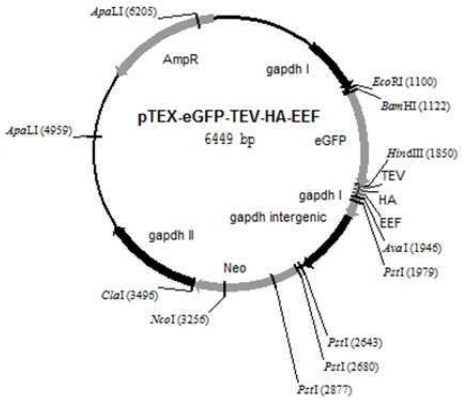
- Células VERO
- Células HEK293T

2.4. Vectores

- pET22b(+)® de Novagen.
- pGEM®-T Easy de Promega.
- pCR™II-TOPO® de Invitrogen.
- pGEX®4T3 de GE Healthcare.
- pCMV-Tag 2B® de Stratagene.
- p416-GPD y p426-GPD [176].
- pTREX [177].



- pTEX-eGFP-TEV-HA-EEF modificación del vector construido por John M. Kelly y colaboradores [178].



2.5. Primers

Identificación	Secuencia 5'⟶3'
AUK1-RT-Rev	CCACCCAAAGTCTGCCAACTTA
AUK2_SyL-RT-Rev	AGCGTGCGGTGAACGTTGATCT
TcAUK2s_Seq-Fwd	CGGTTCTTACTCCGTGGTGGTT
TcAUK2L_Seq-Fwd	ATCCCAATGTGGTTCGTATGCT
AUK3-RT-Rev	AATCCATCGTGCCGCAAAGCGT
TcAUK3_Seq-Fwd	GCTCTCAGCACTCGCCTTCCT
TcAUK3_Seq-Rev	TCCGAAAGAGAACGACTGCAA
Tc-SL	AACGCTATTATTGATACAGTTTC
TcAUK1_NcoI-Fwd-pET	CCATGGTGAGTGCGGCGGAGGGCGGCCAA
TcAUK1_XhoI-Rev-pET	CTCGAGGTTCTCCTTTCCGCCCGAGAAGT
TcAUK2_BamHI-Fwd-pET	GGATCCGCAGCACCACAACTTGAGTTCC
TcAUK2_XhoI-Rev-pET	CTCGAGCTTCTTCTTCTTCTTCTCCCCATTT
TcAUK3_NcoI-Fwd-pET	CCATGGTGTGGTCGCTGGATGACTTTGAT
TcAUK3_XhoI-Rev-pET	CTCGAGTAAATTCTCTGCCGCATCAACCGT
AUK1-pCMV2B-Fwd_BamHI	GGATCCATGAGTGCGGCGGAGGGCGGCCAA
AUK1-pCMV-Rev_XhoI	CTCGAGTTAGTTCTCCTTTCCGCCCGAGAA
AUK3-pCMV2B-Fwd_BamHI	GGATCCATGTGGTCGCTGGATGACTTTGAT
AUK3-pCMV2B-Rev-XhoI	CTCGAGCTATAAATTCTCTGCCGCATCAACCG
AUK1_TxE_Fwd	CACAACCGCCGGAAGGAGTCCTGCGGCACACCG
AUK1_TxE_Rev	CGGTGTGCCGCAGGACTCCTTCCGGCGGTTGTG
AUK2 SyL_TxD_Fwd	GGCCGAGGTCGGCTGGATGTCTGTGGCACACTG
AUK2 SyL_TxD_Rev	CAGTGTGCCACAGACATCCAGCCGACCTCGGCC
AUK3_TxE_Fwd	CACTCCCGTCGCTACGAGCTTTGCGGCACGATG
AUK3_TxE_Rev	CATCGTGCCGCAAAGCTCGTAGCGACGGGAGTG
AUK1-pTREX-fwd-HindIII	AAGCTTATGAGTGCGGCGGAGGGCGGCCA
AUK1-GFPct-rev-Sal I	GTCGACTTGTTCTCCTTTCCGCCCGAGAA

TcActina_Fwd	ATGATCATCGTGGACTTTGGGT
TcActina_RT	TTCCGCTTGGGTGTGAACAGC
GFP_Fwd_BamHI	GGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC
GFP_Rev_STOPLess	TTTGTATAGTTCATCCATGCCAT
Rev_GFP_Fwd_AUK1	TGGCATGGATGAACTATACAAAAGTGCGGCGGAGGGCGGCCAA
TcAUK1-Rev-STOPLess-BamHI	GGATCCGTTCTCCTTTCCGCCCGAGAAGTCC
TcAUK2-Rev-STOPLess-BamHI	GGATCCCTTCTTCTTCTTCTTCTCCCCATTTTGTC
TcAUK3-Rev-STOPLess-BamHI	GGATCCTAAATTCTCTGCCGCATCAACCGTGC
TcAUK2-Fwd	ATGTGGCAGCACCACAACTGGAGTTCCCC
TcAUK3-Fwd	ATGTGGTCGCTGGATGACTTTGATATTGGGAGG
AUK2_Fwd_BamHI_ATG	GGATCCATGTGGCAGCACCACAACTTGA
AUK2_Rev_XhoI_Stop	CTCGAGTTACTTCTTCTTCTTCTTCTCCCCA

2.6. Anticuerpos

Descripción	Proveedor
Mouse monoclonal anti-polyHistidine clone HIS-1	Sigma-Aldrich
Rabbit polyclonal anti-GST	Abcam®
Mouse monoclonal anti-GFP clone B-2	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit polyclonal anti-FLAG	Sigma-Aldrich
Mouse monoclonal anti-β-Tubulin clone KMX-1	Chemicon International®
Rat monoclonal anti-α-Tubulin Tyrosinated (YL 1/2)	Pierce Antibodies
Rabbit polyclonal anti-TcAUK1	Genscript
Rabbit polyclonal anti-TcAUK2	Genscript
Rabbit polyclonal anti TcAUK3	Genscript
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG HRP-Labeled	PerkinElmer
Goat polyclonal anti-Mouse IgG HRP-Labeled	PerkinElmer
Goat polyclonal anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 594-Labeled	Invitrogen
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 594-Labeled	Invitrogen
Mouse monoclonal anti-PFR1 clone L13D6	Gentileza Dr. Heith Gull

3. Clonado de genes y expresión de proteínas recombinantes

3.1. Manipulación de bacterias

- **Preparación de *E. coli* competentes para transformación química (Método de Hannahan).**

A partir de una colonia aislada de placa LB-Agar se inoculó un cultivo inicial de 10 ml de LB y se dejó crecer toda la noche a 37 ºC en agitación. Al día siguiente, con 1 ml de este cultivo, se inocularon 100 ml de LB fresco y se dejó crecer a 37 ºC en agitación hasta que el cultivo alcanzó una D. O. a 600 nm (OD_{600}) de 0,5. En ese momento el cultivo se centrifugó

a 2.400 rpm por 10 min y a 4 °C, descartándose el sobrenadante. El precipitado de bacterias se resuspendió en 30 ml de la solución TFB I, previamente enfriada, y se incubó 10 min en hielo. Luego se centrifugó nuevamente a 2.400 rpm por 10 min y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en 4 ml de la solución TFB II cuidadosamente mientras se mantenía en frío durante 15 min. La suspensión bacteriana se distribuyó en alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf de 1,5 ml previamente enfriados. Las alícuotas fueron inmediatamente volcadas en N_2 líquido y luego guardadas a -80°C.

- **Preparación de *E. coli* ultracompetentes.**

A partir de una colonia aislada de placa LB-Agar se inocularon 6,25 ml de LB y se incubó durante 6-8 hs a 37°C en agitación. Al final de la tarde, tres Erlenmeyer con 62,5 ml de medio SOB fueron inoculados con tres volúmenes distintos del cultivo crecido durante el día: 0,5 ml, 1 ml y 2 ml. Estos tres cultivos se incubaron toda la noche a 20°C en agitación. A la mañana siguiente se midió la OD_{600} de los tres cultivos y se eligió aquel que poseía un valor de 0,55, mientras que los dos restantes fueron descartados. El cultivo seleccionado se centrifugó a 3.900 rpm (rotor Sorval GSA) por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en 20 ml de *Inoue Trasnformation Buffer* (HEPES 10 mM pH 6,70; $MnCl_2$ 55 mM; $CaCl_2$ 15 mM; KCl 0,25 M) previamente enfriado. La suspensión fue centrifugada a 3.900 rpm (rotor Sorval GSA), el sobrenadante descartado y el precipitado resuspendido en 5 ml de *Inoue Trasnformation Buffer* frío. A la suspensión se le agregó 0,375 ml de DMSO, mezclándose bien, y se dejó reposar 10 min en hielo. Luego, la suspensión fue distribuida en alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se pasó rápido a N_2 líquido, para luego guardar a -80°C.

- **Transformación bacteriana por *shock* térmico.**

Una alícuota de bacterias *E. coli* competentes se descongeló en hielo. Luego se agregó ADN plasmídico (la masa se ajustó dependiendo de la cepa bacteriana) o mezcla de ligación, y se incubó en hielo durante 20 min. Las bacterias fueron expuestas a 42°C durante 60 segundos y se dejaron recuperar durante 5 min en hielo. Luego se agregaron 0,8 ml de LB fresco y se incubaron durante 40 min a 37°C. Luego la suspensión bacteriana se centrifugó durante 5 min a 5.000 rpm y el sobrenadante fue descartado, dejando un remanente de 0,1 ml. El precipitado bacteriano se resuspendió en este volumen y las bacterias fueron sembradas en placas de LB suplementado con el antibiótico correspondiente como marcador de selección (Ampicilina 50 µg/ml, Kanamcina 30 µg/ml,

Tetraciclina 12 µg/ml, Cloranfenicol 20 µg/ml, Streptomicina 30 µg/ml). Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C hasta observar el crecimiento de colonias.

- **Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en sistema bacteriano.**

A partir de una colonia aislada de placa de cultivo LB-Agar-antibiótico se inoculó 3-10 ml de medio fresco suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, con este cultivo se inoculó medio fresco (en una proporción 1:25) y se dejó crecer a 37°C hasta una OD_{600} de 0,5. En ese momento el cultivo fue inducido con el agregado de *Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside* (IPTG), ajustando las condiciones de inducción (concentración de IPTG, temperatura de incubación y tiempo de inducción) según el objetivo propuesto, la cepa bacteriana, el vector de expresión y la proteína recombinante expresada. Una vez finalizado el tiempo de inducción, el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 10 min y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se guardó a -20 °C hasta el momento de la lisis.

- **Lisis bacteriana para obtención de extracto proteico.**

El precipitado bacteriano fue resuspendido en buffer de lisis (Tris 20 mM pH 8,00; NaCl 0,3 M; $MgCl_2$ 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; NP-40 0,2%) frío y se le agregó lisozyma (Fluka) a una concentración de 1 mg/ml y se incubó por 30 min en hielo. Posteriormente la suspensión se sonicó por 6 ciclos de 10 seg a alta intensidad y se centrifugó a 3.000 xg por 15 min a 4°C. El sobrenadante, conteniendo a la proteína recombinante en su forma nativa, fue separado del precipitado, donde se encuentran los restos celulares y proteína recombinante en forma de cuerpos de inclusión.

3.2. Manipulación de ácidos nucleicos

- **Miniprep de plásmidos.**

Una colonia bacteriana aislada de placa LB-Agar fue crecida toda la noche a 37°C en 3 ml de medio líquido fresco (suplementado con el antibiótico correspondiente). Al día siguiente el cultivo se centrifugó por 10 min a 4.000 rpm y el sobrenadante fue descartado. El precipitado bacteriano se resuspendió exhaustivamente en 200 µl de solución 1, luego se agregó 300 µl de solución 2 (preparada en el momento) y se mezcló bien agitando suavemente por inversión. Luego se incubó por 5 min en hielo y se agregó 300 µl de solución 3, mezclándose vigorosamente por inversión del tubo Eppendorf. Se dejó reposar 5 min en hielo y luego se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf, se agregó RNAsa (50 µg/ml) y se incubó por 60 min a 37°C. Luego se realizaron dos extracciones consecutivas con 400 µl de cloroformo:alcohol

isoamílico (24:1), cada vez mezclando y separando las fases por centrifugación. Posteriormente el ADN plasmídico se precipitó con el agregado de un volumen de 2-propanol y centrifugación por 30 min a 13.000 rpm. El precipitado fue lavado dos veces con etanol al 70% y resuspendido en 50 µl de agua hexadestilada.

- **Maxipreparación de plásmidos.**

Se utilizó el kit comercial PureYield™ Plasmid Maxiprep System de la marca Promega, siguiendo los pasos especificados en el protocolo descripto en el manual del producto.

- **Extracción de ADN genómico.**

Un cultivo con un número total de 1-2x10^8 epimastigotes fue centrifugado a 1.500 xg por 5 min, descartándose el sobrenadante. El precipitado de parásitos se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 0,01 M pH 7, 50; EDTA 0,1 M; SDS 1% (m/v)) y luego se realizaron dos extracciones con 0,5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en relación 25:24:1 (PIC), cada vez mezclando y separando las fases por centrifugación a 13.000 rpm por 2 min. Luego de la última extracción, la fase acuosa se traspasó a un nuevo tubo y se incubó durante 2 hs a 37 °C con RNAsa (50 µg/ml). Se realizó una nueva extracción con PIC y otra con fenol-cloroformo (24:1). A la fase acuosa separa de esta última extracción se le agregó un volumen de 2-propanol y se centrifugó por 20 min a 13200 rpm. Se descartó el sobrenadante, y al precipitado de ADN se le hizo dos lavados con 1 ml de etanol al 70%. Luego de dejar secar el precipitado se lo resuspendió en 100-200 µl de agua libre de nucleasas.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Las reacciones de PCR se realizaron con Taq polimerasa (Invitrogen), o Herculasa II (Stratagen) en caso de requerir alta fidelidad. La temperatura de *annealing* se ajustó a los *primers* utilizados y el tiempo de elongación se ajustó a la longitud de fragmento a amplificar. Cuando el templado fue ADN plasmídico la masa utilizada por reacción fue de 10 ng, mientras que cuando el templado fue ADN genómico la masa del mismo por reacción fue de 200-500 ng. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl con la siguiente composición:

Componente	Volumen (µl)	Concentración final
PCR buffer 10x	5	1x
Mezcla de dNTPs 10 mM	1	0,2 mM cada uno
$MgCl_2$ 50 mM	2	2 mM
Primer forward 10 µM	1	0,2 µM

Primer reverse 10 µM	1	0,2 µM
Templado ADN	*c.n.*	*n/a*
ADN polimerasa	*c.n.*	2,5 unidades
Agua destilada	*c.s.p.* 50 µl	*n/a*

c.n. cantidad necesaria; *c.s.p.* cantidad suficiente para; *n/a* no aplicable.

- **Subclonado de fragmentos de PCR**

Todos los fragmentos de PCR fueron subclonados en uno de los siguientes vectores: pCR™II-TOPO® o pGEM®-T Easy. El subclonado se realizó según el protocolo provisto por cada fabricante. Todos los genes amplificados e insertados en estos vectores fueron enviados a secuenciar para confirmar la fidelidad de la amplificación. Una vez obtenidas las secuencias, se eligió un clon para proseguir con el clonado en los vectores destinos finales.

- **Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción.**

0,5 µg de ADN fue digerido con enzimas de restricción de la marca New England Biolabs (2,5 unidades). En la mezcla de reacción se incluyó el buffer compatible con la enzima y, en caso de corresponder, BSA a una concentración final de 0,1 mg/ml. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl y se incubaron durante 3 hs a 37 °C. En caso de variar la masa de ADN a digerir, tanto las unidades de enzima como el volumen de reacción fueron modificados en forma proporcional.

- **Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

Se utilizó el kit de purificación Wizard SVGel and PCR clean-up system (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

- **Defosforilación de plásmidos.**

A la mezcla de reacción de la digestión de plásmidos con enzimas de restricción se la trató con la enzima *Antartic Phosphatase* (New England Biolab) para remover los grupos fosfato de los extremos 5' en los sitios de corte. Para esto, a los 25 µl de volumen de digestión se los llevó a 30 µl de volumen final con 3 µl de *Antartic Phosphatase Buffer 10 x*; 2,5 unidades de *Antartic Phosphatase* (0,5 µl); y 1,5 µl de agua. A esta mezcla se la incubó por 30 min a 37 °C y luego se inactivó a la enzima calentando la mezcla a 65°C por 5 min.

- **Ligación de fragmentos de ADN a plásmidos.**

Fragmentos de ADN purificados y plásmidos desfosforilados (50 ng), en una relación molar 3:1, fueron ligados con la enzima T_4 ligasa (Invitrogen). En cada reacción de ligación se

utilizaron 0,5 unidades de enzima y se complementó con el buffer provisto por la empresa. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10-15 µl durante toda la noche a 16°C.

- **Confirmación de construcciones positivas de clonado**

Las colonias crecidas en placas LB-Agar (con antibiótico) luego de haber sido transformadas con mezcla de ligación fueron picadas a 3 ml de LB líquido complementado con antibiótico. Luego de haber crecido toda la noche a 37°C en agitación, se tomaron 100 µl de cultivo y se pasaron a tubo Eppendorf. A esto se le agregó 50 µl de PIC y 20 µl de buffer de siembra para ADN 6x, mezclándose bien todo por vortex. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm, y 20 µl del sobrenadante fueron sembrados en gel de agarosa 0,8%. Junto con las muestras a confirmar positividad se sembró una calle de bacterias transformadas con vector vacío (control negativo). Se identificaron como colonias potencialmente positivas aquellas en donde el ADN plasmídico presentaba una migración menor al control negativo en la corrida electroforética. A partir del volumen restante de los cultivos de las colonias potencialmente positivas se minipreparaon los plásmidos y se confirmó la presencia y, en caso de ser necesario, la orientación del inserto por digestión con enzimas de restricción.

4. Técnicas analíticas

4.1. Ácidos Nucleicos

- **Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

Los geles de agarosa se prepararon solubilizando la agarosa (Invitrogen) en buffer TAE 1 x y agregando bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Las muestras fueron resuspendidas en el volumen correspondiente de buffer de siembra para ADN 6 x y sembradas en el gel. La corrida se realizó a una intensidad de 5-10 V/cm, siendo el buffer de corrida TAE 1X. Los geles fueron observados en un transiluminador UVP y fotografiados.

- **Electroforesis de ARN en gel de agarosa**

El gel se preparó solubilizando 1,5 g de agarosa (Invitrogen) en una solución que contenía MOPS 1X y formaldehido 1,6% (v/v). Previo a ser sembrada, la solución de ARN fue mezclada con el volumen correspondiente de buffer de siembra para ARN 2X. La corrida se realizó a una intensidad de 5-10 V/cm en buffer MOPS 1X con formaldehido 1,6% (v/v). Los geles fueron observados en un transiluminador UVP y fotografiados.

- **Extracción de ARN total.**

$4x10^7$ parásitos se resuspendieron en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se agregó 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclándose por vortex. Luego de incubar 5 min en hielo se centrifugó a 12.000 xg por 15 min y a 4°C. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se agregó un volumen de 2-propanol. Se mezcló bien por inversión y se dejó precipitar el ARN por 30 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12.000 xg por 30 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Al precipitado de ARN se lo lavó con 1,5 ml de etanol al 75% y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco se resuspendió en 50-100 µl de agua DEPC. La integridad del ARN extraído se confirmó por electroforesis en gel de agarosa, en donde se distingue las tres bandas correspondientes al ARN ribosomal.

- **Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción para ensayo de Southern blot.**

ADN genómico extraído de epimastigotes de *T. cruzi* (5 µg) fue digerido con enzima de restricción de New England Biolabs (30 unidades). El volumen final de reacción fue de 100 µl y, en caso de ser necesario, se complementó con BSA a una concentración final de 0,1 mg/ml. La reacción se llevo a cabo toda la noche a 37°C, evaluando a la mañana siguiente el grado de digestión del ADN corriendo una fracción de la mezcla de reacción (10 µl) en gel de agarosa 0,8%. De no observarse digestión total, a la mezcla de reacción se le agregó 10 unidades extra de enzima de restricción y se la incubó 2-4 hs a 37°C. Una vez que el ADN fue digerido se procedió a concentrar la muestra por vacío en SpeedVac y mezclarla con buffer de siembra para ADN 6X.

- **Marcado de sonda con ^{32}P**

Los genes TcAUKs fueron utilizados como sondas para los ensayos de Southern y Northern blot. El marcado de las mismas con ^{32}P se realizó por la técnica de *primer extension* mediante el kit de marcado NEBlot® (New England Biolabs), siguiendo el protocolo provisto con el fabricante y utilizando dCTP como fuente de ^{32}P. Una vez sintetizada, la sonda fue separada del remanente de nucleótidos sin incorporar mediante el uso de columnas MicroSpin G-50 (GE Healthcare). Una vez purificada, y previo a la incubación con la membrana de nylon, las sondas fueron calentadas por 5 min a 95°C para la desnaturalización de las mismas.

- **Southern blot.**

Las muestras concentradas de ADN genómico digerido fueron resueltas en gel de agarosa 0,8% por electroforesis a una intensidad de 1 V/cm. Una vez lograda la resolución deseada

se procedió a transferir el ADN a una membrana de nylon (*GeneScreen* de Perkin Elmer Life Science, Inc.) mediante el método de transferencia alcalina. Para esto, luego de la corrida, el gel fue sumergido en HCl 0,25 N y se incubó aproximadamente 10 min. en agitación (depurinación). Luego el gel se incubó por 30 min en una solución de NaOH 0,4 N para desnaturalizar el ADN. En paralelo la membrana de nylon fue humedecida con agua y equilibrada en la misma solución NaOH 0,4 N. Para la transferencia se armó un dispositivo como se muestra en la Figura 1, el cual permite que el ADN migre por capilaridad desde el gel hasta la membrana de nylon. Se dejó transferir toda la noche a temperatura ambiente, en buffer NaOH 0,4 N. Una vez transferido el ADN, la membrana se enjuagó en SSC 2X por 2 min y luego se fijó el ADN a la misma con luz ultravioleta.

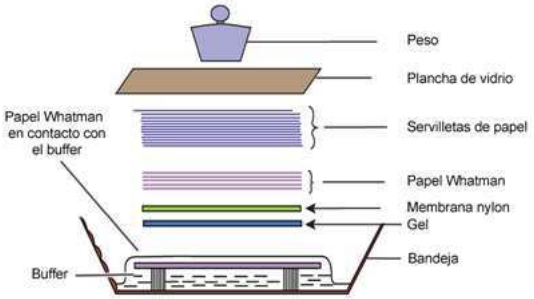


Figura 1. Dispositivo para transferencia de ácidos nucleicos desde gel de agarosa a membrana de nylon.

La membrana con el ADN fue bloqueada con buffer CHURCH durante 3 hs en horno de hibridación a 65°C. Luego se hibridó con sonda marcada con ^{32}P durante toda la noche a 65°C. A la mañana siguiente se retiró la sonda y se realizaron tres lavados de 15 min con las siguientes soluciones: SSC 2X/SDS 0,1%; SSC 1X/SDS 0,1%; SSC 0,2X/SDS 0,1%. Luego del último lavado la membrana se expuso en la pantalla del sistema Phosphoimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

- ***Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)**

Parásitos de la cepa CL Brener en fase exponencial de crecimiento fueron lavados con PBS-Glucosa 2% (m/v) y resuspendidos en PBS 1x. Esta suspensión fue mezclada con igual volumen de agarosa LMP 1,4% (m/v) disuelta en PBS 1X, resultando en una concentración de 1 x 10^7 parásitos por bloque. Cada bloque fue incubado con buffer LIDS (*Lauryl Sulfate Lithium Salt* 1% (m/v); Tris-HCl 10 mM pH 8,00; EDTA 0,1 M) durante 48 hs a 37°C. Luego de este tiempo, se realizaron 4-6 lavados con buffer NDS 0,2X (*N-Lauroylsarcosine-Sodium Salt* 0,2% (m/v); EDTA disódica dihidratada 0,1 M; Tris base 2 mM) y fueron guardados a 4°C en buffer NDS 0,2x. Los bloques de agarosa fueron bien

equilibrados en buffer TE pH 8,00 antes de ser utilizados en el corrida. Esta se realizó en una cuba CHEF DR II (Bio-Rad) a 16 °C en tres pasos: 1) 3 v/cm con cambios de períodos de 90-200 segundos durante 30 hs; 2) 3 v/cm con cambios de períodos de 200-400 segundos durante 30 hs; 3) 2,7 v/cm con cambios de períodos de 400-700 segundos durante 24 hs. Luego de la corrida el gel fue marcado con bromuro de etidio para la visualización del ADN en con luz UV. Finalmente el ADN fue transferido a membrana de nylos por transferencia alcalina.

- **Northern blot**

ARN total resuelto en gel de agarosa fue transferido a membrana de nylon (*GeneScreen* de Perkin Elmer Life Science, Inc.) del siguiente modo. Una vez finalizada la electroforesis el gel se enjuagó en agua destilada por 15 min y en agitación. Luego se montó el dispositivo para transferencia por capilaridad tal cual se muestra en la Figura 1 de esta misma sección. En este caso, el buffer de transferencia fue SSC 10x y la transferencia se realizó toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, la membrana con el ARN se lavó exhaustivamente con SSC 10X para retirar todo resto de formaldehido. Luego de ser lavada, la membrana se bloqueó con buffer CHURCH por 3 hs a 65°C en horno de hibridación. Luego se hibridó con sonda marcada con ^{32}P durante toda la noche a 65°C. A la mañana siguiente se retiró la sonda y se realizaron tres lavados de 15 min con las siguientes soluciones: SSC 2X/SDS 0,1%; SSC 1X/SDS 0,1%; SSC 0,2X/SDS 0,1%. Luego del último lavado la membrana se expuso en la pantalla del sistema Phosphoimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

- **Síntesis de ADN copia.**

A partir de 1 µg de ARN total de *T. cruzi* se sintetizó ADN copia utilizando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante para el caso del uso combinado de oligo$(dT)_{18}$ y *random hexamers* como *primers*. Un volumen de 5 µl de la mezcla de reacción (1/4 del volumen total) fue utilizado como templado para la reacción posterior en la PCR con *primers* específicos para las distintas TcAUKs.

4.2. Proteínas

- **Preparado de extractos de proteínas totales de *T. cruzi*.**

El volumen necesario de un cultivo de *T. cruzi*, con una concentración de parásitos de 1-4 x 10^7, fue centrifugado por 5 min a 1.500 xg y el sobrenadante fue descartado. El precipitado de parásitos se lavó una vez con PBS 1x y fue guardado a –20°C hasta la lisis. El

precipitado de parásitos congelados se resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl 50 M pH 8,00; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; Triton X-100 0,1% (v/v); NP-40 1% (v/v); PMSF 1 mM; E-64 1 µg/ml) y se dejó reposar en hielo por 15 min, agitando en vortex cada 5 min. Luego se realizaron 6 ciclos de congelado y descongelado en N_2 líquido. Se centrifugó la suspensión por 30 min a 10.000 xg y 4°C, y se pasó el sobrenadante (extracto total) a un nuevo tubo Eppendorf. Alternativamente, y sólo en casos puntuales, el precipitado de parásitos lavados con PBS se resuspendió directamente en buffer de siembra para proteínas 1X y se hirvió por 10 min.

- **Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis**

Las proteínas recombinantes fusionadas el *tag* 6xHis fueron purificadas por cromatografía de intercambio iónico mediante resina de Ni^{2+} (Ni-NTA Agarosa, Invitrogen). Del sobrenadante del lisado bacteriano se purificaron las proteínas recombinantes en estado nativo, mientras que a partir de los cuerpos de inclusión se purificaron proteínas en condiciones desnaturalizantes. Para la condición nativa, se colocaron 0,25 ml de resina en la columna y se equilibró con 8 ml (2 x 4ml) de buffer de lisis bacteriano. Luego se agregó el lisado, ajustando el flujo a 0,5 ml por minuto, y se colectó el percolado. A continuación se realizaron dos lavados con concentraciones de 20 mM y 40 mM de imidazol disuelto en el mismo buffer de lisis bacteriano (2,5 ml cada lavado). Para la elución se pasaron 2,5 ml de buffer de lisis bacteriano con imidazol 80 mM, colectándose 5 muestras de 0,5 ml. Para la purificación en condiciones desnaturalizantes el precipitado del lisado de bacterias inducidas fue resuspendido en *Guanidinium Lysis Buffer* (buffer fosfato 20 mM pH 7,80; hidrocloruro de guanidinio 6 M; ClNa 500 mM) e incubado en agitación durante una hora a temperatura ambiente. En paralelo se preparó la columna con resina para la posterior purificación. Para esto 0,5 ml de resina se colocaron en la columna y se dejó sedimentar. Luego se retiró el sobrenadante y se lavó con 10 ml de agua bidestilada estéril. Posteriormente se equilibró la columna con 12 ml (2 x 6 ml) de *Denaturing Binding Buffer* (buffer fosfato 20 mM pH 7,8; urea 8 M; NaCl 500 mM). Luego de la hora de incubación, el precipitado resuspendido fue centrifugado por 15 min. a 3.000 xg y 15 °C, y el sobrenadante se agregó a la resina. Se permitió el pegado de las proteínas a la resina incubando en agitación por 30 min y luego se dejó reposar para que la resina se asiente. Se retiró el sobrenadante (percolado). Posteriormente se realizaron 2 lavados con 5 ml de *Denaturing Binding Buffer*, 2 lavados con 5 ml de *Denaturing Wash Buffer* 1 (buffer fosfato 20 mM pH 6,00; urea 8 M; NaCl 500 mM) y 2 lavados con 5 ml de *Denaturing Wash Buffer* 2 (buffer fosfato 20 mM pH 5,3; urea 8 M; NaCl 500 mM). La elución se realizó con 5 ml de *Denaturing Elution Buffer* (buffer fosfato 20 mM pH 4,00; urea 8 M; NaCl 500 mM),

colectando 5 fracciones de 1 ml. Tanto para la condición nativa como para la desnaturalizante, todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE con tinción por Coomassie y por Western blot con anticuerpo anti 6xHis.

- **Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST**

La purificación de las proteínas fusionadas al *tag* de GST se realizó por incubaciones en *batch* con *Glutathione Sepharose 4B*. Para esto, células inducidas para la expresión de proteína recombinante fueron resuspendidas en PBS frío (1:20 del volumen de cultivo original) y sonicadas hasta ser lisadas. A la suspensión se le agregó Triton X-100 a una concentración final del 1% y se mezcló por 30 min a 4°C. Luego se centrifugó a 12.000 xg por 10 min y 4°C, pasándose el sobrenadante a un nuevo tubo. A este sobrenadante se le agregó la resina de *Glutathione Sepharose 4B*, previamente equilibrada con PBS 1x, y se incubó 60 min a temperatura ambiente en agitación por rotación. Luego de esto la resina fue decantada por centrifugación a 500 xg 5 min y se le quitó el sobrenadante (percolado). Se realizaron 3 lavados con PBS 1x (10 volúmenes de resina), cada vez agitando por 5 min y decantando por centrifugación. Finalmente se eluyeron las proteínas incubando a la resina con buffer de elución (Tris-HCl 50 mM; glutatión reducido 10 mM pH 8,00) por 10 min a temperatura ambiente y en agitación por rotación. Luego de sedimentar la resina por centrifugación se tomo el sobrenadante (con proteínas purificadas) y se pasó a un nuevo tubo.

- **Cuantificación de proteínas**

Los extractos de proteínas totales fueron cuantificados por el método de Bradford. En una placa de 96 pocillos se colocaron 10 µl de diferentes diluciones de los extractos proteicos en 200 µl de reactivo de Bradford 1X (BIORAD). La curva estándar se realizó en base a 5 puntos de masa creciente de seroalbúmina bovina (BSA). Se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas VERSAmax® (Molecular Devices Corportation), se construyó la curva patrón por regresión lineal y la concentración de las muestras se calculó mediante la ecuación de la recta. En el caso de parásitos resuspendidos directamente en buffer de siembra para proteínas, la concentración del extracto se estimó tomando como referencia que 5 x 10^6 epimastigotes de la cepa CL Brener de *T. cruzi* equivalen a 50 µg de proteínas totales.

- **Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Entre 50-80 µg de proteínas totales para extractos de *T. cruzi* o 20 µg de proteínas totales para extractos con proteína recombinante, fueron mezclados con buffer de siembra para proteínas 5x, hervidos 5 min y sembrados en geles de poliacrilamida (10-15%) desnaturalizantes. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris-glicina con SDS al 0,1% [179] a una corriente eléctrica constante de 35 mA por gel.

- **Western blot**

Las muestras resueltas en SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa o PVDF, y estas teñidas con Rojo Ponceau para evaluar la calidad de la transferencia. Luego las membranas se bloquearon en solución de bloqueo toda la noche a 4 °. La solución de bloqueo descartó y se incubaron las membranas con la dilución del anticuerpo primario por 1-2 hs a temperatura ambiente (en algunos casos toda la noche a 4 °C). Al retirar la solución del anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T para luego agregar la solución del anticuerpo secundario conjugado (diluciones en solución de bloqueo). La incubación con este anticuerpo fue de 1-2 hs a temperatura ambiente, y luego se procedió a lavar la membrana 3 veces de 5 min con TBS-T. El revelado se realizó incubando las membranas con la solución de ECL (Perkin Elmer) y exponiendo en placa radiográfica.

- **Ensayo de actividad enzimática**

Ensayo de actividad quinasa *in vitro* se realizó con las proteínas TcAUKs recombinantes o con extracto crudo de epimastigotes de *T. cruzi* como fuente enzimática. Estas proteínas se incluyeron en una mezcla de reacción compuesta por: buffer HEPES pH 7,50 10 mM; KCl 150 mM; $MnCl_2$ 20 mM; DTT 1 mM; NaF 0,5 mM; Na_3VO_4 0,4 mM; ATP 0,01 mM; γ^{32}P-ATP 5 µCi; H2As (Sigma) 0,5 µg/ml. El volumen final de reacción fue de 50 µl y la misma se llevo a cabo a 30°C durante 30 min.

- **Detección de actividad quinasa por contador de centelleo**

Luego de haber procedido la reacción, 40 µl de la mezcla fueron colocados sobre papel de fosfocelulosa p81 (Whatman). Una vez absorbida la mezcla, los papeles fueron lavados tres veces, por 10 min cada una, en H_3PO_4 75 mM. Luego de secarlos, los papeles fueron introducidos en un vial con líquido de centelleo *Optiphase HiSAfe 3* (Perkin Elmer) y la actividad remanente (cpm) fue leída en el contador de centelleo Wallac 1214 Rackbeta.

- **Detección de la actividad quinasa por placa radiográfica**

Luego de haber procedido la reacción se agregó 10 µl de buffer de siembra para proteínas 5x y se hirvió 5 min. Luego se sembró el total del volumen en SDS-PAGE y se realizó la corrida electroforética. Las mezclas de reacción resueltas en el gel fueron transferidas a membrana de PVDF, y ésta expuesta en la pantalla del sistema Phosphoimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

5. Cultivo de células

5.1. Células de mamíferos

- **HEK-293 T**

Las células fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) suplementado con Suero Fetal Bovino 10% (SFB, Gibco), Penicilina 100 U/ml y Streptomicina 100 µg/ml. Los cultivos fueron incubados en estufa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

- **VERO**

Las células fueron mantenidas en medio Minimum Essential Medium (MEM, Gibco) suplementado con SFB 10% (Gibco), Penicilina 100 U/ml y Streptomicina 100 µg/ml. Los cultivos fueron incubados en estufa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

5.2. Parásitos

- **Epimastigotes cepa CL Brener**

Los parásitos fueron mantenidos en medio LIT [180] suplementado con SFB 10% (Natocord), Hemina 0,02%, Penicilina 100 U/ml y Streptomicina 100 µg/ml. Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de entre $1x10^6$ y $1x10^8$ células por ml a 28 °C en atmósfera húmeda.

- **Epimastigotes cepa Y**

Los parásitos fueron mantenidos en medio BHT [181] suplementado con SFB 10% (Natocord), Hemina 0,02%, Penicilina 100 U/ml y Streptomicina 100 µg/ml. Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de entre $1x10^7$ y $1x10^8$ células por ml a 28 °C en atmósfera húmeda.

- **Tripomastigotes y amastigotes cepa CL**

Células VERO fueron sembradas en botellas de cultivo en una relación número de células/superficie de 4000/cm^2, en medio MEM suplementado con SFB 10%. Al día siguiente al cultivo se le cambió el medio por MEM suplementado con SFB al 3% (MEM-SFB 3%) y se agregaron tripomastigotes de *T. cruzi* a una proporción de 50 por cada célula VERO (infección). Al día posterior a la infección se retiró el sobrenadante con tripomastigotes del cultivo y se agregó medio MEM-SFB 3% fresco, así el medio fue intercambiado periódicamente hasta que el momento que el cultivo fue descartado. Alrededor del quinto día post-infección comenzó a haber presencia de tripomastigotes en el sobrenadante de cultivo, y cuando la densidad de los mismos alcanzó el máximo estos fueron cosechados, y separados de amastigotes también presentes en el sobrenadante. Para esto se retiró el medio de cultivo y se centrifugó a 1500 xg por 5 min, luego se incubó el tubo en estufa a 37 °C durante 3 hs. Durante este tiempo los tripomastigotes móviles escapan del precipitado y vuelven al sobrenadante, mientras que los amastigotes permanecen precipitados. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se centrifugó a 2000 xg por 10 min, el precipitado de tripomastigotes se lavó una vez con PBS y quedó disponible para usos ulteriores. Este procedimiento de obtención de tripomastigotes se repitió todos los días durante los cuales hubo una gran cantidad de los mismos en el sobrenadante del cultivo. A partir del día 10 post-infección, cuando el cultivo ya está próximo a agotarse, en el sobrenadante prevalece la presencia de amastigotes en muy alta densidad. Para cosecharlos se procede a retirar el medio y centrifugarlo a 2000 xg por 10 min, el precipitado de amastigotes se lavó con PBS y quedó disponible para usos posteriores.

6. Técnicas de biología celular

- **Ensayo de inmunofluorescencia**

Se tomaron células de cultivo y se lavaron 1 vez con PBS 1X. En caso de células de parásitos, se dejó asentar a las mismas en portaobjetos tratado con poli-lisina 10 mM, durante 30 min. Luego se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (salvo que se explicite de otro modo) 10 min. a TA, y se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 0,2% (PBT) durante 5 min. Posteriormente se bloquearon las células mediante incubación con solución de bloque (PBS-BSA 1%) durante 60 min. a TA. Se incubaron las células con la dilución del Ac 1° (en solución de bloqueo) 60 min. a TA y se realizaron tres lavados de 5 min. con solución PBT. Luego se realizó la incubación con el Ac 2° durante 60 min. a TA y se realizaron otros 3 lavados de 5 min. con solución PBT. Finalmente se montó la preparación con Vectashield (Vector®) con DAPI agregado a una concentración de 2,5 µl/ml y se realizó el sellado con esmalte de uñas.

- **Sincronización de cultivos de epimastigotes**

A un cultivo en fase exponencial de crecimiento con una densidad aproximada de $2x10^7$ células ml^{-1} se le agregó hidroxiurea a una concentración final de 15 mM (solución madre de 500 mM en media de cultivo) y se incubó entre 20 y 24 hs. Para el desarresto se lavó el cultivo 2 veces con un volumen de PBS (a temperatura de 28°C) y se resuspendieron las células en un volumen de medio fresco (precalentado a 28°C).

- **Marcado de células con ioduro de propidio y citometría de flujo**

Un total aproximado de $3x10^5$ células fueron lavadas con 1 ml de PBS-EDTA 2 mM y fijadas en etanol 70% a -20 °C durante al menos 30 min. Luego se realizó un nuevo lavado, esta vez con PBS, y las células fueron resuspendidas en solución de marcado (ioduro de propidio 69 µM en buffer citrato de sodio 38 mM pH 7,40; RNAsa 0,2 mg/ml). La suspensión se incubo 60 min. a 37 °C protegida de la luz y se realizó la lectura por citometría de flujo (IP o Perp-C) en un *cell sorter* FACSAria (BD Biosciences).

Para el análisis de los resultados primero se creó un *dot plot* de FSC-A vs SSC-A (*gate* 1) para descartar los restos celulares (Figura 2 A). Con la población elegida del primer *gate*, se realizó un segundo *dot plot* de PI-W vs PI-A (*gate* 2) para descartar a los agregados celulares (Figura 2 B). A partir de la población seleccionada del segundo *gate* se construyó el histograma de PI-A para analizar el ciclo celular (Figura 2 C).

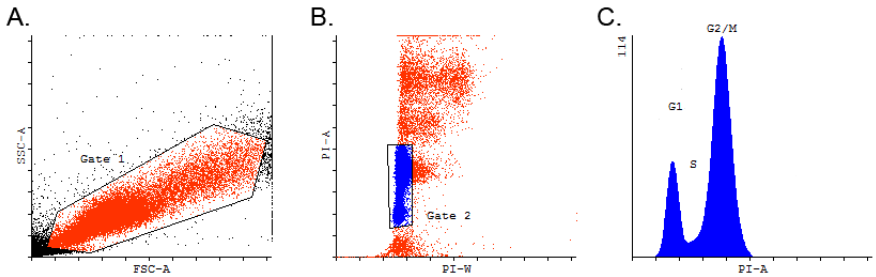


Figura 2. Procesamiento de datos de citometría de flujo para análisis de ciclo celular. A. Establecimiento del primer gate para desechar restos celulares. **B.** Delimitación del segundo gate para descartar agregados celulares. **C.** Curva de PI donde se muestran las regiones correspondientes a las distintas fases del ciclo celular (G1, S y G2/M).

- **Obtención de cultivos clonales de epimastigotes transgénicos**

Los cultivos clonales se obtuvieron mediante la técnica de diluciones mínimas. Para esto se tomó una alícuota de una población de células transfectadas y se realizaron diluciones seriadas (en medio fresco), hasta obtener un volumen final de 20 ml con un total de 20 células. Entre cada pasaje de las diluciones se tomó el recaudo de agitar bien la suspensión por vortex. A los 20 ml de

suspensión celular se le agregaron un total de $1x10^6$ células WT y G418 (presión de selección) a una concentración de 0,2 mg/ml. Todo el volumen de la suspensión celular fue repartido de a 0,2 ml en una placa de 96 wells. Luego de aproximadamente dos semanas los clones comenzaron a recuperarse. A partir de aquí se realizó un *scaling-up*, primero pasando a cultivos de 1 ml y finalmente a cultivos de 5 ml.

- **Electroporación de levaduras**

Como primer paso se prepararon células electrocompetentes. Para esto 20 ml de medio YPD fue inoculado y cultivado a 28°C durante toda la noche en agitación. Al día siguiente las células fueron lavadas 3 veces con un volumen de agua fría estéril, y dos veces con 10 ml de glicerol 10% estéril y pre-enfriado. Finalmente el precipitado de células fue resuspendido en 0,5 ml de glicerol 10% frío y conservadas en hielo hasta ser utilizadas. Para la electroporación se tomaron 50 µl de células electrocompetentes y se les agregó 2 µl de una miniprep de la construcción correspondiente (2-5 µg de ADN). La electroporación se realizo a 2,5 volts; 25 µF y 250 ohm. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio YPDA y se dejó recuperar 60 min. a 28°C. Posteriormente las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 ml de agua estéril. 150 µl de la suspensión fueron plaqueados en medio selectivo SD -U y se incubó a 22°C.

- **Ensayos de complementación en levaduras**

Una colonia de cada levadura transformada con las distintas construcciones y crecidas en placa fueron pasadas a medio líquido SD -U e incubadas a 22°C hasta alcanzar una OD_{600} de 1,5-2. El tiempo de crecimiento de cada colonia ser respectó para obtener cultivos líquidos con una OD lo más similar posible. Como otra alternativa, las colonias que sobrepasaron la OD fueron diluidas hasta alcanzar la misma densidad que todas las demás. Una vez emparejadas las OD, 10 µl cada cultivo fue sembrado a distintas diluciones y en placas selectivas. Las palcas fueron incubadas a temperatura permisiva y restrictiva el tempo correspondiente.

- **Extracción de citoesqueleto**

Epimastigotes fueron tomados de cultivos en fase exponencial de crecimiento y lavados 1 vez con un volumen de PBS 1X. Luego se dejaron asentar sobre portaobjeto, pre-tratado con poli-lisina 10 mM, durante 30 min. Posteriormente se realizó la extracción incubando las células por 5 min. en buffer PEME (PIPES 0,1 M pH 6,90; Nonidet P-40 1%; EGTA 2 mM; $MgSO_4$ 1 mM; EDTA 0,1 mM). Se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS y se fijaron las proteínas en metanol por 30 min a -20°C. Luego de realizar dos lavados con PBS se prosiguió con el ensayo de inmunofluorescencia.

RESULTADOS

1. Búsqueda y detección de genes Aurora quinasa en T. cruzi

1.1. Identificación de los genes

Para la búsqueda de secuencias de posibles genes Aurora quinasa en *T. cruzi* se realizó la búsqueda en la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener (www.GeneDB.org). Como templados se decidió utilizar las secuencias proteicas de las Aurora quinasas de *Trypanosoma brucei* [173], y los resultados de BLASTP con mayor *score* y menor *E-value* fueron analizados y depurados. En el trabajo sobre las proteínas Aurora quinasas de *T. brucei* identifican 3 genes de la familia en base a análisis de las secuencias, los cuales fueron denominados TbAUK1, TbAUK2 y TbAUK3.

Cuando TbAUK1 (Tb11.01.0330) fue utilizada como templado, el resultado de BLASTP en el genoma de *T. cruzi* arrojó 2 secuencias de ADN codificantes (CDS, por sus siglas en inglés) que se diferenciaban notoriamente del resto: TcCLB.508817.80 y TcCLB.503799.4. Este segundo CDS es una región de un gen que está dividido en dos *contigs*, la otra región del mismo gen está conformada por el CDS TcCLB.506165.16. Con lo que la secuencia completa del gen se obtuvo luego de empalmar ambos CDS (TcCLB.503799.4 y TcCLB.506165.16). El alineamiento de la secuencia empalmada y la del CDS TcCLB.508817.80 mostró que ambas poseen un 99% de identidad de secuencia, siendo las diferencias un residuo extra en la secuencia TcCLB.508817.80 y dos sustituciones puntuales. Cada una de estas secuencias es un alelo proveniente de cada uno de los parentales que conforman la cepa híbrida CL Brener, la secuencia TcCLB.508817.80 pertenece al haplotipo *Non-Esmeraldo-like* (linaje III) mientras que la secuencia TcCLB.503799.4 pertenece al haplotipo Esmeraldo-like (linaje II).

Al realizar la búsqueda con el gen TbAUK2 como templado (Tb03.28C22.460), los resultados de BLASTP arrojaron 2 CDS con alto *score* y bajo *E-value* que se diferencian notablemente de las otras secuencias remitidas: TcCLB.503685.10 y TcCLB.509999.110. Ambas secuencias comparten un 96% de identidad, y las diferencias entre ambas corresponden a 8 sustituciones puntuales y una inserción de 6 residuos (QRRQKQQ) en la secuencia TcCLB.509999.110. Al analizar el entorno genómico de ambas secuencias obtuvimos grados de identidad superior al 90%, por lo que en este caso estaríamos también ante la presencia de un par alélico. En el proyecto genoma se explicita que el CDS TcCLB.503685.10 pertenece al haplotipo *Non-Esmeraldo-like* y que TcCLB.509999.110 pertenece al *Esmeraldo-like*, y ambas secuencias se ubican en el cromosoma 36.

Al utilizar TbAUK3 como templado (Tb09.160.0570), 3 secuencias se destacaron por su alto score y bajo E-value: TcCLB.510349.80, TcCLB.506715.10 y TcCLB.504655.30. Las dos primeras se localizan en el mismo *contig* (TcChr33-S, asignado al cromosoma 33) y se encuentran separadas por 69.617 Kbp. En la base de datos son reconocidas como genes parálogos pertenecientes al

haplotipo *Esmeraldo-like*. Un alineamiento entre ambas secuencias arroja un 99% de identidad con sólo dos sustituciones puntuales. El gen TcCLB.504655.30 posee una secuencia 100% idéntica a TcCLB.506715.10, pertenece al *contig* Tcruzi6357 que no tiene asignado ningún cromosoma y no pudo determinarse el haplotipo al cual pertenece. Considerando que el proyecto genoma de *T. cruzi* contiene numerosas inconsistencias debido a la naturaleza híbrida de la cepa CL Brener y al alto número de secuencias repetitivas, para depurar las 3 secuencias encontradas se realizó un análisis detallado de sus entornos genómicos (Figura 1). De las secuencias que se localizan dentro del mismo *contig* (TcCLB.510349.80 y TcCLB.506715.10) las regiones intergénicas 5' conservan un 98% de identidad y en ambos casos se extienden por 380 bp. Incluso los genes inmediatamente adyacentes *5' upstream* a cada una son considerados por la base de datos como parálogos entre sí, mostrando un 98 % de identidad en la secuencia. Por el contrario, las regiones intergénicas 3' no poseen la misma longitud y particularmente la del gen TcCLB.506715.10 muestra una extensa región de secuencia indefinida. Como consecuencia sólo se pudo establecer el porcentaje de identidad de las primeras 54 bp 3' *downstream*, siendo ésta de un 98%. Esta baja calidad de secuencia siembra la duda de si realmente los genes TcCLB.510349.80 y TcCLB.506715.10 son parálogos producto de una duplicación o si, por el contrario, es un único gen que por errores en la secuenciación del *contig* aparece dos veces en la base de datos. El gen TcCLB.504655.30 se localiza en el extremo del *contig* que lo contiene, el cual finaliza 649 bp *upstream* del ATG iniciador. La secuencia que se encuentra entre el ATG y la finalización del *contig* posee un 99% de identidad con la región (de igual longitud) 5' *upstream* de los genes TcCLB.510349.80 y TcCLB.506715.10. Aquí, la extensión de 649 bp contiene 380 bp de la región intergénica y 269 bp correspondientes a los genes adyacentes a cada uno de estos genes. La secuencia 3' *downstream* del gen TcCLB.504655.30 es una larga región intergénica de 2011 bp que en sus primeros 114 bp presenta una identidad de 95% a la región 3' (con igual longitud) del gen TcCLB.510349.80, mientras que *downstream* a estas 114 bp la identidad es nula. Obviando la región de pobre calidad de secuencia 3' *downstream* al gen TcCLB.506715.10, la comparación de las 54 bp inmediatamente adyacentes al codón de terminación de los genes presenta una identidad del 98%. Esto permite suponer que realmente existe el gen TcCLB.504655.30, con secuencia idéntica al TcCLB.506715.10 pero localizado en otra región genómica que no está identificada.

A los CDS de *T. cruzi* encontrados en cada una de las búsquedas por BLASTP se los identificó de manera que se correspondan con los genes Aurora quinasa de *T. brucei* utilizados como templados. Así al encontrado con TbAUK1 se lo llamó TcAUK1 y el mismo criterio para los identificados con el BLASTP de TbAUK2 y 3. En la tabla 1 se resumen los resultados de la búsqueda detallando las características de cada uno de los genes.

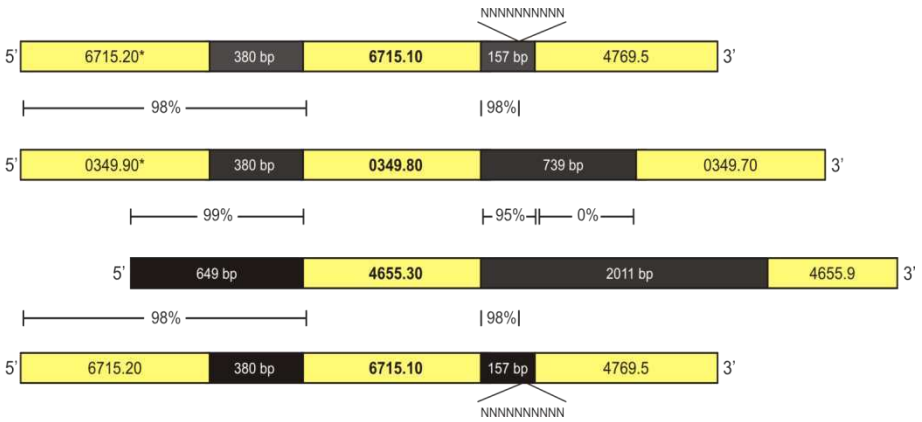


Figura 1. Esquema del contexto genómico de los CDS correspondientes al BLASTP TbAUK3. El entorno genómico de los genes TcCLB.510349.80 (0349.80), TcCLB.506715.10 (6715.10) y TcCLB.504655.30 (4655.30) fue analizado por alineamientos de secuencias para determinar la identidad que conservan. El gen 6715.10 se encuentra representado dos veces para lograr plasmar en un mismo y único esquema los resultados obtenidos en los alineamientos de los 3 genes. En amarillo se representan las regiones génicas y en gris las regiones intergénicas, detallando sus extensiones (bp). Los porcentajes reflejan el grado de identidad de las regiones enfrentadas. Se destaca la baja calidad de secuencia de la región intergénica *downstream* del gen 6715.10 (NNNNNNNNNN). Los genes marcados con * son definidos como parálogos en la base de datos TritrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/).

1.2. Amplificación de los genes y confirmación de su identidad

A pesar de haber encontrado más de un CDS para cada búsqueda en la base de datos, la identidad total de los extremos para cada gen correspondiente nos permitió utilizar un único par de *primers* para sus amplificaciones. Es así que a partir de ADN genómico de la cepa CL Brener de *T. cruzi* se amplificaron por PCR los genes TcAUK1, 2 y 3 (Figura 2 A). Los fragmentos obtenidos, en todos los casos fragmentos únicos, fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y distintos clones de cada uno fueron secuenciados para poder determinar una secuencia consenso de cada uno de los genes. Con las tres TcAUKs se pudo corroborar lo hallado en la base de datos del genoma de *T. cruzi*. Además, para TcAUK2 se pudo confirmar la existencia de las dos formas del gen. Así, a la secuencia que presenta el inserto de 18 nucleótidos se la denominó TcAUK2L (del inglés *Long*), mientras que a la que no lo presenta TcAUK2s (del inglés *short*). El alineamiento de la secuencia aminoacídiaca de ambos genes se muestra en la Figura 2 B. Una vez definida cada una de las secuencias para los genes Aurora quinasa de *T. cruzi*, las mismas fueron anotadas en la base de datos del NCBI con los siguientes números de acceso: EU494590 (TcAUK1), EU494591 (TcAUK2s), EU494592 (TcAUK2L) y EU 494593 (TcAUK3).

Tabla 1. Detalle de los genes de *T. cruzi* identificados en la base de datos como posibles proteínas Aurora quinasa.

Templado	Genes en la BD *T. cruzi*	Longitud del gen y localización	Características de la proteína	Nombre otorgado
TbAUK1	TcCLB.508817.80	930 bp; TcChr30-P	309 aa; 35.226 Da; pI 8,53	TcAUK1
	TcCLB.503799.4	927 bp; TcChr30-S	308 aa; 35.103 Da; pI 8,82	
TbAUK2	TcCLB.503685.10	1.221 bp; TcChr36-S	406 aa; 45.475 Da; pI 8,9	TcAUK2s
	TcCLB.509999.110	1.239 bp; TcChr36-P	412 aa; 46.339 Da; pI 9,71	TcAUK2L
TbAUK3	TcCLB.510349.80	1.536 bp; TcChr33-S	511 aa; 56.793 Da; pI 7,47	TcAUK3
	TcCLB.506715.10	1.536 bp; TcChr33-S	511 aa; 56.781 Da; pI 7,31	
	TcCLB.504655.30	1.563 bp; Tcruzi_6357	511 aa; 56.781 Da; pI 7,31	

Figura 2. Amplificación de los genes TcAUKs. A. Productos de amplificación obtenidos por PCR con primers específicos para TcAUK1, TcAUK2 y TcAUK3. **B.** Alineamiento de las proteínas TcAUK2s y TcAUK2L**.** Sombreado se destacan las sustituciones puntuales así como el inserto de 6 residuos en el gen TcAUK2L.

Una vez definidos los genes TcAUKs, las secuencias aminoacídicas de los mismos fueron sometidas a un *scan* en el sitio de predicción de dominios Prosite. Para las 4 secuencias ingresadas fue detectado el dominio de proteína quinasa, dentro del cual está bien definido el sitio de unión al ATP y el sitio activo de la enzima. A partir de este dato se profundizó el análisis de estos genes mediante alineamiento múltiple de secuencias (MSA, de sus siglas en inglés) con proteínas quinasas en general y proteínas Aurora quinasas de otros organismos en particular.

2. Análisis de las secuencias de los genes TcAUKs

A nivel estructural la proteína quinasa más estudiada es la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Los estudios realizados sobre esta proteína determinaron su estructura tanto en su forma inactiva como en su forma activa [182], y esto último permitió identificar los residuos determinantes para su actividad catalítica. Trabajos posteriores sobre otras proteínas quinasas dieron cuenta de la conservación a lo largo de la evolución de estos residuos en la superfamilia compuesta por las quinasas de serina/treonina (S/T) y las quinasas de tirosina. Teniendo en cuenta lo precedente, en este apartado primero se describirá la similitud de secuencia de las TcAUKs respecto a la subunidad catalítica de la PKA de humanos -como modelo de proteína quinasa- y en segundo lugar se realizará un MSA con genes Aurora de distintos organismos para comparar el grado de conservación en las distintas TcAUKs de los residuos fundamentales y característicos de esta familia de enzimas.

2.1. Estructura de dominios proteínas quinasas

Todas las proteínas quinasas catalizan la misma reacción, la transferencia del fosfato γ del ATP al grupo hidroxilo de residuos serina, treonina o tirosinas. Por otra parte, todas adoptan conformaciones catalíticamente activas que estructuralmente son muy similares. El plegamiento de las proteínas quinasas, el cual se encuentra extremadamente bien conservado dentro de las S/T y tirosina quinasas, está separado en 2 subdominios o lóbulos. El lóbulo N-terminal está compuesto por cinco hojas β (β1- β5) y una prominente hélice α, denominada hélice αC. El lóbulo C-terminal está compuesto principalmente por hélices α. El ATP se une en una hendidura profunda entre los lóbulos y se apoya debajo de un *loop* altamente conservado que conecta las cadenas β1 y β2. Este *loop* de unión al fosfato contiene una secuencia motivo conservada rica en glicinas (GXGXΦG) donde Φ es frecuentemente tirosina o fenilalanina. Los residuos glicinas permiten al *loop* acercar los fosfatos del ATP y coordinarlos vía interacciones con la cadena principal. A su vez, la cadena lateral aromática de estos residuos tapa el sitio de transferencia del fosfato.

El péptido sustrato se une en una conformación extendida a través de la parte delantera del bolsillo de unión a nucleótidos, cerca del fosfato γ del ATP. Un *loop* ubicado centralmente (*Activation loop*), típicamente de 20-30 residuos de longitud, provee de una plataforma para el péptido sustrato. En PKA, como en la mayoría de las quinasas, este *loop* se encuentra fosforilado cuando la proteína se encuentra activa. Esta modificación estabiliza al *loop* en una conformación abierta y extendida permisiva para la unión del sustrato.

Para la transferencia óptima del fosfato se requiere un arreglo espacial preciso de varios residuos catalíticos que se encuentran conservados en todas las quinasas conocidas. En la descripción de estos residuos, que se realizará en este párrafo, la numeración de los mismos corresponde a la PKA. La Asp166 y la Asn171 sobresalen de un *loop* altamente conservado en la base del sitio

activo, llamado *Catalytic loop*. La Asp166 interactúa con el hidroxilo de la cadena lateral del sustrato que va a ser atacado, mientras que la Asn171 participa en la interacción puente de hidrógeno que orienta a la Asp166. La Asn171 y otro residuo catalítico absolutamente conservado, Asp184, son también requeridos para la unión de dos cationes bivalentes involucrados en el reconocimiento del nucleótido. Asp184 forma parte de un motivo Asp-Phe-Gly altamente conservado situado en la base del *Activation loop*. La estructura de este dominio, y particularmente la conformación de la Asp184, está estrechamente vinculada a la fosforilación del *Activation loop*. En el lóbulo N-terminal, la Lys72 realiza un contacto esencial con los grupos fosfatos α y β, posicionándolos adecuadamente para la catálisis. La Lys72 está bien sumergida dentro de la hendidura interlobular, donde es estabilizada y es orientada apropiadamente por una interacción iónica con la Glu91 (un residuo de la hélice αC).

El *Activation loop* comienza en el motivo conservado Asp-Phe-Gly (DFG) y finaliza en el residuo Glu208, el cual forma parte del dominio APE que se encuentra conservado en la mayoría de las quinasas y establece puente de hidrógeno con la también conservada Arg280. Este *loop* posee la capacidad de someterse a grandes cambios conformacionales cuando la quinasa cambia entre los estados activo e inactivo. La localización y el número total de sitios fosforilables dentro del *Activation loop* varían entre quinasas. Un fosfato generalmente adopta una posición central (Thr197-P), en donde forma un par iónico con una arginina conservada (Arg165) situada en el *Catalytic loop*. Esta interacción es probable que sea importante en la rotación del motivo Asp-Phe-Gly a una orientación correcta para la catálisis. Continuo a la Arg165 se encuentra un aspartato (Asp166 en PKA) que está implicado en el mecanismo catalítico, más probablemente como una base que activa al sustrato hidroxilo entrante (quitándole un protón). Este duplete arginina-aspartato da origen a un subgrupo de enzimas quinasas denominadas RD, en el cual está incluida la PKA.

2.2. Comparación de secuencias entre PKA y TcAUKs

Realizando un alineamiento múltiple entre la subunidad catalítica de la PKA de humanos y las Aurora quinasas de *T. cruzi* (Figura 3) podemos analizar el grado de conservación de los distintos residuos importantes para la actividad catalítica y que fueron enumerados anteriormente. Así, vemos que el residuo catalítico más relevante de las proteínas quinasas (Glu166 de PKA) se encuentra conservado en las TcAUKs. No sólo eso, sino que en las TcAUKs este residuo se encuentra precedido por una Arg, lo que las ubica junto con la PKA humana dentro de las quinasas RD. La Asn que influye en la correcta orientación del Glu catalítico (Asn171 en PKA) también se encuentra conservada en las TcAUKs. Asimismo, esta Asn junto con un aspartato (Asp184 en PKA) son los residuos que unen al catión bivalente. Este Asp se conserva en las TcAUKs, formando parte del tripéptido DFG ya descripto en otras proteínas quinasas. Esto no es así en TcAUK3, donde el tercer residuo del tripéptido es una serina en lugar de glicina. En las proteínas quinasas

este tripéptido marca el comienzo del *Activation loop*, cuyo final está determinado por el tripéptido APE. Este último presenta una conservación parcial en las TcAUKs, donde TcAUK1 muestra una prolina y TcAUK2 una serina en la primera posición. Aquí nuevamente TcAUK3 es la excepción de las TcAUKs, conservando los 3 residuos del tripéptido. Dentro de este *loop* se encuentra el residuo treonina que es fosforilado en la forma activa de algunas proteínas quinasas (Thr197 en PKA) y que se conserva en las TcAUKs. Otros residuos importantes para la actividad catalítica de las proteínas quinasas descriptos en PKA y conservados en las TcAUKs son la lisina que establece contacto con los grupos fosfatos α y β del ATP, y el glutamato que interacciona con esta lisina y la posiciona para la unión con los fosfatos.

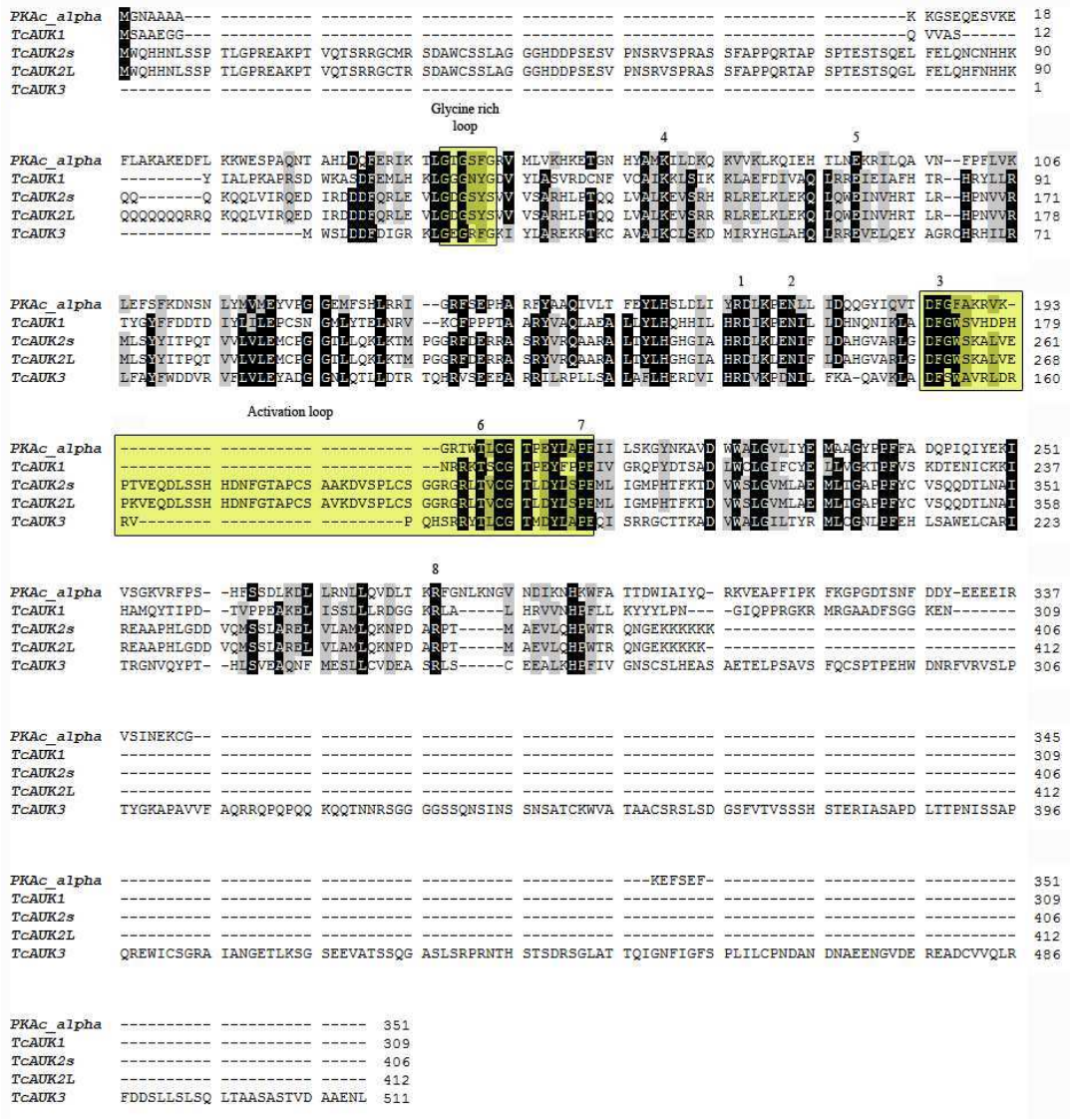


Figura 3. Alineamiento subunidad catalítica α de PKA humana con TcAUKs. Se destacan los residuos conservados importantes para la actividad catalítica de las enzimas quinasas. (1) Asp166 precedida por la Arg165, conformando el dipéptido RD; (2) Asn171; (3) tripéptido DFG, que contiene el Asp184; (4) Lys172; (5) Glu91; (6) Thr197; (7) motivo APE, que incluye el residuo Glu208; (8) Arg280.

2.3. Comparación de secuencia TcAUKs y genes Aurora de otros organismos

Continuando con el análisis bioinformático de las secuencias establecidas como TcAUKs se realizaron alineamientos de a pares (matriz de puntuación blosum62) contra las secuencias Aurora quinasas de organismos modelo (*Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), proteínas que cuentan con gran respaldo bibliográfico en cuanto a su estructura y función. Se realizaron dos tipos de alineamientos, uno con la secuencia completa (global) de las proteínas y otro sólo con el dominio catalítico. De estos surgieron los siguientes datos:

- En el alineamiento global TcAUK1 muestra 32 ± 2,9 % de identidad y 46 ± 4,2 % de similitud respecto a las Aurora quinasas de organismos modelos. Mientras que en el alineamiento del dominio catalítico estos porcentajes se incrementan a 42,9 ± 2,5 para identidad y 60,7 ± 1,9 para similitud.

- Ambas isoformas de TcAUK2 (s y L) muestran números muy similares en identidad y similitud al ser alineadas contra las Auroras de los organismos antes mencionados. Para el alineamiento global TcAUK2s muestra 26,6 ± 1,8 % de identidad y 41,2 ± 3 % de similitud. En el alineamiento del dominio catalítico los porcentajes para TcAUK2s son 33,6 ± 1,3 en identidad y 51 ± 1 en similitud.

- El alineamiento global de TcAUK3 con estos organismos arroja 19 ± 1,6 % de identidad y 28,6 ± 2,6 % de similitud. Sin embargo en el alineamiento del dominio catalítico se observa un incremento considerable de los porcentajes, 40,5 ± 2,1 en identidad y 60,7 ± 2,2 en similitud.

El porcentaje de identidad y similitud que se observa en el alineamiento global para las TcAUKs respecto a las Aurora de metazoos es similar a la que muestran los genes Aurora quinasas identificados en otros organismos protozoarios [170, 172, 173]. Los mayores porcentajes de identidad/similitud en los alineamientos de los dominios catalíticos, respecto a los alineamientos globales, concuerdan con la descripción de las proteínas de la familia Aurora en donde dividen a las mismas en un dominio C-terminal que es el catalítico más conservado y otro N-terminal regulatorio más divergente. El menor valor de los porcentajes de identidad/similitud en el dominio catalítico de TcAUK2s (lo mismo para la isoforma L) se debe, como veremos más adelante, a un inserto presente en el dominio catalítico de estas proteínas. Por otra parte, el bajo porcentaje global de identidad/similitud en TcAUK3 en relación a las otras TcAUKs (y no del dominio catalítico) se debe a que esta proteína presenta un extremo C-terminal de mayor longitud.

Complementariamente a los alineamientos de las TcAUKs con las Aurora quinasas de organismos modelos, se realizaron los mismos tipos de alineamientos entre las TcAUKs y las proteínas de la

familia Aurora descriptas en otros eucariotas inferiores (*T. brucei*, *L. major*, *G. lamblia*, *D. discoideum*). Al igual que en el caso anterior, el alineamiento de a pares con sólo el dominio catalítico arroja mayores porcentajes de identidad/similitud respecto a los alineamientos globales. En los alineamiento de a pares de las TcAUKs con las Aurora de *T. brucei* se observa un mayor porcentaje de identidad/similitud entre los pares ortólogos (por ej. TcAUK1 vs TbAUK1). Sin embargo es destacable la diferencia en estos porcentajes que muestra el alineamiento global de la TcAUK1 (80,9% identidad y 89,3% similitud) respecto al que muestran las TcAUK2 (49,8% identidad y 63,9% similitud en TcAUK2s, 48,6% identidad y 62,2% similitud en TcAUK2L) y la TcAUK3 (36,4% identidad y 48,4% similitud). Otro aspecto destacable es el hecho que de todos los genes Aurora de *T. cruzi*, es TcAUK1 la que muestra mayores porcentajes de identidad/similitud con el único gen Aurora identificado en *L. major*. Aquí también los valores absolutos de los porcentajes de identidad/similitud de TcAUK1 (78,5/85,9) son muy superiores al de los otros genes TcAUKs (23,7/34,1 para TcAUK2s y 31,2/44,7 para TcAUK3).

El análisis detallado de las secuencias proteicas establecidas como genes Aurora quinasas en *Trypanosoma cruzi* se realizó a partir de un alineamiento múltiple de dominios catalíticos en el cual se incluyeron, además de las TcAUKs, las secuencias de las proteínas Aurora de los organismos modelo enumerados anteriormente (Figura 4). En un primer análisis global de conservación de dominios se puede confirmar la presencia en los genes TcAUKs de dos dominios característicos de las proteínas Aurora, el *Activation loop* con el motivo consenso **DFGWSxxxxxxRxTxCGTxDYLPPE** y el *Destruction-box* en el extremo C-terminal con la secuencia consenso **LLxxxPxxRxxLxxxxxHPW**. Es de destacar la presencia en las TcAUK2 de un inserto (con un 93% de identidad entre las dos isoformas) de 32 aminoácidos dentro del *Activation loop*, lo que podría traducirse en la alteración de la conformación tridimensional de este dominio. Otros dos genes Aurora quinasas de organismos protozoarios, único gen Aurora de *Giardia lamblia* [172] y gen TbAUK2 en *Trypanosoma brucei* [173], muestran también una inserción dentro de este *loop*. Dentro del *Activation loop*, los genes TcAUKs poseen el residuo treonina que forma parte del motivo conservado RxT y es blanco de autofosforilácion para la activación de ciertas proteínas quinasas, entre las que se incluyen a todas las Aurora quinasas descriptas hasta el momento. Una mutación puntual de este residuo treonina por un residuo ácido en la Aurora A de humanos genera una quinasa hiperactiva [183], lo que respalda la suposición de que esta treonina es blanco de fosforilación. En el dominio D-box de los genes Aurora de *T. cruzi* vemos que TcAUK1 presenta el motivo RxxL característico, mientras que TcAUK2 y TcAUK3 mantienen la arginina pero varían en la leucina.

La obtención de la cristalografía de una proteína, y por tanto la detallada descripción de su estructura, permite identificar aquellos residuos involucrados en la funcionalidad de la misma. En el caso de proteínas enzimáticas, los residuos más destacados son aquellos que forman parte del

sitio activo. Sin embargo, también aquellos que no forman parte de este sitio cumplen roles que son importantes, tanto en la actividad de la enzima como en otros aspectos (por ejemplo interacción con moduladores). De las enzimas Aurora quinasas existen diversos trabajos en los cuales se ha resuelto la cristalografía. Teniendo en cuenta el creciente desarrollo de inhibidores específicos de estas enzimas en humanos para su inclusión en terapias anti cancerígenas, la mayor parte de los trabajos en los cuales la estructura de estas enzimas fue resuelta se hizo en complejo con algún inhibidor. El trabajo de Cheethman y colaboradores [184] muestra la cristalografía de la Aurora A de humanos acomplejada con adenosina, con esto logran identificar aquellos residuos que interactúan con esta base purínica y otros que ayudan a mantener la estructura terciaria de la enzima. Tomando como referencia este trabajo y mediante un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) se analizó si los residuos con funcionalidad destacada en la Aurora A humana se conservan en las TcAUKs. Mientras que la inclusión de las demás proteínas Aurora será utilizada para ponderar el grado de significancia en cualquier “no identidad” entre la Aurora A humana y las TcAUKs. Es decir, si un residuo no muestra identidad entre la Aurora A humana y las TcAUKs, y a la vez en esa posición el grado de identidad considerando todas las Aurora quinasas es bajo se considerará que ese sitio es menos relevante respecto a otro en el cual la identidad general es alta pero las TcAUKs varían en el residuo respecto a la Aurora A humana.

En la Aurora A humana el sitio activo está delimitado por el *Glycine rich loop* y el *Activation loop*. Entre estos dominios se encuentra la *Hinge region* que, junto a otros residuos, forma un bolsillo hidrofóbico dónde se aloja el anillo purínico de la adenosina. Aquí la adenosina establece interacciones puente de hidrógeno con los residuos Glu211, Ala213 y el Trp277. En el alineamiento múltiple se observa que aquellos residuos que conforman el bolsillo presentan una alta conservación, y las sustituciones existentes en las TcAUKs siguen conservando la propiedad hidrofóbica de los residuos. En relación a los residuos que establecen contacto directo con la adenosina, tanto el Glu211 como el Trp277 se conservan en las TcAUKs. Pero en la posición de la Ala213, las TcAUK1 y 2 poseen una cisteína. Este mismo residuo se observa en esta posición en proteínas Aurora de otros organismos protozoarios como *L. major* y *T. brucei*, con lo que la sustitución en esta posición clave no afectaría la actividad enzimática.

Otro trabajo en donde la cristalografía de la Aurora A humana acomplejada con ADP fue resuelta lo realizó Nowakowski y colaboradores [185]. En este trabajo, no se brinda tanta información de la estructura cristalina de la Aurora como en el trabajo de Cheetman, pero aporta un dato que en este último trabajo no mencionan. En la conformación activa de la Aurora A humana, la hélice αC se posiciona de tal manera que el residuo conservado Glu181 establece un puente salino con la Lys162, en una estrecha proximidad al fosfato β del ligando ADP unido. Asimismo destaca como fundamental para la actividad catalítica de la enzima a este residuo Lys162 y a el Asp274, ambos conservados tanto en las TcAUKs como en las demás Aurora del alineamiento.

Ciertas proteínas quinasas poseen un dominio característico denominado *Fluorophenyl pocket* dentro del dominio catalítico, considerado de suma importancia debido a que una gran cantidad de inhibidores de estas enzimas van dirigidos hacia este sitio. Las proteínas de la familia Aurora en humanos poseen en este bolsillo residuos únicos que difieren de otras proteínas quinasas. Por ejemplo en la posición 210 de la Aurora A humana se encuentra una leucina, mientras que en esta misma posición las quinasas Src y CDK2 muestran una treonina y una fenilalanina, respectivamente. En el alineamiento múltiple se observa que en la posición 210 de la Aurora A humana todas las demás Aurora quinasas, a excepción de Sclpl1 (único gen Aurora de *S. cereviciae*), conservan el residuo leucina. Otro residuo exclusivo de todas las proteínas Aurora conocidas es el triptófano de la posición 277 de la Aurora A humana. Como se observa en el alineamiento múltiple, en esta misma posición las TcAUKs conservan el residuo triptófano, el cual está precedido por el tripéptido DFG característico de las proteínas quinasas. En la conformación tridimensional de la Aurora A humana el triptófano 277 establece puente de hidrógeno con el Glu181 y hace contacto hidrofóbico con la Phe144 y la Val174. El puente de hidrógeno formado entre Trp277 y Glu181 es una interacción exclusiva de las enzimas Aurora, y las TcAUKs no serían la excepción debido a que en ambas posiciones conservan ambos residuos. Los otros residuos con los que hace contacto el Trp277 varían en las TcAUKs (y en las Aurora de otros organismo) respecto a la Aurora A humana. Pero de todos modos los residuos en esta posición continúan siendo de naturaleza hidrofóbica, por lo que es posible que se conserve la interacción entre estas posiciones. Otro residuo inusual en la mayoría de la quinasas pero que si lo poseen las Aurora es en la posición 279 de la Aurora A humana, posición generalmente conocida como D+5 (en donde D es el aspártico del tripéptido conservado DFG y cinco especifica el número de posiciones *downstream* a ese aspártico). En las quinasas que se regulan por fosforilación del *Activation loop* en esta posición se encuentra con mayor frecuencia lisina o arginina. Sin embargo, en todas las Aurora quinasas esta posición está ocupada por una valina, siendo las excepciones TcAUK2 que como muchas quinasas posee una lisina y Sclpl1 que muestra una isoleucina.

Una estrategia para estudiar el rol de una enzima en el metabolismo de un organismo es suprimir su actividad e identificar las alteraciones fenotípicas que esto acarrea. Así podemos establecer los procesos en los cuales la enzima estaría involucrada. Para suprimir la actividad existen numerosas técnicas, entre las que se encuentran la creación de organismo transgénicos sin la copia del gen respectivo (*knock out*), el silenciamiento génico por ARN de interferencia (*knock down*) y la expresión de proteínas disfuncionales que actúen como dominantes negativos. Respecto a esta última técnica, y en el caso de proteínas enzimáticas, muchos trabajos consisten en sobreexpresar enzimas sin actividad catalítica que impiden a la enzima endógena realizar su función. En un trabajo con la Aurora A de *X. laevis* [186] se generó una versión *kinase dead* de la enzima mutando el residuo lisina 169 por arginina, identificándose de este modo la lisina catalítica de la quinasa. En

el alineamiento múltiple vemos que en esta posición indefectiblemente todas las secuencias muestran un residuo lisina (Lys162 en Aurora A humana), indicando que el residuo catalítico se conserva en un mismo entorno en todas las proteínas Aurora quinasas. En la conformación activa de la Aurora A humana el residuo Asp274 (del tripéptido DFG) y la Asn261 coordinan conjuntamente los dos cationes bivalentes que estabilizan los fosfatos del ATP/ADP. En esta posición de la Aurora A humana todas las demás secuencias Aurora del alineamiento múltiple conservan ambos aminoácidos. Para que estos residuos logren coordinar los cationes bivalentes deben poseer una localización espacial específica dentro de la estructura tridimensional de la proteína, y la conservación de los mismos en la misma posición respecto a la Aurora A humana respalda la suposición de que efectivamente en las Auroras quinasas de *T. cruzi* estos residuos podrían adoptar una conformación espacial similar.

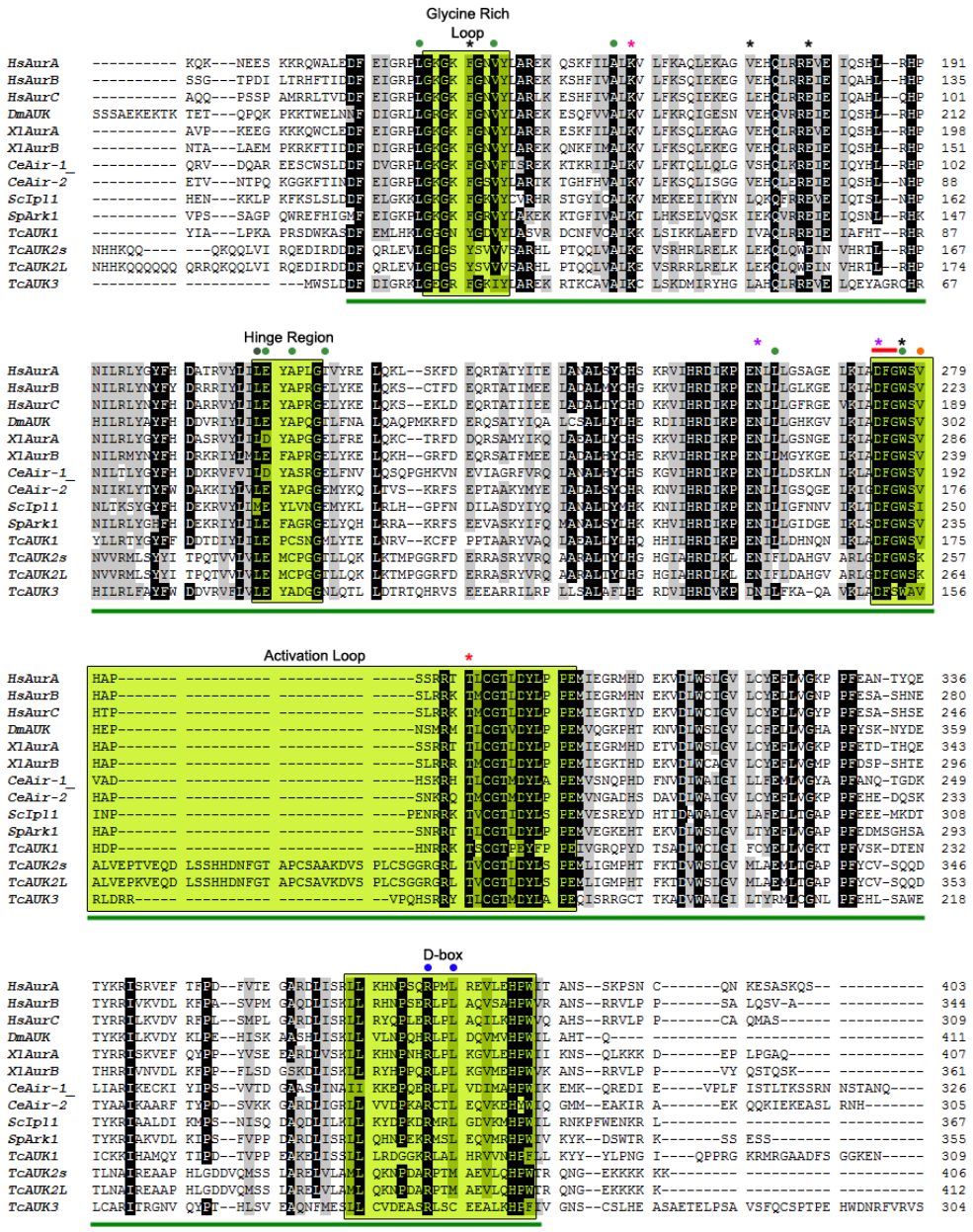


Figura 4. Alineamiento TcAUKs con proteínas Aurora de organismos modelos. Se destacan los motivos distintivos de las proteínas Aurora y los residuos importantes para la actividad catalítica. En los recuadros amarillos se resaltan los dominios *Glycine Rich Loop* y *Hinge Region* común a todas las proteínas quinasas, y el *Activation Loop* con el *D-Box* exclusivos de la familia Aurora quinasa. Dentro del *Activation Loop* se encuentra la treonina blanco de autofosforilación (*) en el motivo conservado RxT. En el *D-box* se marcan los residuos arginina y leucina conservados en todas las secuencias Aurora (●). La línea verde subraya el dominio catalítico delimitado para las Aurora quinasas humanas. Dentro de este dominio se resalta la presencia de los residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico donde se aloja el anillo purínico de la adenosina (●); la leucina 210 del *Fluorophenyl Pocket*, residuo exclusivo de las Aurora quinasas en esta posición (●); el triptofano en la posición 277 también específico de todas las Aurora quinasas conocidas, y los residuos que establecen interacciones con el Glu181, Phe144 y Val174 (*); la lisina catalítica utilizada como blanco de mutación para la generación de Aurora kinase-dead (*); el tripéptido característico de todas las proteínas quinasas (línea roja); valina en la posición 279 (D+5), residuo que se encuentra en menos del 5% de las proteínas quinasas (●); Asp274 y Asn261, residuos que coordinan los 2 cationes bivalentes (*).

El análisis en profundidad de la secuencia de los genes TcAUKs brindó un fuerte respaldo a la conclusión de que los genes que hemos seleccionados como Aurora quinasas de *Trypanosoma cruzi* realmente pertenecen a esta familia de proteínas. Por consiguiente, a partir de estas secuencias es que se desarrollaron todas las herramientas moleculares para determinar el rol que posee esta familia de proteínas en la biología del parásito.

Con el fin de determinar si algunos de los genes identificados como Aurora quinasa en *T. cruzi* son homólogos funcionales del único gen Aurora de *S. cereviciae* se realizó un ensayo de complementación en levaduras mutantes termosensibles para Ipl1 [187]. Los distintos genes TcAUKs fueron clonados en vectores de baja (p416) y alta expresión (p426) para levaduras. Las levaduras transfectadas con estas construcciones, y luego de confirmar la expresión de las proteínas heterólogas por Western blot, fueron plaqueadas en medio selectivo e incubadas a 3 temperaturas distintas: 24°C (permisiva), 30°C y 37°C (ambas restrictivas). Como controles se plaquearon levaduras WT no termosensibles (control positivo de crecimiento) y levaduras mutantes termosensibles transfectadas con vector vacío (control negativo de crecimiento). A su vez, en cada una de las condiciones de temperatura se plaquearon diluciones decrecientes de cada transfectante y de la cepa WT (concentración tal cual, diluciones 1:10, 1:50 y 1:100). Al cabo de 48 hs de incubación a temperatura permisiva todas las colonias mostraron tasa de crecimiento similar. Por el contrario, luego de 96 hs de incubación a las temperaturas restrictivas de 30 y 37 °C sólo se observó crecimiento de la cepa WT, mientras que todas las transfectantes mostraron un crecimiento casi nulo. Esto demuestra que ninguno de los genes TcAUKs es capaz de complementar la función de Ipl1 en levaduras de gemación.

3. Organización genómica de los genes TcAUKs

Como se desprende del análisis del punto 1 de esta sección, el análisis de las secuencias de los genes TcAUKs en la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* dejó varios interrogantes respecto a la organización que poseen estos genes en el genoma del parásito. Es por esto, y con el objetivo de esclarecer definitivamente el número de copias de cada uno de los genes TcAUKs, que mediante el ensayo de Southern blot se analizó la organización de estos genes en el genoma de la cepa CL Brener de *T. cruzi* (Figura 5).

Para TcAUK1 el perfil de bandas en el ensayo de Southern blot concuerda con los datos encontrados en la base de datos. La presencia de bandas únicas cuando el ADN fue digerido con enzimas que cortan por fuera del gen (BamHI, NcoI y HindIII) y de doble banda cuando fue digerido con PstI, que posee un único sitio de corte dentro de TcAUK1, confirma que este gen se encuentra en copia única dentro el genoma.

En el caso de TcAUK2, parece encontrarse en copia única por genoma haploide. El patrón de bandas observado en el ensayo de Southern blot respalda esta idea, mostrando que cuando las enzimas cortan por fuera de la secuencia de los genes sólo se observa una única banda. La enzima PstI posee dos sitios de corte dentro de la secuencia del gen TcAUK2s, mientras que no digiere dentro de la TcAUK2L. El número de bandas en la calle donde se corrió la digestión con esta enzima muestra el número de cuatro bandas –tres por la digestión de TcAUK2s y una por la no digestión de TcAUK2L– esperado para una única copia del gen por genoma haploide. La enzima NcoI posee un único sitio de corte dentro de la secuencia de ambas formas del gen, lo que se refleja en la detección dos bandas, una de aproximadamente 7000 bp y otra más ténue de 1500 bp. Así como el patrón de bandas respalda la idea de la copia única del gen, un análisis del entorno genómico de las secuencias s y L arrojó que tanto 1000 bp *upstream* como *downstream* se conserva una identidad superior al 90%. Esto último es otro aporte a la conclusión de que TcAUK2 es un gen de copia única en *T. cruzi*.

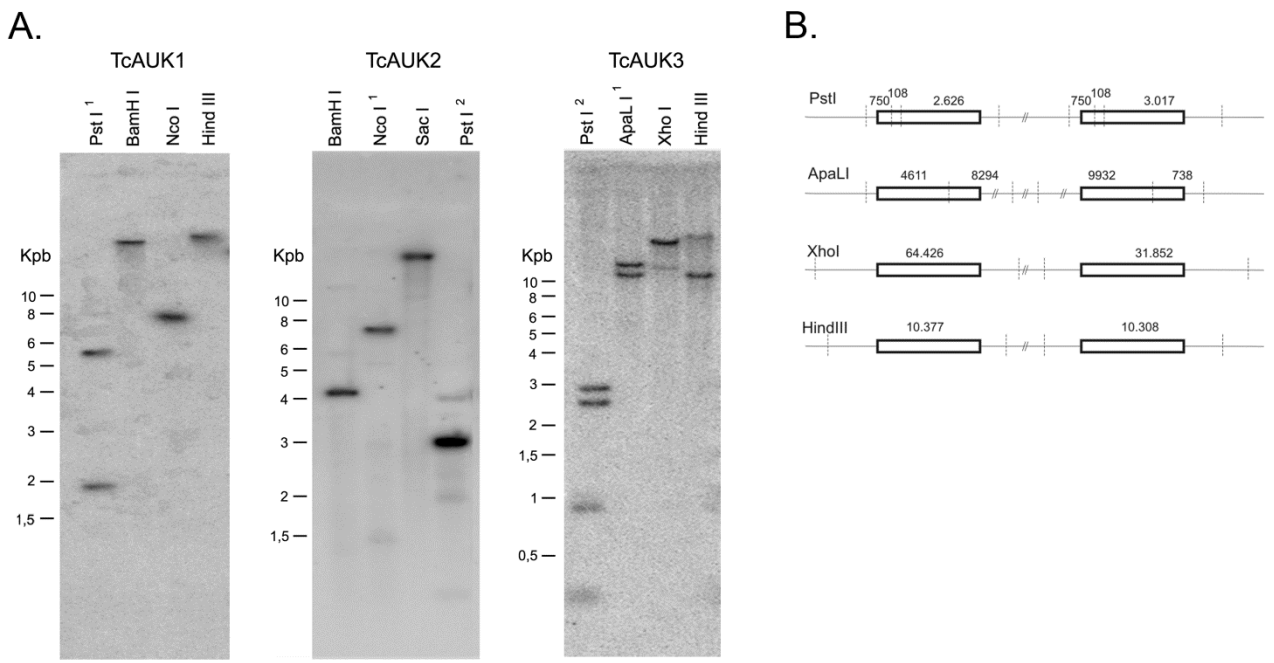


Figura 5. Southern blot TcAUKs en ADN genómico de la cepa CL Brener de *T. cruzi*. A. Sondas marcadas con ^{32}P y sintetizadas a partir de la secuencia completa de los genes TcAUKs se hibridaron contra ADN genómico de *T. cruzi* digerido con distintas enzimas de restricción (calles). Los superíndices indican enzimas que cortan dentro de la secuencia de los genes TcAUKs: una vez (^{1}) o dos veces (^{2}). **B.** Esquema que representa los sitios de restricción para las enzimas utilizadas en el ensayo dentro del entorno de los CDS de TcAUK3 del cromosoma 33. Se explicita la longitud (bp) de los fragmentos teóricos generados.

El patrón de bandas del Southern blot para TcAUK3 es complejo de interpretar debido a la presencia de un doblete de bandas en todas las digestiones. Para poder obtener una correcta interpretación de este patrón repetitivo se recurrió al análisis de las tres secuencias de este gen y su entorno genómico, en cuanto a los sitios de restricción presentes. Sin embargo, este análisis para la secuencia TcCLB.504655.30 se vio limitado por el hecho de que el *contig* que la contiene (Tcruzi_6357) es de corta longitud y no fue asignado a ningún cromosoma. Por consiguiente la contrastación de los fragmentos encontrados en el ensayo de Southern se realizó sobre el análisis de las restantes secuencias codificantes para este gen y sus respectivos entornos. Así, el doblete de bandas que aparecen con las enzimas que cortan dentro de la secuencia del gen encuentra una explicación en la organización en tándem de los genes detectados en el cromosoma TcChr33-S (TcCLB.510349.80 y TcCLB.506715.10), cuyo entorno genómico muestra una alta identidad de secuencias (Figura 1 en esta misma sección). La disposición en tándem de los genes y la alta identidad de su entorno producen en la digestión con distintas enzimas la generación de fragmentos de longitud similar, que en algunos casos podrían no ser resueltos durante la corrida en gel de agarosa. La digestión con PstI (posee dos sitio de corte dentro del gen) debería verse reflejada en seis bandas en el Southern blot. Sin embargo, el análisis *in silico* de las secuencias en

tándem y su entorno explica la aparición de las cuatro bandas, ya que de los seis fragmentos generados dos poseen una diferencia en longitud muy pequeña con otros fragmentos, por lo que en una corrida electroforética no podrían ser resueltos. Para ApaLI, que corta una vez dentro de TcAUK3, era de esperar poder distinguir cuatro fragmentos. Sin embargo, la aparición de sólo dos y sus correspondientes longitudes revelan que posiblemente este sitio de corte interno no exista, por lo que las bandas observadas contendrían al gen TcAUK3 completo y parte de su entorno inmediato. La digestión con XhoI (no corta dentro del gen) debería haber generado dos fragmentos, uno de 64.426 bp y otro de 31.852 bp. Estos dos fragmentos no se podrían distinguir en el Southern blot debido a que no podrían ser resueltos en el gel agarosa 0,8% en que se realizó la electroforesis. Sin embargo, la digestión con XhoI generó dos bandas, de las cuales la más intensa sería la que representa a los dos fragmentos esperados. La digestión con la enzima HindIII generaría dos fragmentos de longitud casi idéntica que no se distinguirían en el Southern blot. Aquí también, al igual que en el caso de XhoI, se observan dos bandas siendo la de mayor intensidad la que correspondería a los fragmentos esperados. Las dos bandas extras que aparecen tanto con la digestión con XhoI como con HindIII podrían pertenecer a la tercera copia del gen TcAUK3 incluida en el *contig* Tcruzi_6357.

Con el objetivo de confirmar la presencia de la secuencia TcCLB.504655.30 del gen TcAUK3 –perteneciente al *contig* Tcruzi_6357– en el genoma de *T. cruzi*, se realizó un ensayo de *Pulsed Field Gel Eletrophoresis* (Figura 6). En este ensayo son los cromosomas enteros los que son separados dentro de un gel de agarosa a través de pulsos alternos del campo eléctrico. Si bien este ensayo fue realizado para confirmar la presencia de la secuencia TcCLB.504655.30 del gen TcAUK3, también se incluyeron sondas contra las otras TcAUKs con el fin de confirmar lo concluido por el análisis del ensayo de Southern blot. que tanto TcAUK1 como TcAUK2 se encuentran en copia única. Para TcAUK3 podemos confirmar la presencia de una tercera copia del gen (la secuencia TcCLB.504655.30) y que el *contig* que la contiene (*contig* Tcruzi_6357) pertenece a un cromosoma diferente al que contiene las otras secuencias del gen TcAUK3 (cromosoma TcChr33). Por último, otro dato que surge de la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* y que es confirmado por este ensayo es que los 3 genes TcAUKs se localizan en cromosomas diferentes.

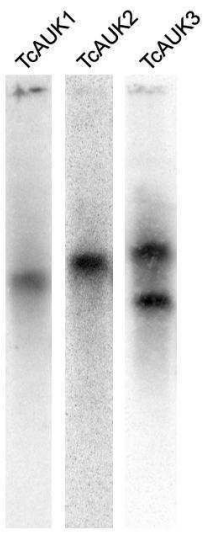


Figura 6. *Pulsed Field Gel Electrophoresis.* ADN total de la cepa CL Brener de *T. cruzi* corrido bajo régimen de pulsos alternos de campo eléctrico fue hibridado con sondas marcadas con ^{32}P de los genes TcAUK1, 2 y 3; sintetizadas a partir de la secuencia completa de dichos genes.

4. Perfil de expresión de los genes TcAUKs

Con el objetivo de confirmar que las secuencias encontradas para la TcAUKs representan genes activos se realizó un ensayo de Northern blot sobre ARN total extraído a partir de epimastigotes de la cepa CL Brener, utilizando las mismas sondas que para el ensayo de Southern blot (Figura 7). Para las 3 TcAUKs se detectaron bandas específicas, cuyas longitudes se corresponden a las diferencias en la longitud relativa de los distintos genes. Confirmándose de esta manera la transcripción de los genes TcAUKs en epimastigotes de la cepa CL Brener. Para el gen TcAUK3 se observan dos bandas nítidas que podrían corresponder a los transcriptos de las distintas secuencias del gen TcAUK3 presentes en el genoma de *T. cruzi*. También se observan dos bandas para el gen TcAUK2, las cuales podrían ser los transcriptos de las dos formas del gen (TcAUK2s y TcAUK2L).

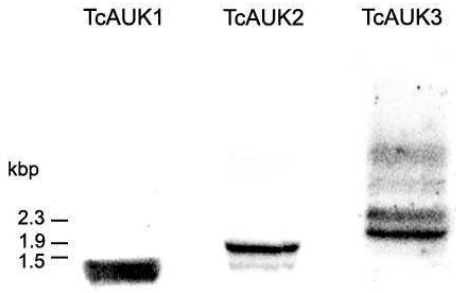


Figura 7. Ensayo de Northern blot. ARN total de epimastigotes de la cepa CL Brener fue hibridado con sondas marcadas con ^{32}P sintetizadas a partir de la secuencia completa de los genes TcAUK1, 2 y 3.

Para extender el estudio de la expresión a nivel de ARNm de las distintas TcAUKs a las formas amastigote y tripomastigote de *T. cruzi* se realizó un ensayo de RT-PCR sobre ARN total extraído de la cepa CL Brener (Figura 8 A). Este ensayo permite detectar la presencia del ARNm específico y, mediante la inclusión de un control de carga, realizar una comparación de los niveles de expresión del ARNm de un mismo gen TcAUK entre las distintas formas del parásito.

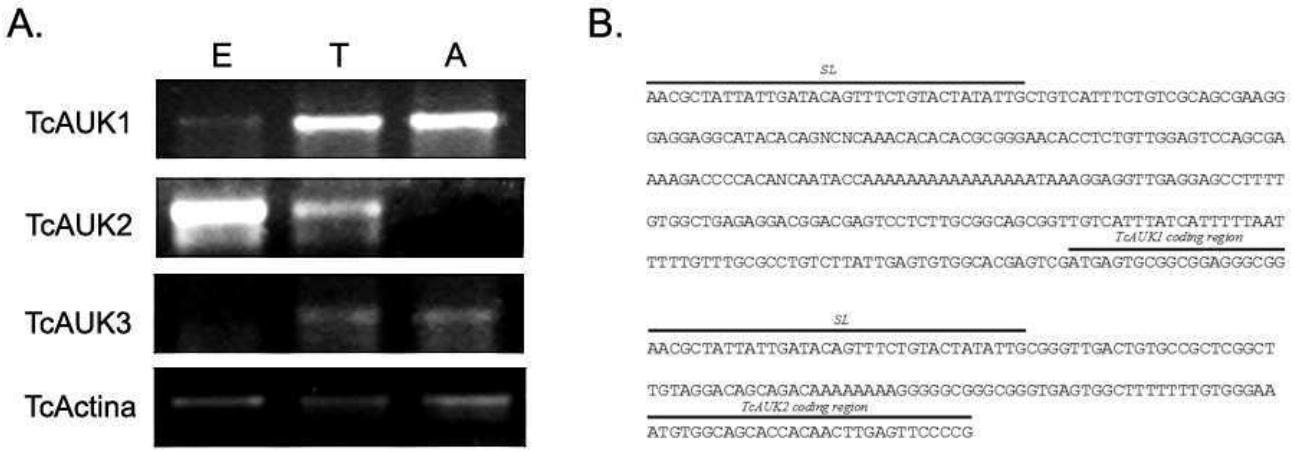


Figura 8. Estudio por RT-PCR de la expresión de las TcAUKs en las tres formas de *T. cruzi*. A. ADN copia fue sintetizado a partir de ARNm de las tres formas del parásito y luego fue usado como templado en ensayos de PCR con *primers* específicos para los distintos genes TcAUK. Como control de carga se realizó PCR con *primers* específicos para el gen de Actina. **B.** Secuencia del 5' UTR de los transcriptos de TcAUK1 y TcAUK2, incluyendo la secuencia del *Spliced Leader* (SL).

El ARNm de TcAUK1 se detecta en las tres formas del parásito, aunque en epimastigotes los niveles de expresión son menores que en las otras formas. Para TcAUK2 sólo se detecta ARNm en las formas epimastigote y tripomastigote, mientras que en amastigotes no hay presencia del transcripto. El gen TcAUK3 se transcribe tanto en tripomastigotes como en amastigotes, no encontrándose ARNm en la forma epimastigote. Esto no concuerda con lo observado en el ensayo de Northern blot, donde sí se detectó la presencia de ARNm del gen TcAUK3. Esta discrepancia puede tener una explicación en que la PCR sobre el ADN copia con los *primers* específicos de TcAUK3 mostró una muy baja eficiencia de amplificación. Los fragmentos de amplificación de TcAUK1 (en tripomastigotes y amastigotes) y de TcAUK2 (en epimastigotes) fueron secuenciados para confirmar su identidad. En la Figura 8 B se muestra la secuencia del 5' UTR de ambos genes (incluyendo al *Spliced Leader*) y parte de la secuencia 5' de las regiones codificantes. Por otra parte, para TcAUK3 no fue posible subclonar los fragmentos de amplificación para su ulterior secuenciación.

La regulación de la expresión génica en organismos tripanosomátidos se da casi exclusivamente a nivel post-transcripcional, y en este sentido operan dos mecanismos como la degradación del ARNm o bien la inhibición de la traducción proteica. Por consiguiente, la información que se obtiene

a partir de un ensayo de RT-PCR conlleva ciertas limitaciones, en el sentido de que la presencia de ARNm no significa que la proteína finalmente se exprese. Para analizar de manera precisa el perfil de expresión de las TcAUKs en los distintos estadios de *T. cruzi* se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos específicos contra las tres enzimas: TcAUK1, TcAUK2 y TcAUK3. Estos anticuerpos fueron diseñados contra péptidos de 14 aminoácidos pertenecientes a cada una de las proteínas (Figura 9) y fueron producidos por la empresa GenScript. Quienes también brindaron asesoramiento en la elección de los péptidos en base a su antigenicidad y la probabilidad de encontrarse en la superficie de las proteínas. Los anticuerpos fueron producidos en conejo y purificados por afinidad, utilizando para esto último los mismos péptidos sintéticos con los cuales los conejos fueron inmunizados. Una vez recibidos, los anticuerpos fueron testeados para su capacidad de reconocer a las correspondientes proteínas TcAUKs en su longitud completa a través de ensayos de Western blot. Para esto se resolvieron en SDS-PAGE extractos proteicos crudos de bacterias *E. coli* inducidas para la expresión de las TcAUKs en forma recombinante. Para cada una de las TcAUKs se realizaron incubaciones en concentraciones decrecientes de anticuerpo primario para determinar la sensibilidad de los mismos. En todos los casos los anticuerpos fueron capaces de reconocer a la proteína recombinante correspondiente, y con sensibilidades muy similares.

TcAUK1

MSAAEGGQVVASYIALPKAPRSDWKASDFEMLHKLGGGNYGDVYLASVRDCNFVCAIKKL
SIKKLAEFDIVAQLRREIEIAFHTRHRYLLRTYGYFFDDTDIYLILEPCSNGMLYTELNR
VKCFPPPTAARYVAQLAEALLYLHQHHILHRDIKPENILLDHNQNIKLADFGWSVHDPHN
RRKTSCGTPEYFPPEIVGRQPYDTSADLWCLGIFCYELLVGKTPFVSKDTENICKKIHAM
QYTIPDTVPPEAKELISSLLLRDGGKRLALHRVVNHPFLLKYYYLPNGIQPPRGKRMRGA
ADFSGGKEN

TcAUK2

MWQHHNLSSPTLGPREAKPTVQTSRRGCMRSDAWCSSLAGGGHDDPSESVPNSRVSPRAS
SFAPPQRTAPSPTESTSQELFELQNCNHHKQQQKQQLVIRQEDIRDDDFQRLEVLGDGSY
SVVVSARHLPTQQLVALKEVSRHRLRELKLEKQLQWEINVHRTLRHPNVVRMLSYYITPQ
TVVLVLEMCPGGTLLQKLKTMPGGRFDERRASRYVRQAARALTYLHGHGIAHRDLKLENI
FLDAHGVARLGDFGWSKALVEPTVEQDLSSHHDNFGTAPCSAAKDVSPLCSGGRGRLTVC
GTLDYLSPEMLIGMPHTFKTDVWSLGVMLAEMLTGAPPFYCVSQQDTLNAIREAAPHLGD
DVQMSSLARELVLAMLQKNPDARPTMAEVLQHPWTRQNGEKKKKKK

TcAUK3

MWSLDDFDIGRKLGEGRFGKIYLAREKRTKCAVAIKCLSKDMIRYHGLAHQLRREVELQEYA
GRCHRHILRLFAYFWDDVRVFLVLEYADGGNLQTLLDTRTQHRVSEEEARRILRPLLSALAF
LHERDVIHRDVKPDNILFKAQAVKLADFSWAVRLDRRVPQHSRRYTLCGTMDYLAPEQISRR
GCTTKADVWALGILTYRMLCGNLPFEHLSAWELCARITRGNVQYPTHLSVEAQNFMESLLCV
DEASRLSCEEALKHPFIVGNSCSLHEASAETELPSAVSFQCSPTPEHWDNRFVRVSLPTYGK
APAVVFAQRRQPQPQQKQQTNNRSGGGGSSQNSINSSNSATCKWVATAACSRSLSDGSFVTV
SSSHSTERIASAPDLTTPNISSAPQREWICSGRAIANGETLKSGSEEVATSSQGASLSRPRN
THSTSDRSGLATTQIGNFIGFSPLILCPNDANDNAEENGVDEREADCVVQLRFDDSLLSLSQ
LTAASASTVDAAENL

Figura 9. Identidad de los péptidos utilizados para la producción de anticuerpos específicos anti-TcAUKs. Se muestra la secuencia completa de las de las proteínas TcAUKs y se resalta de cada una el péptido seleccionado para la producción de anticuerpos policlonales específicos.

A partir de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de la cepa Y se obtuvieron extractos de proteínas totales, los cuales fueron resueltos en SDS-PAGE y analizados para la presencia de las distintas TcAUKs por ensayo de *immunoblotting* (Figura 10). Para este ensayo se utilizó la cepa Y debido al mejor rendimiento para obtener las formas tripomastigote y amastigote. A partir de los

cultivos de células de mamíferos infectadas. Cuando se realizó la incubación con el anticuerpo anti TcAUK1 se detectó una banda principal de aproximadamente 40 kDa que se encuentra en las tres formas del parásito. Con el anticuerpo contra TcAUK2 se detectaron dos bandas, sólo en la forma epimastigote, con pesos moleculares de aproximadamente 65 y 90 kDa. El anticuerpo anti TcAUK3 reconoce un total de 2 bandas, que se encuentran en los tres estadios del parásito, ninguna de las cuales muestra el tamaño esperado para la proteína TcAUK3 (56 kDa).

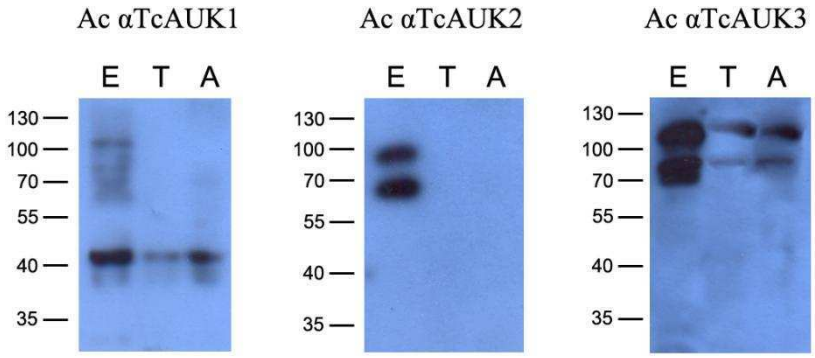


Figura 10. Expresión de las TcAUKs en los tres estadios de *T. cruzi*. Extractos de proteínas totales (entre 40 y 80 µg de masa de proteínas) de epimastigotes (E), tripomastigotes (T) y amastigotes (A) fueron resueltos en SDS-PAGE 10% y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con anticuerpos primarios anti TcAUK1, anti TcAUK2 y anti TcAUK3, y luego con anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a HRP.

5. Estudio de la localización celular de las enzimas TcAUKs

La función de toda proteína está en parte determinada por su localización. Es así para todas las proteínas, tanto las intracelulares como las que cumplen su función en el espacio extracelular. El interior de la célula primariamente se compartimenta en distintas organelas, cada una de las cuales posee proteínas que le son exclusivas y otras que no. A su vez dentro de cada organela se pueden definir dominios donde un grupo de proteínas se aloja y cumplen su función específica. Se pueden nombrar numerosos ejemplos de esto: proteínas chaperonas encargadas del plegamiento de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico; receptores de membrana que reconocen a su ligando extracelular e interaccionan con proteínas citoplasmáticas para iniciar la cascada de señalización; factores de replicación y de la transcripción que cumplen su función dentro del núcleo celular; y muchos otros ejemplos. Asimismo, puede hacerse una distinción entre proteínas que poseen una localización estable y otras que varían su localización a lo largo del ciclo celular. Las enzimas de la familia Aurora quinasa pertenecen a este segundo tipo de proteínas. Todas las Aurora quinasas hasta el momento descriptas muestran un comportamiento similar en cuanto a su localización a lo largo del ciclo celular. Los trabajos pioneros en el estudio de esta familia de enzimas tienen un fuerte componente en la descripción de su localización subcelular, y en todos los casos es la localización dinámica de estas enzimas durante el ciclo celular lo que las definen como miembro de la familia de proteínas Aurora quinasas.

Para el estudio de la localización subcelular de las TcAUKs se abordaron 2 estrategias principales. En un principio, al no contar con anticuerpos específicos contra estas proteínas, se optó por expresarlas fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP). Para lograr esto las distintas enzimas fueron clonadas en el vector de expresión pTEX-eGFP-TEV-HA-EEF (gentilmente cedido por el Dr. Leon A. Bouvier), con el fin de obtener epimastigotes que expresaran las distintas TcAUKs fusionadas en su extremo C-terminal a GFP. Este vector se mantiene como un episoma dentro de los parásitos. A pesar de haber obtenido las construcciones para las 4 TcAUKs (TcAUK1, TcAUK2s y L, y TcAUK3) y haber transfectado epimastigotes con estas 4 construcciones, por Western blot con anticuerpo específico anti GFP sólo pudimos confirmar la expresión de la fusión TcAUK2-GFP (Figura 11). De todos modos se observaron por microscopia de epifluorescencia muestras de todos los cultivos de epimastigotes, a los que denominó: pTEX-GFP (vector vacío), pTEX-TcAUK1-GFP, pTEX-TcAUK2s-GFP, pTEX-TcAUK2L-GFP, pTEX-TcAUK3-GFP.

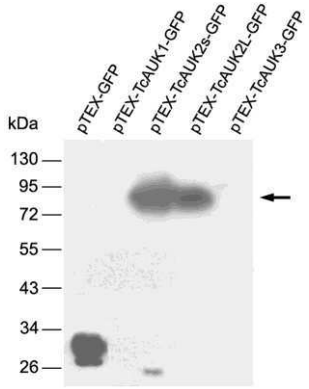


Figura 11. Western blot GFP en epimastigotes expresando fusión TcAUKs-GFP. Muestras de los cuatro cultivos fueron probadas para la expresión de las distintas TcAUKs fusionadas a GFP. Extractos crudos (50 µg de proteínas totales) fueron resueltos en SDS-PAGE 12% y transferidos a membrana de PVDF. La igualdad de carga de proteína fue confirmada por tinción de la membrana con azul de Coomassie.

En los epimastigotes transfectados con el vector vacío se pudo observar una señal de GFP uniforme en todo el citoplasma (Figura 12), siendo lo que esperábamos ya que no hay reporte de que GFP posea alguna localización específica dentro de la célula cuando es expresada en forma ectópica. Esto dio sustento a la idea de que cualquier localización específica que viéramos cuando se expresaran las distintas fusiones TcAUKs-GFP sería un indicio de la localización de las TcAUKs dentro de la célula. Otro aspecto destacable cuando se observaron los epimastigotes pTEX-GFP, luego del período de selección, fue que no todos mostraban señal verde (Figura 12, flechas blancas), indicando que ciertas células a pesar de poseer la construcción no expresaban la proteína GFP. Esto podría ser atribuido a cierta inestabilidad de la expresión en el vector.

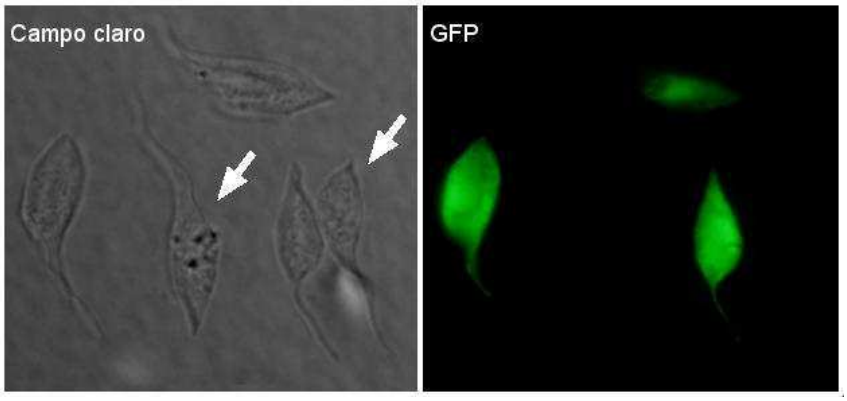


Figura 12. Epimastigotes CL Brener transfectados con el vector pTEX-eGFP-TEV-HA-EEF. Imagen de epifluorescencia donde se observa la marca difusa de GFP en todo el soma del parásito. Las flechas blancas señalan epimastigotes que no muestran señal para GFP.

La segunda estrategia, una vez obtenidos los anticuerpos específicos anti TcAUKs, consistió en ensayos de inmunofluorescencia. Estos ensayos, a diferencia de la generación de epimastigotes

transgénicos que expresen las proteínas fusionadas, permitieron estudiar la localización de las TcAUKs en las 3 formas de *T. cruzi*.

5.1. Localización subcelular de TcAUK1

5.1.1. Análisis mediante la expresión con fusión a GFP

Epimastigotes transfectados con la fusión TcAUK1-GFP fueron observados por microscopía de epifluorescencia (Figura 13 A), detectándose señal verde en unas pocas células (aproximadamente 5% del total). En todos estos casos la señal concordaba con la marca de DAPI del núcleo celular, indicando que TcAUK1 podría ser una proteína de localización nuclear. Un análisis más profundo de las células con señal positiva confirmó la localización en el núcleo de la señal de TcAUK1-GFP (Figura 13 B). La baja proporción de parásitos con señal positiva pudo ser la causa por la que no se detectó la proteína de fusión TcAUK1-GFP en el Western blot (Figura 11). Lo llamativo es que, si bien ya en los parásitos transfectados con el vector vacío había cierta proporción que no mostraban señal de GFP, en los que expresan la fusión TcAUK1-GFP esta proporción fue mucho mayor. Considerando que las proteínas Aurora quinasas de otros organismos poseen una estricta regulación de su expresión durante el ciclo celular, es posible que la baja proporción de señal positiva se deba a algún tipo de regulación en la expresión de la propia TcAUK1. Otro aspecto que nos lleva a plantear esta hipótesis es que la señal no fue homogénea en su intensidad, sino que mostraba variación entre los distintos parásitos en donde fue detectada. Si bien la fluorescencia en este caso no fue cuantificada, la diferencia en las intensidades entre los distintos parásitos era evidente y podría ser reflejo de las distintas fases del ciclo celular representadas en el cultivo asincrónico.

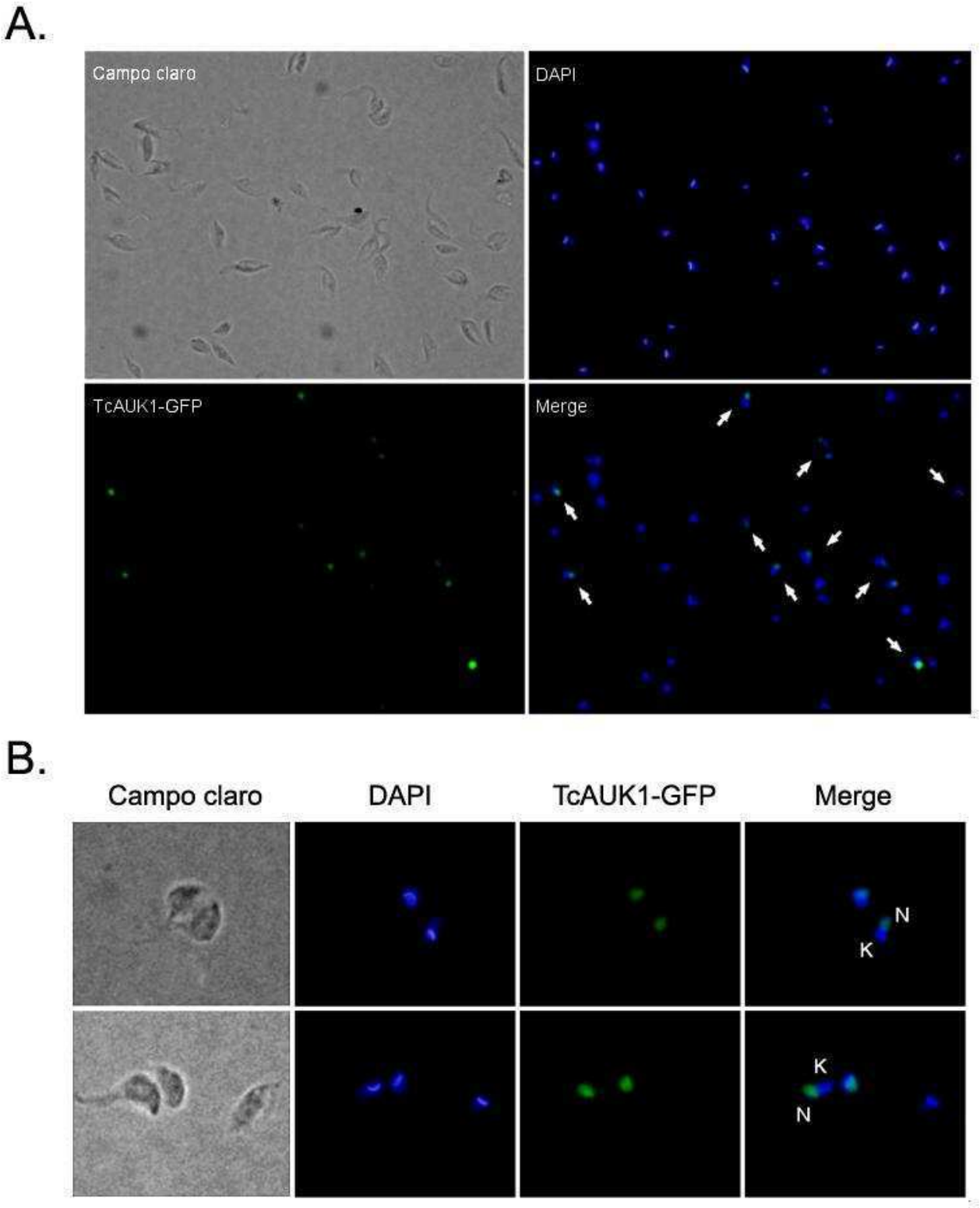


Figura 13. Localización de la fusión TcAUK1-GFP. Epimastigotes transfectados con la construcción pTEX-TcAUK1-GFP fueron preparados para ser observados en microscopio de epifluorescencia. **A.** Imágenes de 40x de magnificación, las flechas blancas señalan aquellos parásitos que muestran señal positiva para TcAUK1-GFP. **B.** Imágenes de 100x de magnificación, se identifica al kinetoplasto (K) y al núcleo (N).

Ante este resultado, y con el objetivo de determinar si la baja proporción de células con señal verde es resultado de una inestabilidad de la construcción transfectada o bien fruto de una regulación sobre TcAUK1, es que se decidió generar la fusión de TcAUK1 a GFP por PCR y luego clonarla en el vector pTREX. Este es un vector de inserción, que genera una transfección altamente estable y produce altos niveles de expresión del transgen. Si la heterogeneidad en la expresión observada en epimastigotes pTEX-TcAUK1-GFP fuera consecuencia de una inestabilidad de la construcción, los epimastigotes transfectados con la fusión TcAUK1 a GFP inserta en el vector pTREX deberían mostrar por lo menos características diferentes en el patrón de expresión del transgen. La fusión de TcAUK1 con GFP por PCR permitió generar la fusión de GFP tanto al extremo C-terminal como N-terminal de TcAUK1. Esta era otra variación que nos permitiría evaluar si la fusión en el C-terminal de TcAUK1 (es el caso de la construcción pTEX-TcAUK1-GFP) pudo ser la causa de la heterogeneidad observada en la expresión del transgen. La estrategia para lograr la fusión por PCR consiste en diseñar uno de los *primers* para que contenga la secuencia de las dos proteínas a fusionar. En este caso, fue diseñado un *primer forward* para TcAUK1 que contenía parte de la secuencia de GFP para lograr la fusión en el N-terminal (Figura 14) y un *primer forward* para GFP con parte de la secuencia de TAUK1 para obtener la fusión en el C-terminal. Por medio de esta técnica sólo se logró obtener la fusión de GFP en el extremo N-terminal de TcAUK1, para luego clonarla en el vector pTREX y obtener la contrucción pTREX-GFP-TcAUK1.

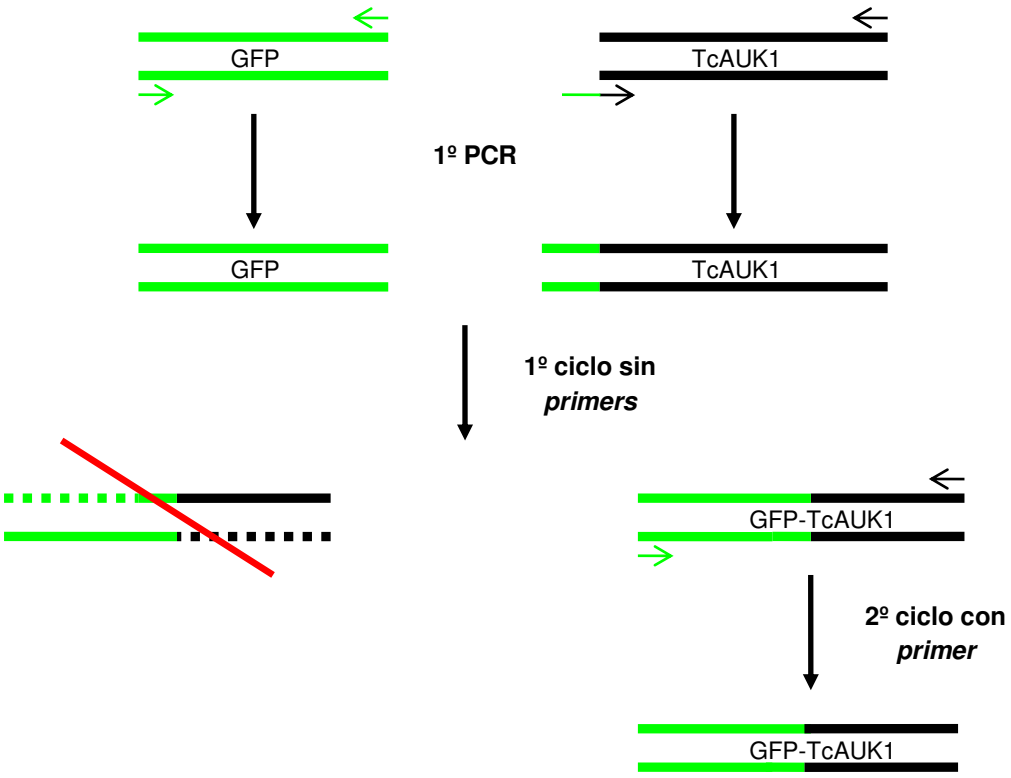


Figura 14. Esquema de fusión de GFP al extremo N-terminal de TcAUK1 por PCR. Los genes GFP y TcAUK1 fueron amplificados por separado por PCR, utilizando un primer forward para TcAUK1 que contiene una secuencia complementaria al extremo 5' de GFP. En un primer ciclo de PCR (sin *primers*) esta región complementaria sirvió como *primer* para amplificar a GFP fusionada al extremo 5' de TcAUK1 (GFP-TcAUK1). En un segundo ciclo de PCR, con *primer forward* para GFP y *reverse* para TcAUK1, se amplificó la fusión generada en el ciclo anterior.

Epimastigotes de la cepa CL Brener fueron transfectados con las construcciones pTREX-GFP y pTREX-GFP-TcAUK1. Nuevamente la mayor parte de los epimastigotes transfectados con la fusión GFP-TcAUK1 no mostraron ningún tipo de señal al microscopio de epifluorescencia, y en aquellos donde se detectaba señal la misma se mostraba heterogénea en cuanto a su intensidad (Figura 15 B). Aquí el contraste con la señal que mostraban los epimastigotes transfectados con GFP sola fue mucho más notorio ya que, a diferencia de los epimastigotes transfectados con pTEX-GFP, absolutamente todas las células del cultivo pTREX-GFP mostraban una señal verde muy intensa (Figura 15 A). Esto es otro respaldo a la idea de que los bajos niveles de expresión de la fusión TcAUK1 y GFP sea probablemente consecuencia de algún tipo de regulación sobre la expresión de TcAUK1. En aquellos parásitos donde la señal fue detectada, la fusión mostró la misma localización nuclear (Figura 15 C) que en el caso de los epimastigotes transfectados con la construcción pTEX-TcAUK1-GFP.

Por consiguiente, la expresión de TcAUK1 fusionada a GFP deja dos observaciones importantes y que poseen un fuerte sustento, por el hecho de los resultados reproducibles con la utilización de dos construcciones con propiedades diferentes (pTEX-TcAUK1-GFP y pTREX-GFP-TcAUK1). La primera es que la baja proporción de células con señal positiva para la fusión sugiere que TcAUK1 está sujeta a un mecanismo estricto de regulación en sus niveles de expresión. La otra es la localización nuclear de la proteína.

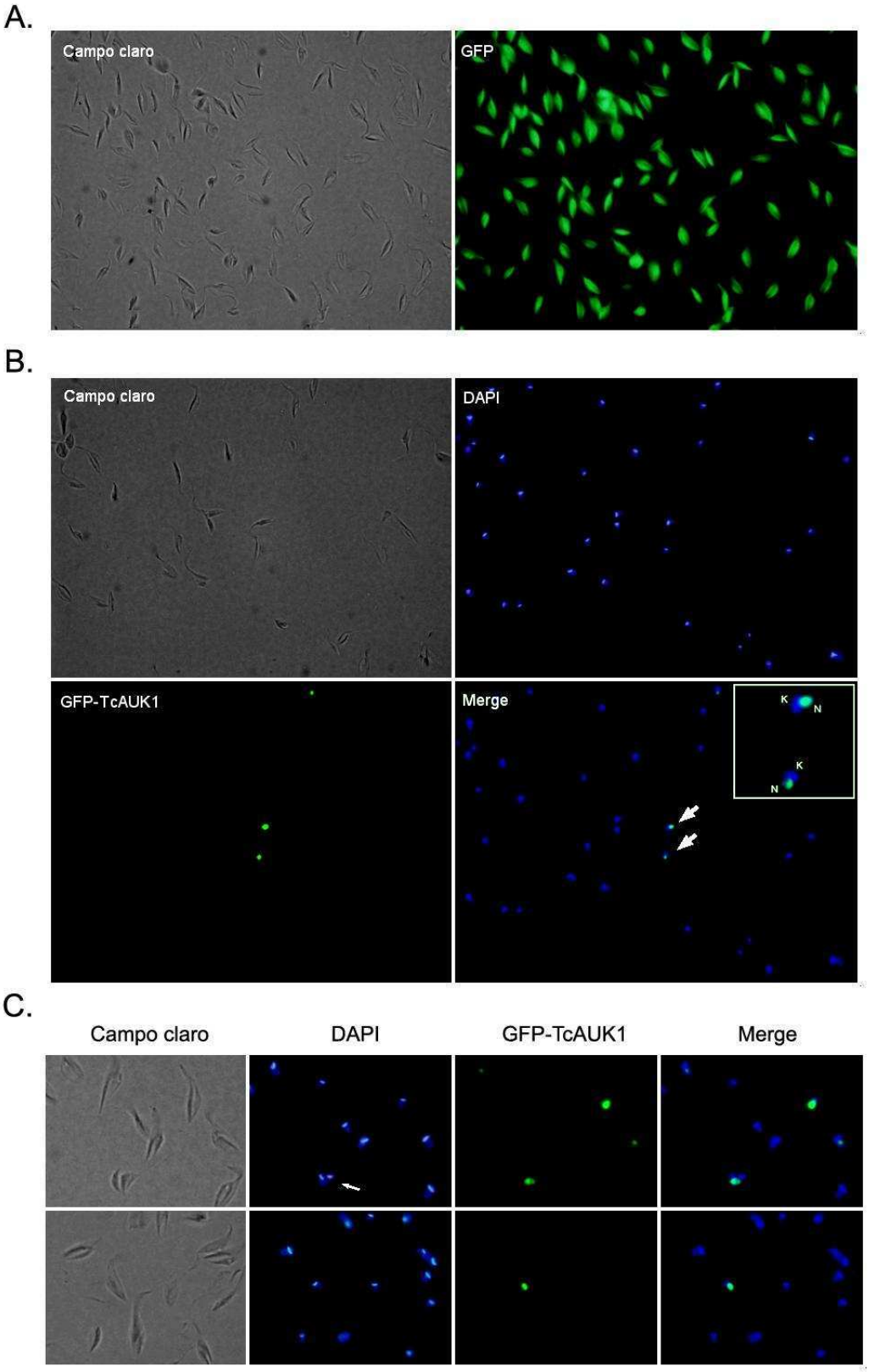


Figura 15. Localización de la fusión GFP-TcAUK1, generada por PCR y clonada en el vector pTREX. Por microscopia de epifluorescencia se analizó la localización de la proteína de fusión GFP-TcAUK1. **A.** Imágenes 40x de magnificación de epimastigotes transfectados con la construcción pTREX-GFP. **B.** Imágenes 40x de magnificación de epimastigotes transfectados con la construcción pTREX-GFP-TcAUK1.

Las flechas blancas señalan parásitos que expresan la fusión, amplificados en el recuadro e identificándose al kinetoplasto (K) y al núcleo (N). **C.** Imágenes 100x de magnificación de epimastigotes pTREX-GFP-TcAUK1. La flecha blanca señala expresión de la fusión en un parásito en mitosis.

Tanto para la construcción pTEX-TcAUK1-GFP como para pTREX-GFP-TcAUK1, una gran cantidad de células que expresan la fusión presentan una morfología acorde a la fase M del ciclo celular (Figura 13 B; Figura 15 C flecha blanca). Para poder ahondar en esta observación las células fueron marcadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti β-tubulina. La marcación de microtúbulos nos permite observar con más nitidez la morfología de la célula y con esto, junto al número de kinetoplastos y núcleos, determinar la fase del ciclo celular en la cual una célula se encuentra. La mitosis de *Trypanosoma cruzi* puede ser seguida cronológicamente en base al número de flagelos, kinetoplastos y núcleos que muestra una célula. Durante el ciclo celular la duplicación de cada una de estas estructuras muestra la siguiente secuencia temporal: flagelo, kinetoplasto y núcleo [72]. Así una célula con dos flagelos, un único núcleo y un kinetoplasto (2F1N1K) se encuentra al final de la fase S y principio de la G2; una célula con dos flagelos, un núcleo y dos kinetoplastos (2F1N2K) corresponde al final de la fase G2 y comienzo de la mitosis; mientras que, una célula con dos flagelos, dos núcleos y dos kinetoplastos (2N2K2F) se encuentra al final de la mitosis previo a la citoquinesis.

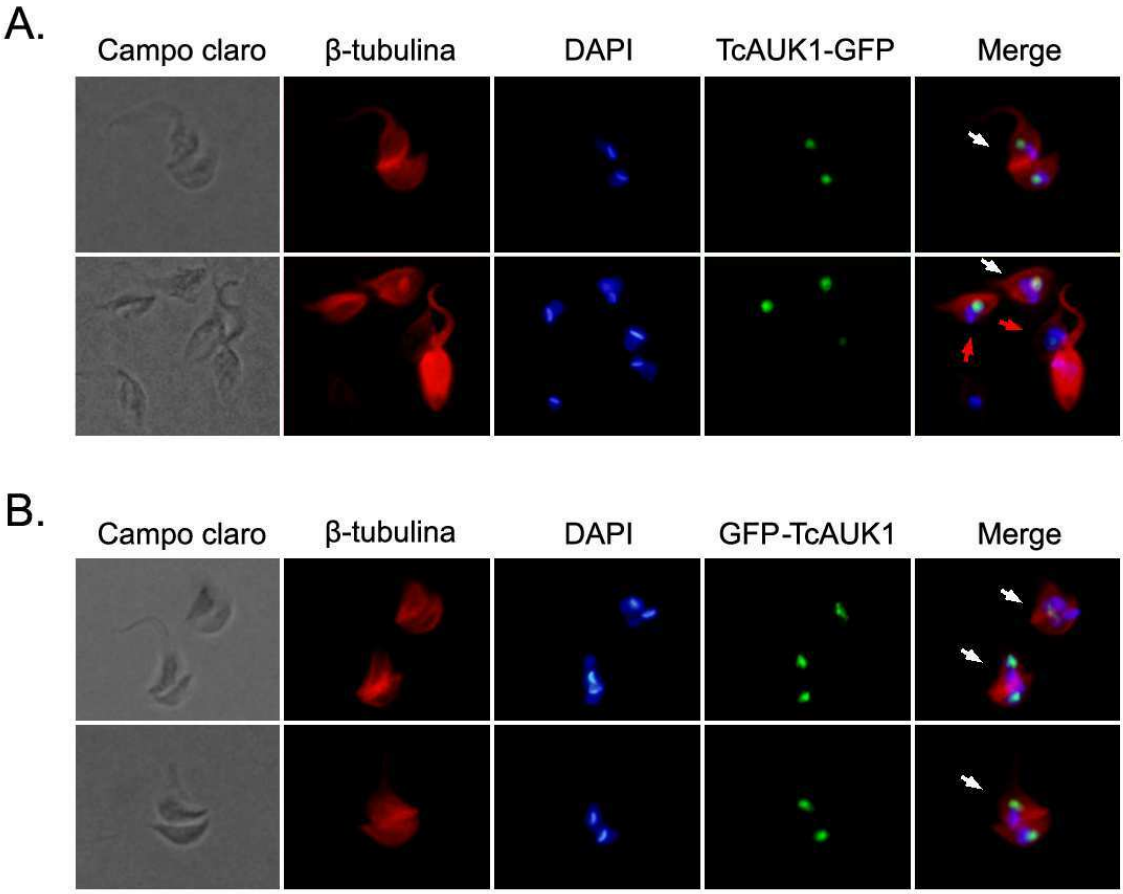


Figura 16. Morfología de epimastigotes expresantes de la fusión TcAUK1 y GFP. Con un anticuerpo contra β-tubulina se marcó el citoesqueleto de epimastigotes pTEX-TcAUK1-GFP (A) y pTREX-GFP-TcAUK1 (B). **A.** La flecha blanca marca una célula en fase M (1N2K y 2N2K) y las flechas rojas células en interfase (1N1K), todas con expresión de TcAUK1-GFP. **B.** Las flechas blancas marcan células en fase M (2N2K) y que expresan la fusión GFP-TcAUK1.

Todas las células en la fase M del ciclo celular (2F1N2K o 2F2N2K) muestran expresión de la fusión TcAUK1 con GFP (Figura 16). Asimismo, algunas células 1N1K también muestran expresión de la fusión. Esta observación sugiere que la fuerte regulación de la expresión de TcAUK1 podría estar relacionada con la progresión del ciclo celular, y que ésta tendría su pico de expresión durante la mitosis. Sin embargo, hay que considerar que ésta conclusión se basa en datos de parásitos que se ven forzados a sobreexpresar la enzima. Si ésta proteína posee efectos deletéreos cuando es sobreexpresada, la tendencia a expresarse a altos niveles podría desatar una exacerbación del mecanismo de regulación que podría ir más allá de la modulación específica para la expresión de ésta proteína. No hay que descartar que en éstos parásitos esté actuando un mecanismo de regulación negativa que sea reflejo del fenómeno de la sobreexpresión, y no un mecanismo específico para la enzima TcAUK1. El mejor enfoque para estudiar la regulación de TcAUK1 es analizar a la proteína endógena.

5.1.2. Análisis mediante inmunolocalización

A partir de la obtención del anticuerpo específico contra la proteína TcAUK1 se planteo el objetivo de analizar la localización subcelular de TcAUK1 en epimastigotes WT, así como en las formas amastigote y tripomastigote. Para esto se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre las distintas formas del parásito. En epimastigotes, TcAUK1 muestra una localización cercana al kinetoplasto detectándose como uno o dos puntos circundantes a la organela (Figura 17). Así como el número de puntos varía, también lo hace la ubicación relativa de los mismos respecto al kinetoplasto. Sin embargo, en la mayoría de los parásitos se observan dos puntos localizados uno en cada extremo del kinetoplasto.

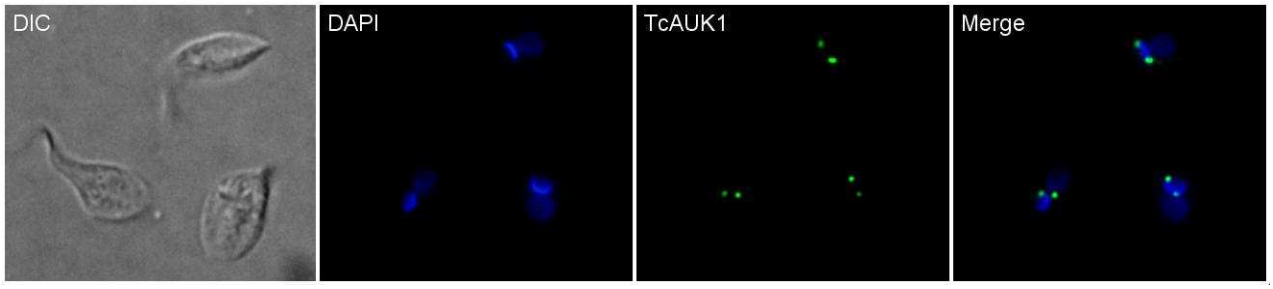


Figura 17. Localización subcelular de TcAUK1. Inmunofluorescencia sobre epimastigotes CL Brener WT con anticuerpo primario contra TcAUK1. El fue marcado con DAPI.

Esta localización observada por inmunofluorescencia no coincide con la localización nuclear que mostraron los epimastigotes expresantes de TcAUK1 fusionada a GFP. Considerando que las proteínas de la familia Aurora quinasa modifican su localización a lo largo del ciclo celular nos preguntamos si la ubicación nuclear observada con la fusión corresponde a una determinada fase del ciclo. Para confirmar esto, epimastigotes WT fueron sincronizados para obtener muestras de las distintas fases del ciclo celular. La sincronización del ciclo celular se logró incubando las céulas con hidroxiurea (HU) durante 24 hs. La HU es un inhibidor de la síntesis de ADN que bloquea la progresión del ciclo celular en el límite entre las fases G1 y S. De esta forma, al incubar los epimastigotes en HU se logró arrestar el ciclo de todas las células al final de la fase G1. Luego de 24 hs el cultivo fue liberado y se tomaron muestras a distintos tiempos para obtener muestras de ditintas fases del ciclo celular. Ensayos de inmunofluorescencia realizados contra TcAUK1 en epimastigotes sincronizados mostraron que esta proteína varía su localización durante el ciclo celular. Durante las fases G1 y S, TcAUK1 se observa en dos focos ubicados en la proximidad del kinetoplasto (Figura 18 A), la misma localización observada en epimastigotes asincrónicos (Figura 17). En fase G2, mientras la célula divide su kinetoplasto, TcAUK1 se detecta como un único punto adyacente al mismo (Figura 18 B). Durante la mitosis TcAUK1 muestra una posición dual. Por un lado conserva la localización adyacente al kinetoplasto, y por otro se localiza dentro del núcleo. Aquí adquiere una distribución idéntica a la arquitectura que adoptan los microtúbulos formando el huso mitótico (Figura 18 B).

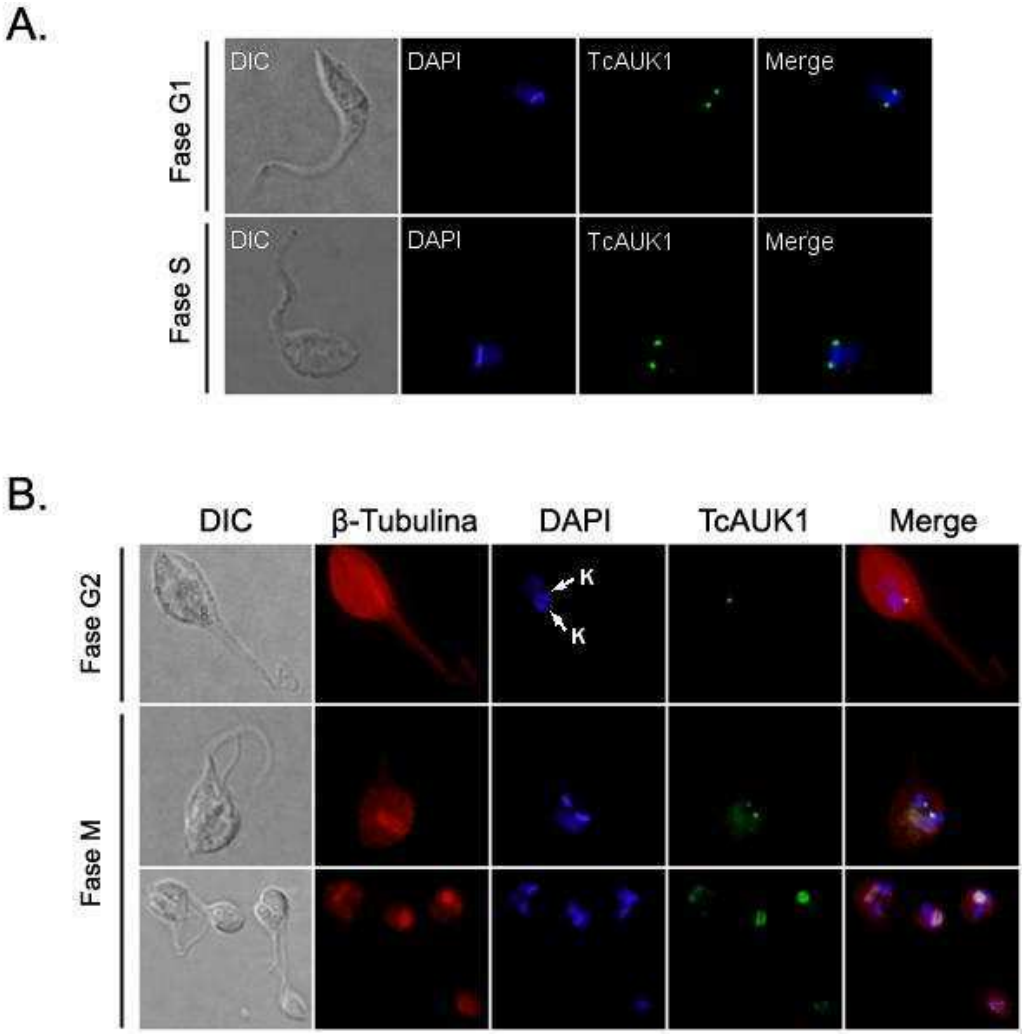


Figura 18. Localización de TcAUK1 en epimastigotes WT a lo largo del ciclo celular. Inmunofluorescencia contra TcAUK1 en epimastigotes CL WT sincronizados. **A.** Parásitos en interfase (fases G1 y S). **B.** Epimastigotes en fase G2 y M con microtúbulos marcados por inmunofluorescencia contra β-tubulina. En la fase G2 se marca la división insipiente del kinetoplasto (K).

Para la propagación de las formas amastigote y tripomastigote se utilizaron cultivos de células VERO, las cuales fueron infectadas con la forma tripomastigote del parásito. Durante el mantenimiento de células VERO infectadas es posible encontrar con el transcurso de los días tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante. Los tripomastigotes son liberados de células que se lisan producto de la alta carga de parásitos dentro de ellas, mientras que los amastigotes libres son producto de células que sufren lisis espontánea en el momento que alojan a esta forma del parásito. Para estudiar la localización de TcAUK1 en tripomastigotes y amastigotes se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en parásitos aislados a partir del sobrenadante de cultivo de células VERO infectadas. Sólo en la forma amastigote fue detectada TcAUK1, mientras que los tripomastigotes no mostraron señal para esta proteína. En estos amastigotes, TcAUK1 muestra una localización bien próxima al kinetoplasto similar a lo observado en epimastigotes interfásicos. La

diferencia entre estas dos formas celulares es que en todos los amastigotes se observa un único foco de localización y no dos como en epimastigotes (Figura 19). Este único foco muestra variaciones en su posición relativa al kinetoplasto entre las distintas células, pudiendo estar delante de la cara anterior del kinetoplasto o bien alojarse entre esta organela y el núcleo.

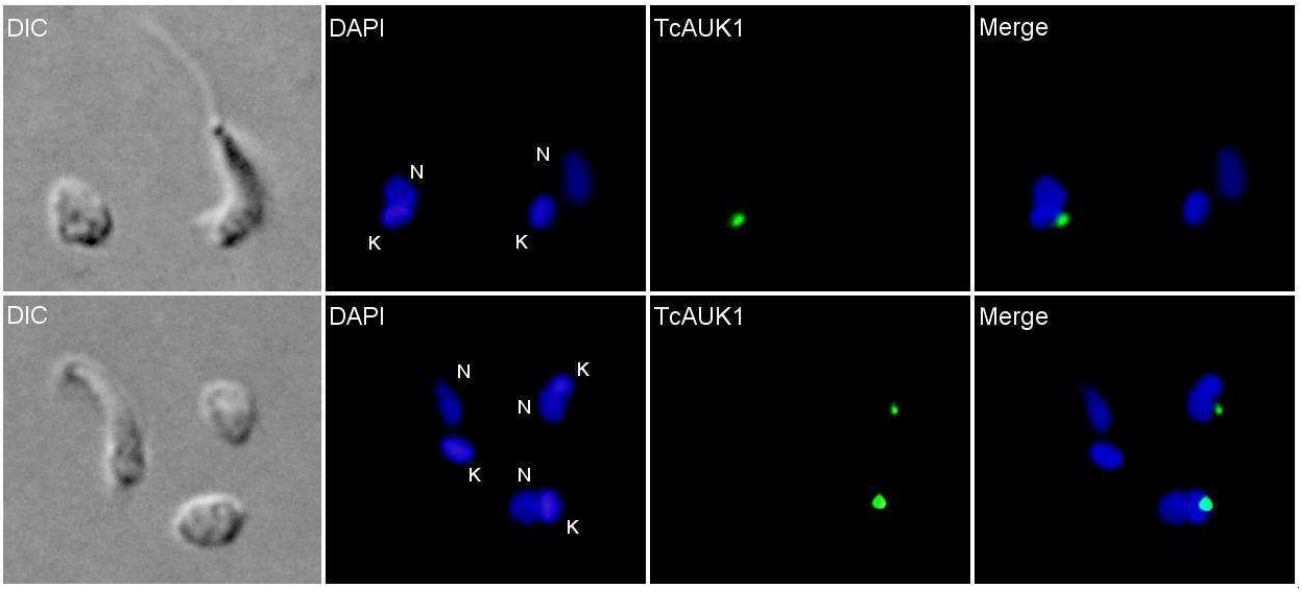


Figura 19. Localización de TcAUK1 en amastigotes extracelulares. Inmunofluorescencia contra TcAUK1 en tripomastigotes y amastigotes aislados a partir de sobrenadante de cultivo de células infectadas con *T. cruzi*, se identifica en cada célula al núcleo (N) y el kinetoplasto (K).

Si bien el sobrenadante de cultivo de células infectadas es una fuente sencilla a partir de la cual obtener amastigotes de *T. cruzi*, la realidad es que esta forma en el ciclo de vida del parásito está confinada al interior de la célula de mamíferos, en donde se replica hasta diferenciarse nuevamente en tripomastigote. Con el objetivo de estudiar la localización que adopta TcAUK1 en amastigotes intracelulares se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células VERO infectadas con tripomastigotes. Con la idea de abarcar completamente las distintas etapas del ciclo intracelular del parásito, la inmunolocalización se realizó sobre células a distintos tiempos (días 2, 7 y 11) post-infección. En células VERO a los dos días de haber sido infectadas se observan amastigotes en baja densidad cercanos al núcleo y pocos tripomastigotes ubicados en una posición más periférica. En todos los amastigotes, TcAUK1 muestra una localización nuclear (Figura 20 A) con una distribución homogénea. De los pocos tripomastigotes presentes en el citoplasma celular, en algunos TcAUK1 también muestra localización nuclear con distribución homogénea, mientras que en otros no se detecta señal para TcAUK1. En células VERO donde la densidad de amastigotes intracelulares es mayor (7 y 11 días post-infección, Figura 20 B), TcAUK1 no se aloja en el núcleo sino que se observa como focos puntuales adyacentes al kinetoplasto, la misma localización que muestra esta proteína en epimastigotes en interfase.

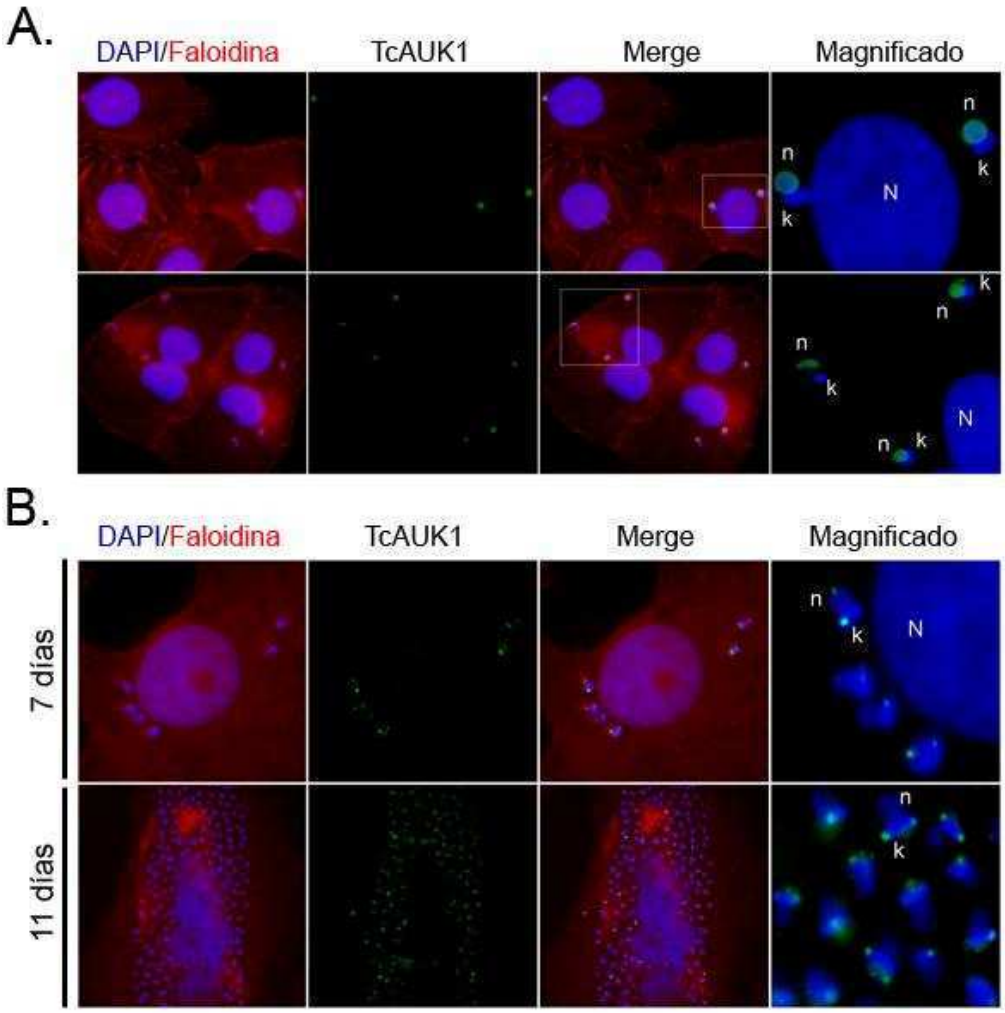


Figura 20. Localización de TcAUK1 en amastigotes intracelulares. Inmunofluorescencia contra TcAUK1 en células VERO infectadas con *T. cruzi*. Los filamentos de actina de las células VERO fueron marcados con Faloidina-Rodamina. En la marcación con DAPI se observa el núcleo de las células VERO (N) y alrededor de éste los núcleos (n) y kinetoplastos (k) de los amastigotes y tripomastigotes.

En ciertos amastigotes intracelulares, a los dos días post infección, TcAUK1 no muestra una distribución homogénea dentro del núcleo sino que adquiere una conformación ahusada. Una característica común en todos estos amastigotes es el cambio de orientación del kinetoplasto, mostrando una rotación de 90° de su eje longitudinal respecto al kinetoplasto de amastigotes con distribución nuclear homogénea de TcAUK1 (Figura 20 A. vs Figura 21).

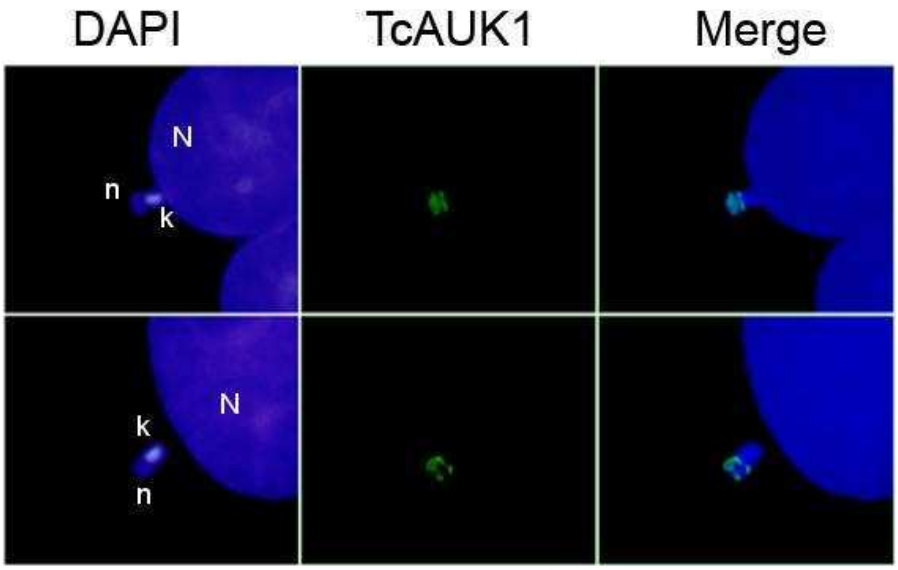


Figura 21. Distribución nuclear de TcAUK1 en amastigotes intracelulares. Imágenes magnificadas de la inmunofluorescencia contra TcAUK1 en células VERO infectadas. En la marcación con DAPI se distinguen el núcleo de las células VERO (N), el núcleo (n) y el kinetoplasto (k) de los amastigotes.

El estudio detallado de la localización de TcAUK1 a lo largo del ciclo celular en epimastigotes, así como en las formas amastigote y tripomastigote del parásito, mostró que la misma posee un comportamiento dinámico. Principalmente encontramos a esta proteína en dos regiones alternantes, alrededor del kinetoplasto y en el núcleo. Estas dos localizaciones se dan incluso en una misma forma del parásito y parecen responder a las fases del ciclo celular en el cual se encuentra la célula. Este comportamiento de TcAUK1 no es extraño ya que todas las enzimas Aurora quinasa caracterizadas en otros organismos muestran un comportamiento dinámico en cuanto a su localización, el cual responde principalmente a las fases del ciclo celular.

5.2. Localización subcelular de TcAUK2

5.2.1. Análisis mediante la expresión con fusión a GFP

Al observar los epimastigotes pTEX-TcAUK2s-GFP y pTEX-TcAUK2L-GFP por microscopía de epifluorescencia, la señal de la fusión TcAUK2-GFP se detecta esparcida por el citoplasma con un foco de mayor intensidad ubicado en la región de la base del flagelo anterior al kinetoplasto(Figura 22 A). Al igual que en el caso de todas las construcciones con el vector pTEX-GFP, aquí también el cultivo de transgénicos mostró un patrón de expresión heterogéneo. Sin embargo, a diferencia de los epimastigotes pTEX-TcAUK1-GFP, en este caso la mayoría de las células (>70%) mostraron señal positiva para la fusión TcAUK2-GFP. Al observase la misma distribución de la señal correspondiente a la fusión tanto en epimastigotes transfectados con TcAUK2s como con TcAUK2L, todos los estudios ulteriores fueron realizados sobre epimastigotes pTEX-TcAUK2s-GFP.

Al observar la ubicación del foco de mayor intensidad surgió el interrogante sobre qué estructuras se encuentran en esta región y si es posible que TcAUK2 se encuentre asociada a alguna de las mismas. La estructura más destacada que se encuentra en esta región en epimastigotes de *T. cruzi* es el cuerpo basal [34, 188, 189], por lo que fue la primera estructura a ser evaluada como posible lugar de alojamiento de TcAUK2. Para esto, epimastigotes pTEX-TcAUK2s-GFP fueron marcados en su cuerpo basal por inmunofluorescencia usando como marcador un anticuerpo que reconoce la forma tirosinada de la α-tubulina [190, 191], denominado YL 1/2. La forma tirosinada de la α-tubulina se encuentra solamente en microtúbulos recientemente polimerizados, mientras que en microtúbulos estables de α-tubulina es destirosinada de forma activa [192]. De este modo, el anticuerpo YL 1/2 es utilizado para marcar a los centros de organización de microtúbulos (MTOC), como lo es el cuerpo basal, en donde hay un constante proceso de polimerización y despolimerización de microtúbulos. La marca del cuerpo basal en estas células localiza en la misma región que TcAUK2, y se observa que esta proteína se encuentra en estrecha relación con esta estructura. Sin embargo, no puede confirmarse que TcAUK2 localize exactamente en el cuerpo basal debido a que no se utilizó la técnica de micrsocopía confocal para observar la muestra de inmunofluorescencia.

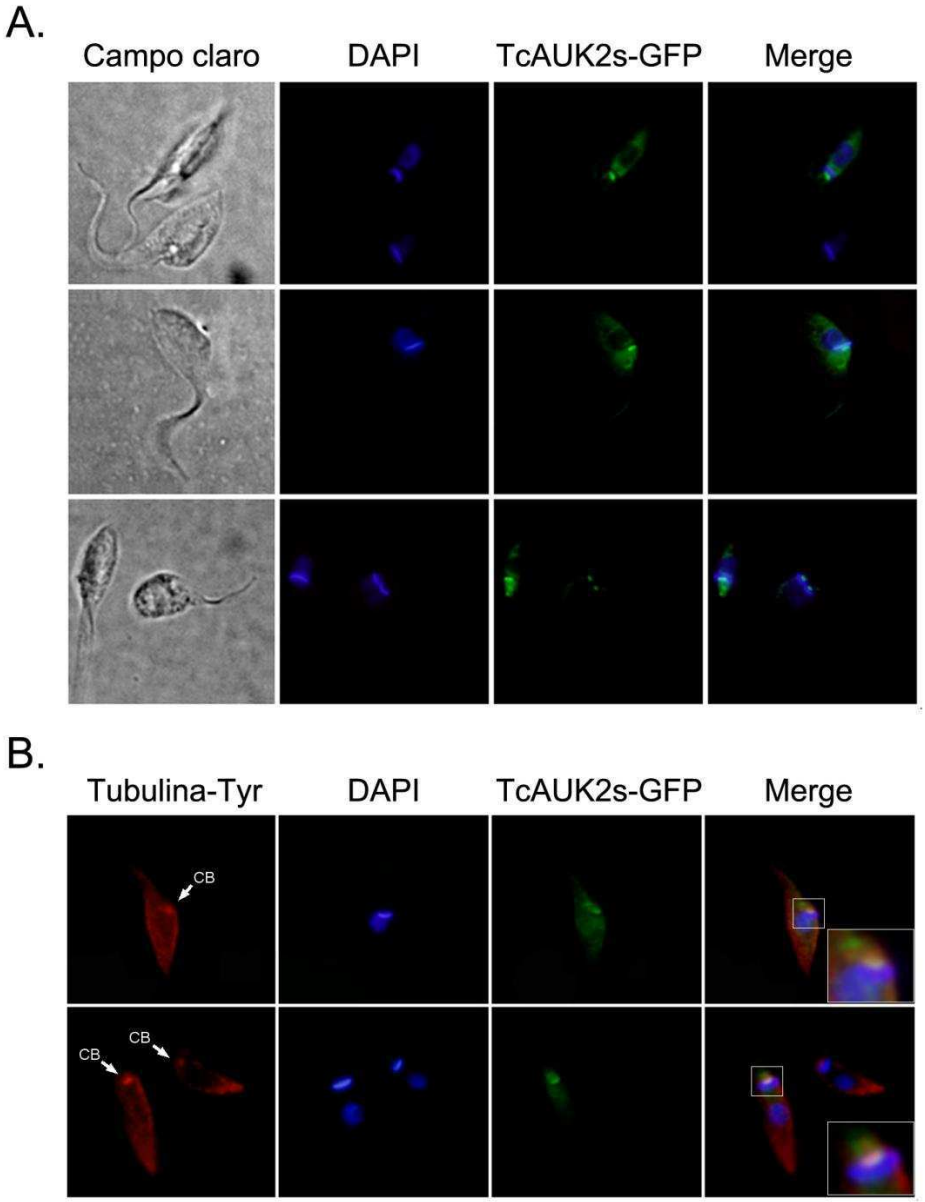


Figura 22. Localización de la fusión TcAUK2s-GFP en epimastigotes de *T. cruzi*. A. Imágenes de epifluorescencia de epimastigotes pTEX-TcAUK2s-GFP. El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI. **B.** Imágenes de epifluorescencia de epimastigotes pTEX-TcAUK2s-GFP marcados en su cuerpo basal (CB) con anticuerpo YL 1/2 (Tubulina-Tyr). En los recuadros se magnifica la región donde localizan el cuerpo casal y el punto de mayor intensidad de la señal TcAUK2s-GFP.

5.2.2. Análisis por inmunolocalización

Con el objetivo de estudiar la localización de TcAUK2 durante el ciclo de vida del parásito, las distintas formas del mismo fueron inmunomarcadas con anticuerpo específico anti TcAUK2. Epimastigotes en interfase (1F1N1K), tomados de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, muestran una localización puntual de TcAUK2 en la cara anterior del kinetoplasto, en la región del bolsillo flagelar. En algunos casos, junto a esta ubicación también puede observarse una

localización puntual de la proteína entre el núcleo y el kinetoplasto (Figura 23). En tripomastigotes aislados de sobrenadante de cultivo de células VERO infectadas, TcAUK2 muestra una distribución dispar entre las distintas células. Algunas muestran una localización puntual de esta proteína, la que es detectada en la región comprendida entre el núcleo y el kinetoplasto; otras células muestran una señal de alta intensidad con distribución esparcida por todo el citoplasma. Sin embargo, estas últimas células muestran una mayor concentración de la intensidad en la región comprendida entre el núcleo y el kinetoplasto (Figura 23). Esta diferencia de intensidad entre distintos tripomastigotes sugiere la posibilidad de variaciones temporales en los niveles de expresión de TcAUK2. Sin embargo, esta variación no puede ser atribuida a la progresión del ciclo celular ya que la forma tripomastigote de *T. cruzi* es una célula en estado quiescente.

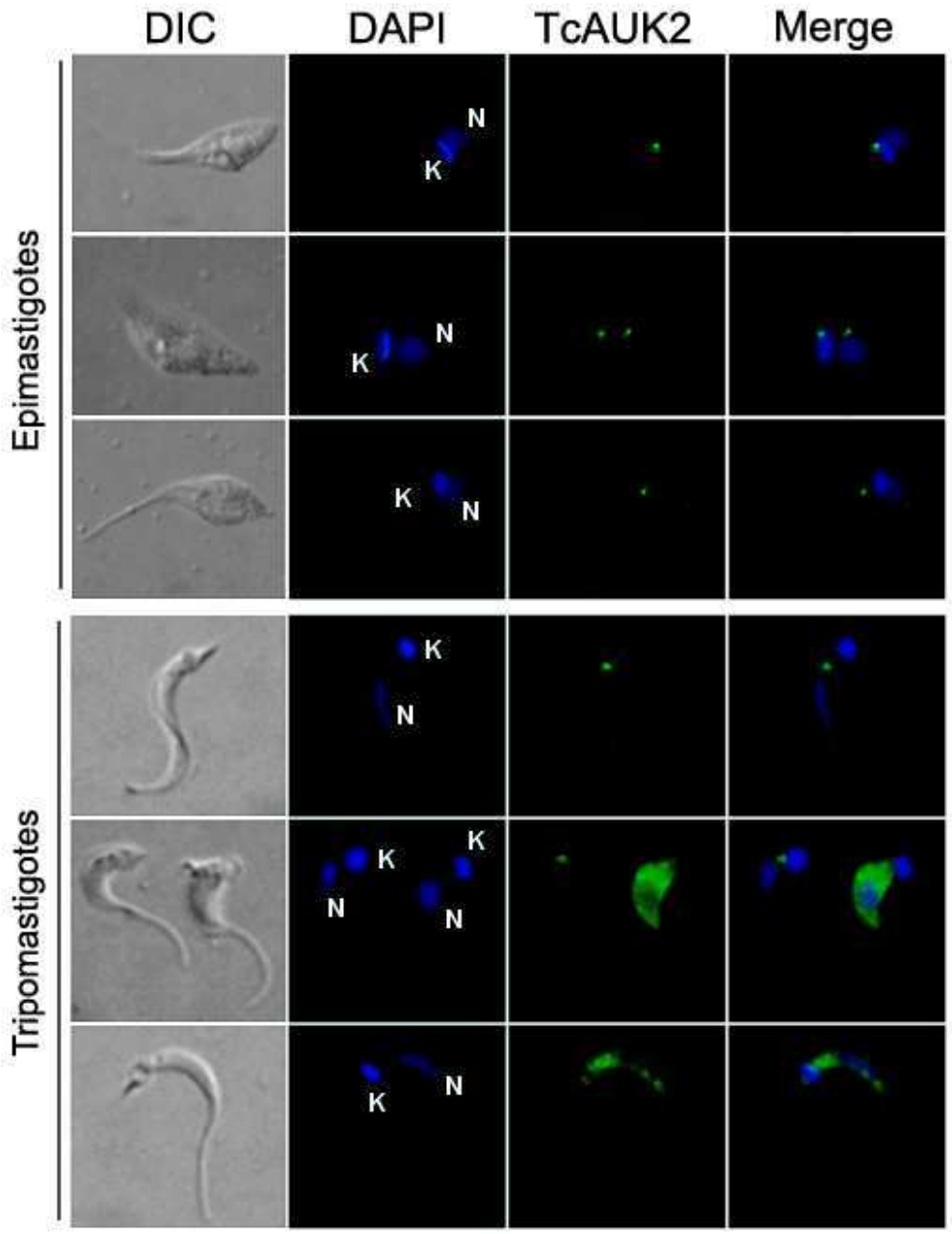


Figura 23. Localización subcelular de TcAUK2 en las formas epimastigote y tripomastigote. Inmunofluorescencia con anticuerpo primario anti TcAUK2 en epimastigotes y tripomastigotes. El núcleo (N) y el kinetoplasto (K) se marcaron con DAPI.

Amastigotes de sobrenadante de cultivo de células VERO infectadas (amastigotes extracelulares) fueron colectados para analizar la localización de TcAUK2 mediante inmunofluorescencia (Figura 24 A). Para estudiar la localización de TcAUK2 en amastigotes intracelulares, células VERO de día cinco post-infección fueron utilizadas en ensayo de inmunofluorescencia (Figura 25 B). La distinción entre amastigotes intracelulares y extracelulares en principio sólo refleja la fuente de la cual se obtuvieron las células, por lo que la señal de localización de TcAUK2 se espera que sea similar en ambos casos.

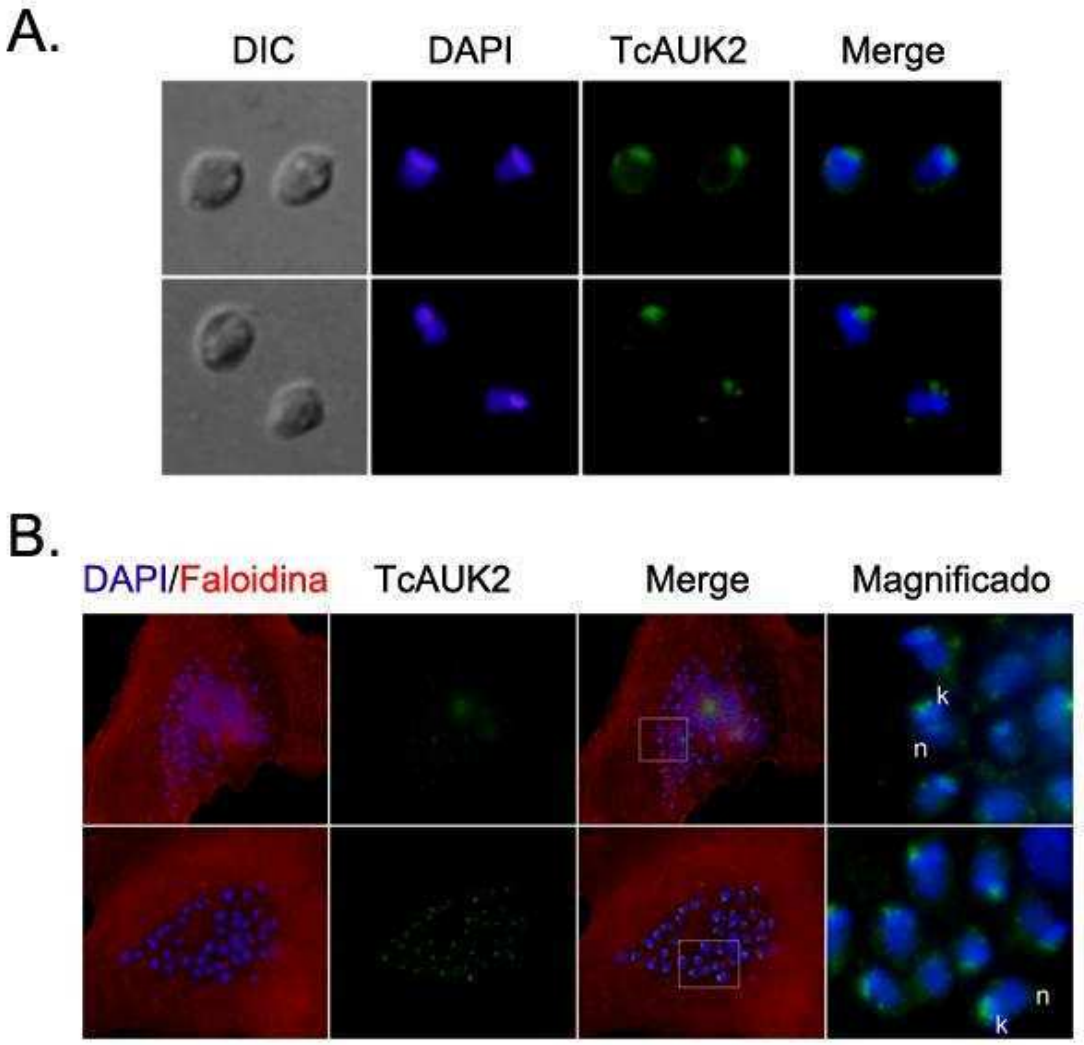


Figura 24. Localización subcelular de TcAUK2 en amastigotes. Inmunofluorescencia contra TcAUK2 en: **A.** Amastigotes aislados de sobrenadante de cultivo de células VERO infectadas, y **B.** en amastigotes intracelulares. Los filamentos de actina de las células VERO fueron marcados con Faloidina-Rodamina. Con DAPI se marcaron los núcleos (n) y los kinetoplastos (k) de los amastigotes.

El patrón de distribución de TcAUK2 en amastigotes es muy similar a lo observado en la forma epimastigote. La proteína se ubica principalmente en la región anterior al kinetoplasto, y algunas células muestran además una localización de TcAUK2 entre el núcleo y el kinetoplasto (Figura 24 A). Por consiguiente se puede determinar que TcAUK2 conserva la misma localización entre las formas epimastigote y amastigote.

Durante el proceso de diferenciación de *T. cruzi* existe un reacomodamiento de ciertas estructuras y organelas, siendo lo más destacado el cambio de la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto. Debido a este cambio de orden, las estructuras que en epimastigotes y amastigotes se detectan en la región anterior al kinetoplasto, en tripomastigotes se encuentran entre el kinetoplasto y el núcleo. Morfológicamente esta región corresponde a la base del flagelo, conformada por el bolsillo flagelar con sus estructuras citoesqueléticas (FAZ, cuerpo basal y pre cuerpo basal, nacimiento del axonema del flagelo, TAC) y organelas (complejo de Golgi, retículo endoplásmico, citostoma, complejo de la vacuola contráctil) relacionadas. Esta misma variación de ubicación relativa, entre las formas replicativas y la forma infectiva del parásito, muestra la proteína TcAUK2. Por consiguiente, surge la posibilidad de que TcAUK2 se encuentre asociada a alguna de las estructuras citoesqueléticas o bien a alguna de las organelas asociadas al bolsillo flagelar. Si bien la inmunolocalización de TcAUK2 muestra a la proteína en una región similar a la observada con la proteína de fusión TcAUK2-GFP, es posible apreciar que la proteína nativa se ubica un poco más alejada del kinetoplasto que la proteína de fusión. Para determinar si esta leve variación en la ubicación de TcAUK2 es acompañada por un cambio en la ubicación del cuerpo basal, epimastigotes WT fueron doblemente marcados por inmunofluorescencia con anticuerpo anti TcAUK2 e YL1-2 (Figura 25). En este ensayo se introdujo una variante respecto a todas las inmunofluorescencias realizadas hasta el momento, y fue la fijación de las células con metanol frío en lugar de fijarlas con PFA 4%. El metanol en este caso actúa al mismo tiempo como agente fijador y permeabilizador, esto último se debe a que como solvente orgánico solubiliza todas las estructuras membranosas de la célula. De esta forma, las estructuras citoesqueléticas quedan más expuestas que en el caso de células permeabilizadas con detergente (como se venía realizando hasta ahora con Triton X-100). Al observar las células fijadas con metanol y doblemente marcadas se puede detectar que TcAUK2 no muestra la misma localización que el cuerpo basal. Por otro lado, en estas células fijadas con metanol se observa señal para TcAUK2 en la región posterior de la célula, una localización para esta proteína que no fue detectada cuando las células fueron fijadas en PFA y permeabilizadas con Triton X-100. De este modo TcAUK2 muestra dos localizaciones puntuales diferentes, una en cada extremo de la célula. En la región anterior localiza cercano a la base del flagelo muy cerca del cuerpo basal, mientras que en su localización posterior no pudo ser confirmado si se asocia a alguna estructura u organela determinada. Para determinar si TcAUK2 se encuentra asociada a la estructura del esqueleto del parásito, se realizó un ensayo de

inmunofluorescencia sobre extracciones citoesqueléticas de epimastigotes. La naturaleza interconectada del citoesqueleto de los tripanosomátidos permite que éste sea purificado por medio de una simple extracción con detergente [193]. Luego de este procedimiento lo que se obtiene es la fracción de microtúbulos del citoesqueleto, conservando su forma y estructura original. La utilidad de esta técnica reside en que a través de ella se aísla la fracción de citoesqueleto y proteínas asociadas de todo el resto del material citoplasmático. Por consiguiente, si TcAUK2 se encuentra asociada a las estructuras citoesqueléticas de la región del bolsillo flagelar, en el ensayo de inmunofluorescencia sobre células extraídas la proteína debería ser detectada. Siguiendo este razonamiento, preparaciones citoesqueléticas de epimastigotes WT fueron incubadas con el anticuerpo anti TcAUK2 y el anticuerpo monoclonal L13D6, que marca flagelo. Al analizar las preparaciones por microscopía de fluorescencia se observó claramente el flagelo de cada célula mientras que no se detectó ninguna señal correspondiente a TcAUK2 (datos no mostrados). Este resultado sugiere que TcAUK2 no interacciona fuertemente con las estructuras citoesqueléticas que conforman el bolsillo flagelar de la célula, incluyendo dentro de estas al cuerpo basal.

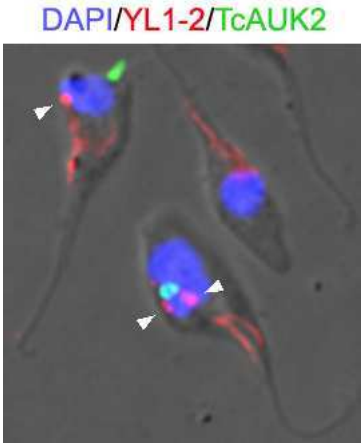


Figura 25. Análisis de la asociación de TcAUK2 y cuerpo basal. Epimastigotes WT fijados en metanol frío fueron doblemente marcados para TcAUK2 y cuerpo basal (flechas blancas) con el anticuerpo YL1-2.

5.3. Localización subcelular de TcAUK3

Por ensayo de Western blot no se detectó la expresión de la fusión TcAUK3-GFP en epimastigotes transfectados con la construcción pTEX-TcAUK3-GFP (Figura 11). Al observar estas células por microscopía de fluorescencia tampoco se detectó señal correspondiente a GFP. Por consiguiente, la expresión heteróloga de TcAUK3 fusionada a GFP como estrategia para estudiar la localización de esta Aurora quinasa no arrojó resultados positivos. Sin embrago, no se descarta que la falta de expresión de la proteína de fusión puede haber sido consecuencia de una estricta regulación negativa para contrarrestar la sobreexpresión de TcAUK3.

Por inmunomarcado con anticuerpo específico contra TcAUK3 en epimastigotes WT se detectó una señal específica en la región anterior de la célula, una ubicación similar a la observada para TcAUK2. Al igual que en las otras TcAUKs, la señal de TcAUK3 es bien puntual y definida. Otra observación es que entre los distintos epimastigotes de un cultivo asincrónico la ubicación de la proteína relativa al kinetoplasto varía. En algunas células la señal se localiza inmediatamente anterior al kinetoplasto (Figura 26 A y B), mientras que en otras la localización sigue siendo anterior al kinetoplasto pero más alejada de éste y próxima al extremo anterior de la célula (Figura 26 C). En todas las células se observa que la marcación muestra una forma de anillo con una región central sin señal (Figura 26 A), que vista de perfil aparece como una marca levemente ahusada (Figura 26 B y C).

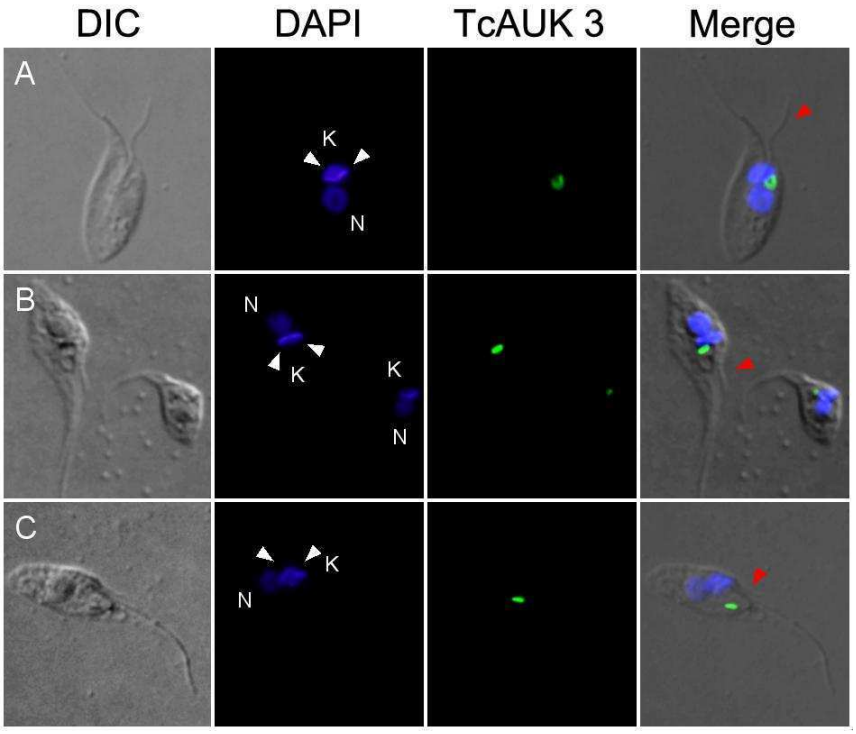


Figura 26. Localización subcelular de TcAUK3 en epimastigotes WT. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti TcAUK3 en epimastigotes CL Brener. El núcleo (N) y el kinetoplasto (K) fueron marcados con DAPI, se identifican las células en fase G2 del ciclo celular (2F1N1N), con kinetoplasto en división (flechas blancas) y presencia de un viejo y un nuevo flagelo (flechas rojas).

Para estudiar la localización de TcAUK3 en las otras formas del parásito, tripomastigotes y amastigotes fueron tomados de sobrenadante de cultivo de células VERO infectadas. La inmunolocalización de TcAUK3 en estas células mostró una señal difusa esparcida por todo el espacio citoplasmático. En amastigotes se detecta una señal más intensa en la región circundante al kinetoplasto (Figura 27 A I), e incluso una minoría muestra señal sólo en esta región (Figura 27 A II, flecha blanca). Mientras que en tripomastigotes, si bien la señal se observa dispersa por todo el

citoplasma, la región anterior de la célula muestra mayor concentración de la señal (Figura 27 A II y III). Al realizar la inmunofluorescencia en amastigotes intracelulares se observa que no todos los parásitos muestran señal, sugiriendo que en estos no hay expresión de TcAUK3. En los parásitos donde sí se detecta señal, la proteína muestra una localización puntual confinada en las proximidades del kinetoplasto (Figura 27 B).

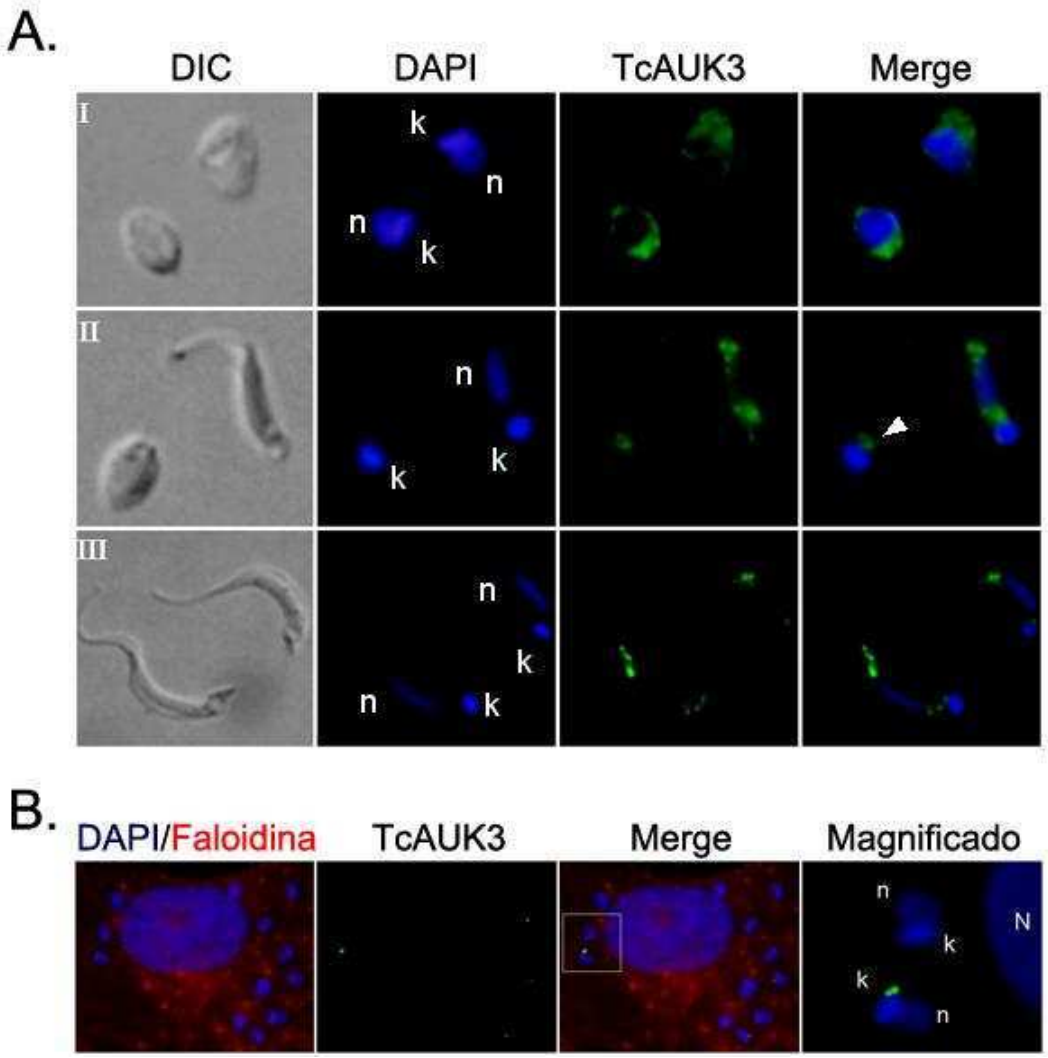


Figura 27. Localización subcelular de TcAUK3 en las formas amastigote y tripomastigote. A. Inmunofluorescencia contra TcAUK3 en amastigotes y tripomastigotes obtenidos de sobrenadante de cultivo. B. Inmunofluorescencia contra TcAUK3 en amastigotes intracelulares. En **A.**I se observan dos amastigotes, en **A.**II un tripomastigote y un amastigote y en **A.**III dos tripomastigotes. Con DAPI se marcaron los núcleos (n) y kinetoplastos (k) de parásitos, y el núcleo de la célula VERO (N). En B. se marcó el límite de las células VERO con Faloidina-Rodamina.

La proteína TcAUK3 muestra la misma localización celular puntual tanto en la forma epimastigote como amastigote. Mientras que en la forma tripomastigote su localización es más difusa con

regiones de mayor concentración, en las células donde su localización es puntual se puede apreciar que la proteína se ubica en la región anterior.

Considerando que en epimastigotes TcAUK3 se localiza en la región del bolsillo flagelar, para determinar la asociación de esta proteína a estructuras citoesqueléticas de esta región se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo específico anti TcAUK3 en extracciones de citoesqueleto de células epimastigotes. En este caso se obtuvo marca positiva para TcAUK3, y la señal se aprecia como un punto ubicado lateral al nacimiento del flagelo. De esta forma se puede concluir que TcAUK3 se encuentra fuertemente asociada a la estructura citoesquelética del bolsillo flagelar en la forma epimastigote de *T. cruzi*.

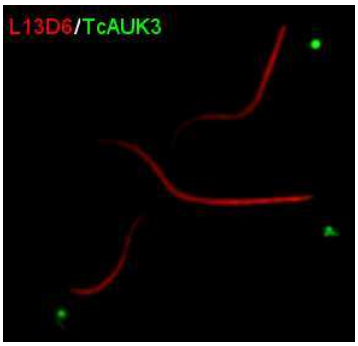


Figura 28. Estudio de la asociación de TcAUK3 al citoesqueleto de epimastigotes. El citoesqueleto de células epimastigotes fue extraído, y sobre este se realizó una inmunofluorescencia contra TcAUK3. Como control positivo se marcó el flagelo celular con el anticuerpo L13D6.

6. Estudio del fenotipo de sobreexpresión de las proteínas TcAUKs

Como herramienta para profundizar el estudio funcional de las proteínas TcAUKs, fueron generados epimastigotes de la cepa CL Brener con sobreexpresión de cada una de estas enzimas. Para lograr esto, cada uno de los genes TcAUKs fueron clonados en el vector de sobreexpresión pTREX y con esta construcción fueron transfectados los epimastigotes. Luego de dos semanas de selección con neomicina, a partir del cultivo original de transfectantes se obtuvieron cultivos clonales mediante la técnica de diluciones mínimas. Las construcciones con pTREX han mostrado variaciones en los niveles de expresión de un mismo transgen en distintos eventos de transfección, así como también se ha detectado heterogeneidad de expresión en una misma población. Es por esto que se consideró fundamental trabajar con poblaciones clonales y así independizarse de variaciones que no se correspondan exclusivamente a mecanismo regulatorios propios de la célula.

6.1. Análisis funcional TcAUK1

Luego de transfectar epimastigotes con la construcción pTREX-TcAUK1, la inserción de la copia extra de TcAUK1 en el genoma de los parásitos fue corroborada por un ensayo de Southern blot. La copia inserta del gen TcAUK1 en el genoma es detectada en el Southern blot como una banda extra en el ADN de los epimastigotes pTREX-TcAUK1 respecto al de los WT (Figura 29 A).

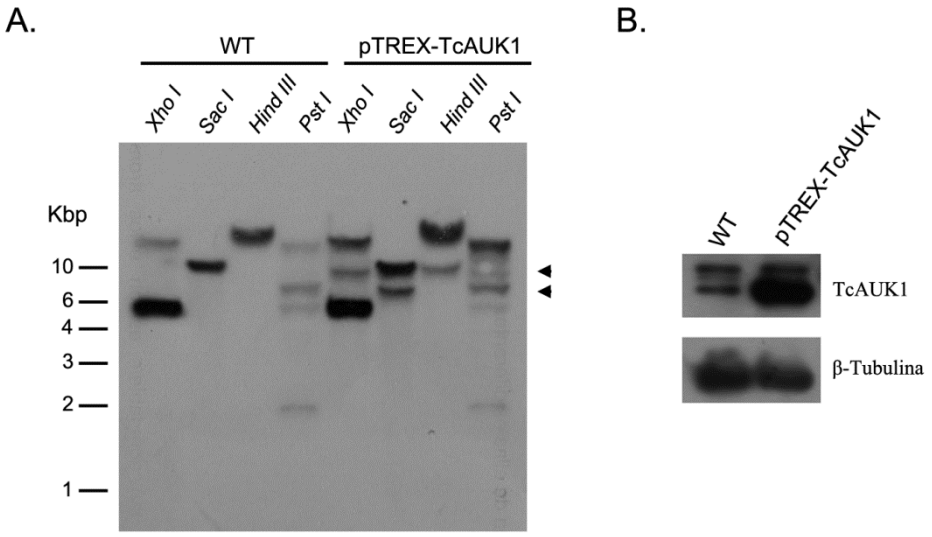


Figura 29. Epimastigotes CL Brener pTREX-TcAUK1. A. Southern blot donde se detecta la copia extra del gen en epimastigotes pTREX-TcAUK1. Se utilizó como sonda la extensión completa del gen TcAUK1. **B.** Western blot sobre extracto crudo de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK1 (50 µg) con anticuerpos anti-TcAUK1 o anti-β-tubulina (control de carga).

Una vez confirmada la presencia de la copia extra del gen TcAUK1 en el genoma, se procedió al clonado del cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK1, obteniéndose un total de 11 clones. El perfil de expresión de TcAUK1 en cada uno de estos clones se determinó por Western blot. Todos los clones aislados mostraron mayores niveles de expresión de TcAUK1 que los epimastigotes WT,

mientras que entre los distintos clones los niveles de expresión no mostraron diferencias perceptibles. En la Figura 29 B se muestra el ensayo de Western blot contra TcAUK1 en epimastigotes WT y epimastigotes pTREX-TcAUK1 del clon elegido para realizar todos los análisis ulteriores.

6.1.1. Comportamiento del cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK1

Para comenzar a analizar el fenotipo de los epimastigotes transgénicos todos los clones fueron marcados en su ADN con DAPI y observados en el microscopio de epifluorescencia. El primer rasgo sobresaliente que se detectó en estos parásitos fue una configuración de la cromatina muy irregular, con aspecto de estar altamente condensada (Figura 30). Este grado de condensación cromatínica no se produce en epimastigotes WT y es similar al estado de cromosomas individuales distinguibles durante la prometafase mitótica en células de mamíferos (Figura 30 recuadro).

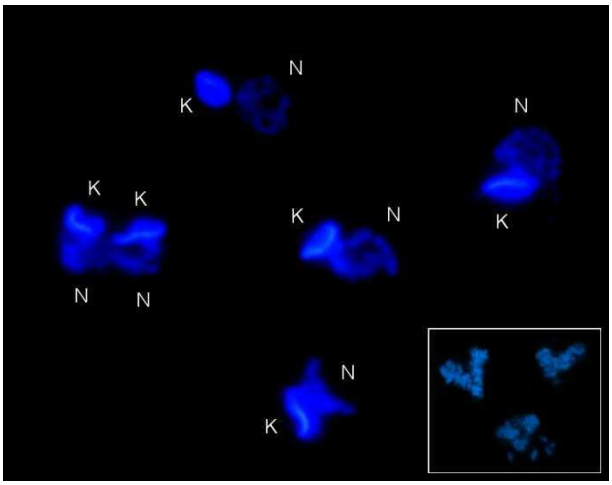


Figura 30. Configuración de la cromatina en epimastigotes pTREX-TcAUK1. El ADN de epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK1 fue marcado con DAPI y observado en el microscopio de epifluorescencia. Se identifican el núcleo (N) y el kinetoplasto (K) de cada célula. En el recuadro inferior derecho se muestran núcleos teñidos con DAPI de células HeLa en mitosis.

La diferencia entre los distintos clones comenzó a observarse en el aspecto de la cromatina, donde algunos mostraban un estado de condensación mucho más extremo que otros. Esta diferencia entre los clones fue la base para la elección del clon de trabajo. Paralelamente, se determinó el porcentaje de células que mostraban señal para TcAUK1 mediante inmunofluorescencia. Aquí surgió otro rasgo distintivo entre los distintos clones y fue la cantidad de células que mostraban señal positiva para TcAUK1. Aquellos clones donde el fenotipo era más marcado eran los que poseían mayor cantidad de células con señal para TcAUK1, e incluso la intensidad de la señal por célula era más fuerte. Este rasgo fue el elegido para seleccionar al clon de trabajo a partir del cual se realizaron los análisis subsecuentes, pTREX-TcAUK1 clon C4 (porcentaje de células con señal para TcAUK1 superior al 80%).

Un primer rasgo que se estudió fue el comportamiento del cultivo en relación a su tasa de crecimiento. Para esto se iniciaron cultivos de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK1 a igual densidad de parásitos ($1x10^6$ células ml^{-1}), se tomaron muestras cada 24 hs, y de cada muestra se contó el número de células por mililitro de cultivo. El cultivo de epimastigotes WT duplica aproximadamente el número de parásitos cada 24 hs, mientras que en epimastigotes pTREX-TcAUK1 el tiempo de duplicación es sensiblemente más lento. Esto se ve reflejado un una curva de crecimiento de epimastigotes pTREX-TcAUK1 con una pendiente menos pronunciada que la de células WT (Figura 31 A). Al día 6, el cultivo WT duplica en concentración de parásitos al cultivo pTREX-TcAUK1 ($9,2x10^7$ células ml^{-1} vs. $5x10^7$ células ml^{-1}). Al observar este retraso en el crecimiento del cultivo de epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK1, se quiso saber si la causa de esto correspondía a una alteración en el ciclo celular consecuencia de la sobreexpresión. Para aclarar este punto, células WT y células sobreexpresantes fueron arrestadas con hidroxiurea para sincronizarlas en el ciclo celular. Una vez desarrestadas, se tomaron muestras de las células a distintos tiempos, se marcó el ADN con ioduro de propidio (IP) y se analizaron las distintas muestras por citometría de flujo para determinar el contenido de ADN de cada célula. Al analizar la progresión del ciclo a través del perfil de las curvas de IP (Figura 31 B), se observa que las células pTREX-TcAUK1 progresan en forma paralela con las WT hasta llegar a las fases G2/M (4C). En el transcurso de estas fases es donde las células sobreexpresantes muestran un retraso respecto a las WT. Este fenómeno se observa claramente a las 13 horas post desarresto cuando las células WT muestran la reversión de los picos G1 (2C) y G2/M (4C), mientras que en las células sobreexpresantes todavía predomina el pico G2/M (4C). Este retraso de las células sobreexpresantes en su transcurso por las fases G2/M es corto en el tiempo, ya que a las 15 hs el perfil de la curva de IP en estas células es muy similar al de las células WT.

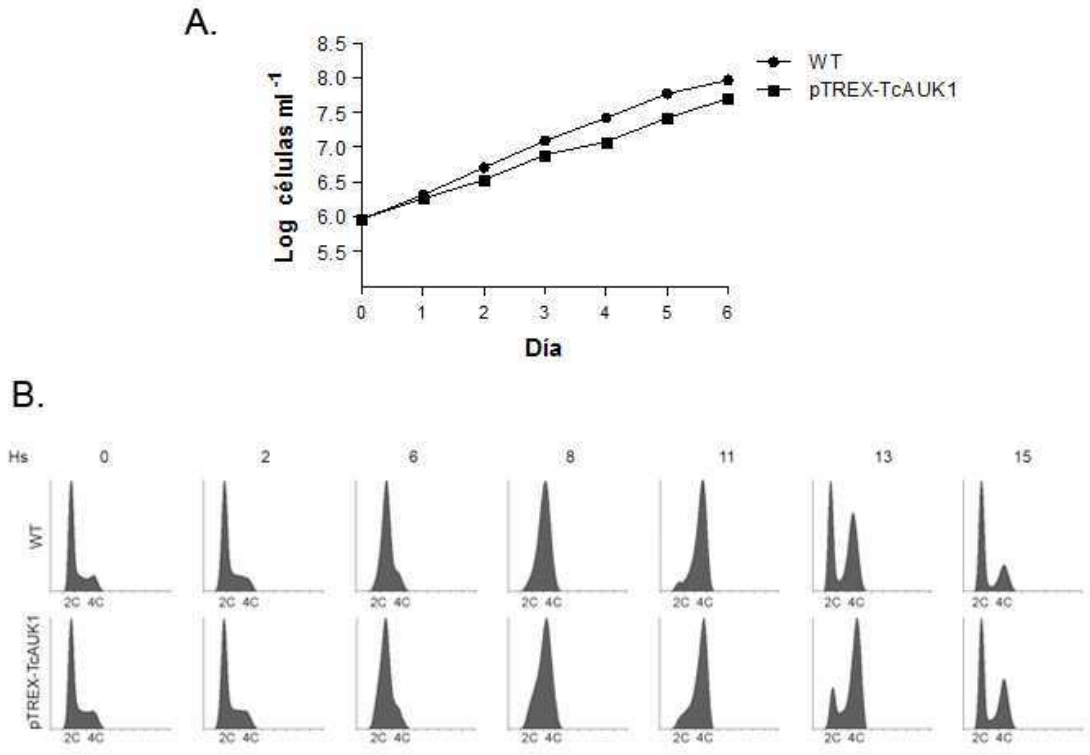


Figura 31. Curva de crecimiento y progresión del ciclo celular en epimastigotes pTREX-TcAUK1. A. Cultivos de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK1 (n=3) fueron cuantificados para número de células por ml cada 24 hs. Por cada punto se graficó el promedio de los tres cultivos con el error estándar. **B.** Por citometría de flujo de células sincronizadas y cuyo ADN fue marcado con IP, se determinó la fase del ciclo celular de muestras de parásitos tomadas a distintos tiempos post desarresto. El pico en 2C representa células en la fase G1 (0 a 4 hs), el pico en 4C corresponde a células en fase G2/M (11 a 15 hs) y el pico intermedio a 2C y 4C representa a células en fase S (6 y 8 hs).

A partir de estos últimos resultados se decidió profundizar el análisis del comportamiento de las células sobreexpresantes durante las fases G2 y M del ciclo celular. Durante la fase G2 los epimastigotes duplican todas sus organelas, que luego van a ser separadas para formar dos células hijas durante la citoquinesis. Como se detallo con anterioridad, el flagelo es la primera estructura en duplicarse, seguido por el kinetoplasto y, en último término, el núcleo celular. Las dos primeras organelas se duplican durante la fase G2, mientras que la división del núcleo es lo que define a la fase M del ciclo. Para analizar la progresión de las células se tomaron muestras cada treinta minutos de células (WT y pTREX-TcAUK1) sincronizadas, durante el período que abarca las fases G2 y M (de 11 a 14 horas post desarresto). De cada punto se tomaron muestras para analizar la progresión del ciclo celular por citometría de flujo, y a la vez se tomaron muestras para observar las células por microscopía. Para esto último, se marcó el ADN con DAPI y los microtúbulos por inmunofluorescencia con anticuerpo KMX-1 (monoclonal anti β-tubulina con buena marca del huso mitótico). En el análisis de la progresión del ciclo celular por citometría de flujo se puede apreciar el retraso que muestran las células sobreexpresantes respecto a las WT (Figura 32 A). Incluso se

puede estimar el tiempo de retraso en aproximadamente una hora, ya que la curva de las células sobreexpresantes a las 13 hs muestra el mismo perfil que la curva de las 12 hs de las células WT. Con el objeto de detectar el proceso celular que podría estar afectado por la sobreexpresión de TcAUK1, células correspondientes a los distintos tiempos post desarresto fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. Ante los pocos antecedentes bibliográficos sobre la división celular en *T. cruzi*, primero se analizaron las muestras correspondientes a los epimastigotes WT para tratar de establecer la dinámica conjunta de la duplicación del flagelo, el kinetoplasto y el núcleo. En la Figura 32 B puede observarse (inmunofluorescencia y esquema) la secuencia de eventos relacionados a la duplicación de estas organelas, y que transcurren durante las fases G2/M. En células cuyo contenido de ADN fue duplicado comienza a formarse el nuevo flagelo. A medida que crece, el flagelo recorre la longitud del bolsillo flagelar hasta protruir en la superficie celular previo a que el kinetoplasto comience a dividirse (Figura 32 B I). Al comienzo de su división el kinetoplasto aumenta su curvatura hasta adquirir el aspecto de una letra “v”, con su cara cóncava hacia el extremo anterior del parásito (Figura 32 B II). Una vez que el kinetoplasto concluye la división, los kinetoplastos hijos adoptan una disposición antero-posterior. Mientras esto transcurre, en el núcleo celular se observa un aumento en la concentración de β-tubulina (Figura 32 B III). En este punto el flagelo nuevo alcanza aproximadamente la tercera parte de la longitud del flagelo viejo. Una vez que el nuevo flagelo sobrepasa el tercio de longitud del flagelo viejo, ambos kinetoplastos adoptan una disposición lateral y en el núcleo comienza a ensamblarse el huso mitótico (Figura 32 B IV). La formación del huso corresponde al inicio de la división nuclear, y fase M propiamente dicha. Durante esta fase el huso se elonga mientras el núcleo se divide hasta formar dos núcleos hijos (Figura 32 B V y VI). Hacia el final de la división se observa como se van separando los conjuntos núcleo/kinetoplasto, hasta que los kinetoplastos adquieren una posición interna respecto a los núcleos y la célula comienza a dividirse en su eje longitudinal desde su extremo anterior (Figura 32 B VII y VIII).

En base a la descripción anterior se pueden identificar rasgos celulares que pueden ser utilizados como puntos de referencia para medir el tiempo que tardan en duplicarse el flagelo, el kinetoplasto y el núcleo. El primer punto de referencia es la longitud del nuevo flagelo en células 2F1N1K. Mientras el nuevo flagelo crece hasta la tercera parte de la longitud del viejo flagelo, el kinetoplasto se divide por completo hasta quedar ambos kinetoplastos en una disposición antero-posterior (Figura 32 B III esquema). El otro punto de referencia es la disposición de los kinetoplastos hijos en células 2F1N2K. El momento en que los kinetoplastos hijos pasan de una disposición antero-posterior a una lateral, es a la vez el inicio del ensamblado del huso mitótico (estructura poligonal). Por lo que en células 2F1N2K donde es posible distinguir el huso mitótico ensamblado, los kinetoplastos hijos se encuentran uno al lado del otro (Figura 32 B IV esquema). Asimismo, la

disposición lateral de ambos kinetoplastos hijos concuerda con el momento en que el flagelo nuevo sobrepasa en su crecimiento el tercio de longitud del flagelo viejo.

En primer término, por microscopía de fluorescencia se contaron número de flagelos, núcleos y kinetoplastos por célula en cada una de las muestras (n>200). El razonamiento es que si el retraso en el ciclo por la sobreexpresión de TcAUK1 se debe a un aumento en el tiempo de duplicación de algunas de estas estructuras, entonces esto se vería reflejado en un cambio de la proporción de determinada subpoblación de células respecto a los parásitos WT. El tomar muestras cada media hora permite determinar una especie de cinética en cuanto a los cambios de la proporción de las distintas subpoblaciones a lo largo del tiempo (Figura 32 C). En este punto es importante aclarar que a los tiempos iniciales la mayor parte de las células 1F1N1K corresponden a células en fase G2 del ciclo celular, el aumento de la proporción de esta subpoblación a medida que transcurre el ciclo es por el aumento de células que ya se dividieron e ingresan a la fase G1. A las 11 hs en células WT la mayor proporción corresponde a células 2F1N1K (43,4%) seguida en orden decreciente por células 1F1N1K (29,7%), 2F1N2K (16%) y 2F2N2K (10,8%). A las 11,5 hs el porcentaje de células 2F1N1K disminuye considerablemente (28%), mientras que el de células 1N1F1K aumenta también de forma significativa (47,7%). A partir de este tiempo el porcentaje de células 1F1N1K aumenta y el de células 2F1N1K disminuye progresivamente. Los porcentajes de células 2F1N2K y 2F2N2K disminuyen levemente entre las 11 y las 12 hs, pero a partir de aquí disminuyen abruptamente hasta que a las 13 hs alcanzan la tercera parte del porcentaje inicial. A las 11 hs las células sobreexpresantes muestran el mismo orden de proporciones que las células WT, pero con el dato relevante de que a este tiempo no se encontró ningún epimastigotes 2F2N2K (38,7% 1N1F1K, 46,8% 2F1N1K y 14,5% 2F1N2K). A diferencia de lo que sucede en células WT, el porcentaje de células 2F1N1K se mantiene por encima de todo el resto hasta las 12,5 hs, momento en el cual los porcentajes de células 2F1N1K y 1F1N1K son casi idénticos (36,2% y 37,6%, respectivamente). A partir de aquí el porcentaje de células 1N1F1K comienza a aumentar mientras que el número de parásitos 2F1N1K disminuye, para ambas subpoblaciones llegar a las 14 hs a proporciones similares a las que se observan a las 13 hs en parásitos WT. Con la salvedad de que a las 11 hs no se observaron células 2F2N2K, a partir de las 11,5 hs las proporciones de epimastigotes 2F1N2K y 2F2N2K muestran valores similares a los observados para células WT. La proporción mayoritaria de células 2F1N1K sostenida en el tiempo que se observa en epimastigotes pTREX-TcAUK1 parece ser la causa del retraso en el ciclo celular que muestran estos parásitos. A su vez, esto sugiere que lo que se ve afectado por la sobreexpresión de TcAUK1 es el tiempo de división del kinetoplasto. Para confirmar esta presunción se analizaron los siguientes parámetros celulares: longitud del nuevo flagelo, duplicación y segregación del kinetoplasto y presencia del huso mitótico. En base al análisis hecho en células WT, y como se explicó anteriormente, la longitud del flagelo y la presencia del huso mitótico pueden ser establecidos como puntos de

referencia para poder de alguna forma estimar el tiempo de duplicación del kinetoplasto. Teniendo en cuenta esto, a las células 2F1N1K se las clasificó en cuatro grupos en base a dos parámetros: longitud del flagelo, células con el nuevo flagelo menor o próximo al tercio de la longitud del viejo flagelo (flagelo corto vs flagelo largo); y duplicación del kinetoplasto, células con el kinetoplasto con o sin morfología de proceso de división (K sin dividir vs K en división) tal cual se describió anteriormente (Figura 32 B I y II). Por otra parte, a las células 2F1N2K también se las clasificó en cuatro grupos en base a dos parámetros: disposición de los kinetoplastos hijos, células con los kinetoplastos en disposición antero-posterior o disposición lateral (K posterior vs K lateral); ensamblaje del huso mitótico, células con o sin huso mitótico (ausencia de huso mitótico vs presencia de huso mitótico). Los resultados de estas mediciones se resumen en la Figura 32 C. Al realizar un análisis cruzado de los parámetros medidos para células 2F1N1K WT, vemos que para cada tiempo el porcentaje de células con flagelo corto es muy similar al de células con el kinetoplasto sin dividir y lo mismo sucede entre la proporción de células con el flagelo largo y la de células con kinetoplasto en división. El análisis realizado sobre los epimastigotes pTREX-TcAUK1 muestra un aumento en la proporción de células con flagelo largo por un lado, y la disminución de la proporción de células con kinetoplasto en división por otro. Esto se interpreta como que células cuyo largo del flagelo en condiciones normales se correspondería con el de un kinetoplasto en división, en células que sobreexpresan TcAUK1 corresponde a células que todavía el kinetoplasto no comenzó a dividirse. Esto se puede observar en la Figura 32 D IV, donde se muestra imágenes de epimastigotes pTREX-TcAUK1 con el flagelo nuevo de una longitud mayor a la tercera parte del viejo flagelo y el kinetoplasto sin la morfología típica de la división. Al realizar el análisis de las células 2F1N2K, se ve que en las WT para cada tiempo el porcentaje de células con el kinetoplasto posterior es muy similar al de células que no muestran huso mitótico, a la vez que la proporción de células con kinetoplasto lateral se corresponde a la de células con huso mitótico ya ensamblado. En epimastigotes pTREX-TcAUK1 se puede ver que la proporción de células que muestran el huso mitótico ensamblado es mucho mayor que el porcentaje de células con los kinetoplastos laterales. Lo que esto refleja es la presencia de células sobreexpresantes de TcAUK1 que muestran el huso mitótico ensamblado mientras que los kinetoplastos hijos poseen una disposición antero-posterior. Este tipo celular se muestra en la Figura 32 D III y IV, donde también se muestran células sobreexpresantes con el huso mitótico ensamblado y cuyo kinetoplasto recién se está dividiendo (Figura 32 D I y II). De todo este análisis realizado se puede concluir que el retraso en las fases G2/M que muestran los epimastigotes pTREX-TcAUK1 se debe a un aumento en el tiempo de duplicación del kinetoplasto. Tenend en centa que en Tripanosomátidos es el ciclo del kinetoplasto el que dirige la citoquinesis, es altamente probable que el retraso en la división del kinetoplasto se traslade a un retraso en el comienzo de la citoquinesis en las células sobreexpresantes de TcAUK1.

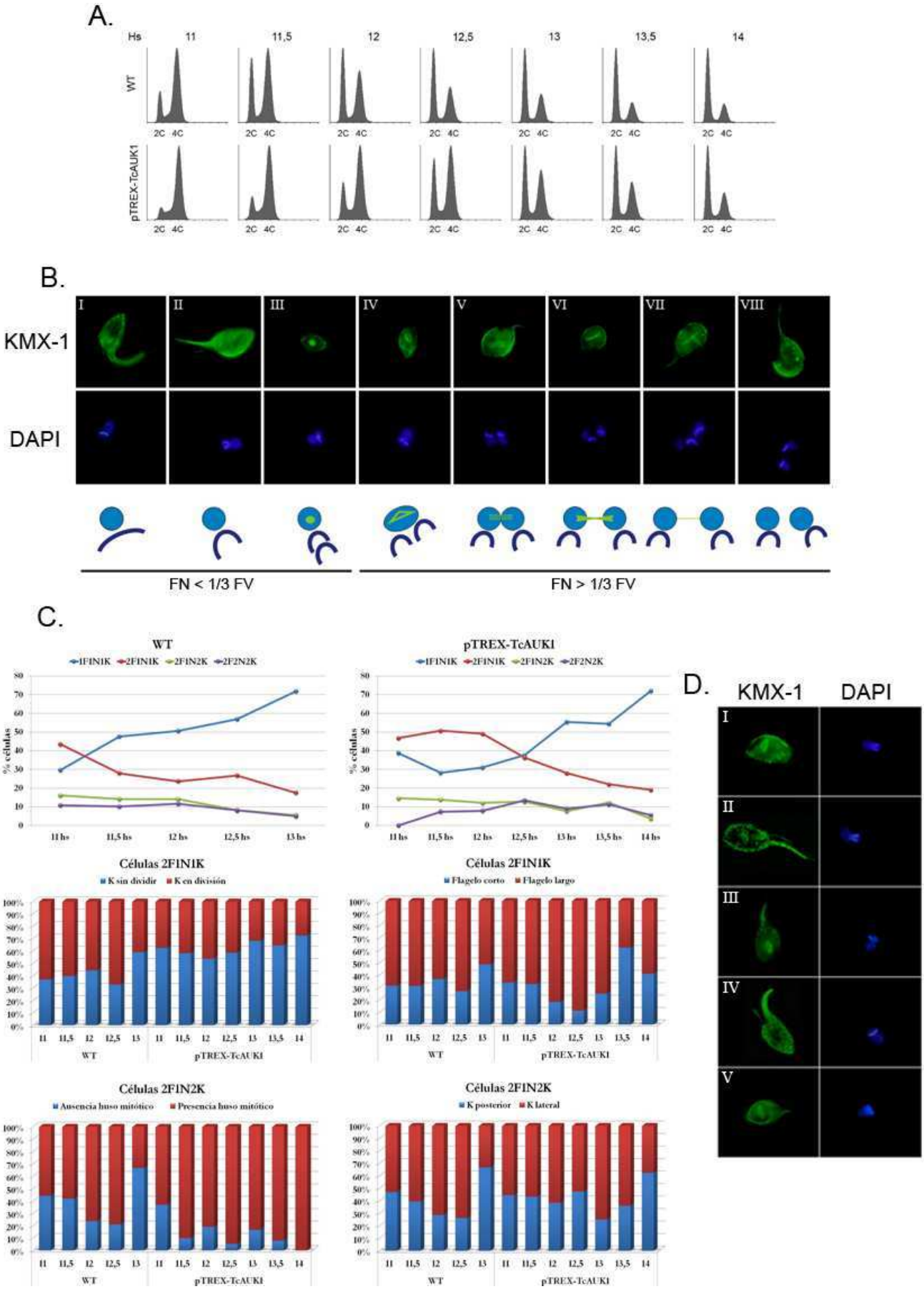

A.
Hs
11
11,5
12
12,5
13
13,5
14
WT
pTREX-TcAUK1
2C 4C
B.
KMX-1
DAPI
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
FN < 1/3 FV
FN > 1/3 FV
C.
WT
pTREX-TcAUK1
1F1N1K
2F1N1K
2F1N2K
2F2N2K
% células
11 hs
11,5 hs
12 hs
12,5 hs
13 hs
13,5 hs
14 hs
Células 2F1N1K
K sin dividir
K en división
Flagelo corto
Flagelo largo
Células 2F1N2K
Ausencia huso mitótico
Presencia huso mitótico
K posterior
K lateral
D.
KMX-1
DAPI

Figura 32. Análisis de la progresión de las fases G2/M en epimastigotes pTREX-TcAUK1. Epimastigotes WT y pTREX-TcAUK1 fueron sincronizados y durante el período de tiempo estimado en que las células transitan las fases G2/M (11 a 14 hs post-desarresto) se tomaron muestras cada 30 min. para analizar por citometría de flujo e inmunofluorescencia. **A.** Curva de IP para las distintas muestras, el pico 4C representa a células en G2/M y el pico 2C representa a células en G1. **B.** Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti β-tubulina (KMX-1) para marcar el huso mitótico en células WT tomadas a los mismos tiempos que para la citometría, el núcleo y el kinetoplasto se marcaron con DAPI. El esquema inferior representa la secuencia y dinámica de la división del kinetoplasto y del núcleo, junto a la morfología que adopta el huso mitótico, en las imágenes de inmunofluorescencia correspondientes. En las imágenes I a III el flagelo nuevo muestra una longitud inferior al tercio de lo que mide el flagelo viejo (FN < 1/3 FV), mientras que en las imágenes IV a VIII el flagelo nuevo sobrepasa el tercio de la longitud del flagelo viejo (FN > 1/3 FV). **C.** En el gráfico de líneas se representa la progresión en el porcentaje de células con las distintas conformaciones de flagelo, núcleo y kinetoplasto (1F1N1K, 2F1N1K, 2F1N2K, 2F2N2K) para las distintas muestras: 11 a 13 hs para células WT y 11 a 14 hs para células pTREX-TcAUK1. Los gráficos de barra corresponden a la comparación de valores relativos de distintas características medidas en las subpoblaciones de células 2F1N1K y 2F1N2K. Para las células 2F1N1K se compara % de células con kinetoplasto sin dividir vs % de células con kinetoplasto en división (gráfico superior izquierdo) y células con flagelo nuevo menor al tercio de la longitud del viejo flagelo vs células con el flagelo nuevo de mayor longitud que la tercera parte del flagelo viejo (gráfico superior derecho). Para células 2F1N2K se compara células con ausencia de huso mitótico vs células con presencia de huso mitótico (gráfico inferior izquierdo) y células con los kinetoplastos hijos en disposición antero-posterior vs células con los kinetoplastos hijos con disposición lateral (gráfico inferior derecho). En todas las cuantificaciones n > 200 **D.** Inmunofluorescencia con anticuerpo anti β-tubulina (KMX-1) para marcar el huso mitótico en células pTREX-TcAUK1 tomadas a los mismos tiempos que en la citometría. El núcleo y el kinetoplasto se marcaron con DAPI.

6.1.2. Localización subcelular de TcAUK1 en células sobreexpresantes

Toda enzima ejerce su función celular actuando sobre algún sustrato, el cual al ser modificado ve alterada su funcionalidad. La función natural de una enzima está determinada por la especificidad de sustrato, la cual posee un componente estructural para que ambas partes puedan interaccionar y otro componente espacial (localización) en donde ambas moléculas deben encontrarse en la misma región celular para poder interactuar. Como primer paso para encontrar la causa del fenotipo observado en las células sobreexpresantes de TcAUK1, se comenzó por determinar la localización celular de esta proteína en epimastigotes pTREX-TcAUK1. Cuando TcAUK1 es sobreexpresada muestra un patrón de localización distinto a cuando se expresa a niveles endógenos, siendo detectada dentro del núcleo en células interfásicas. En algunas células, aparte de la localización nuclear, TcAUK1 conserva la ubicación observada en epimastigotes WT en donde se la detecta alrededor del kinetoplasto. La distribución en el núcleo de TcAUK1 varía entre las distintas células, abarcando en unas todo el volumen nuclear mientras que en otras se observan regiones del núcleo sin señal para TcAUK1 (Figura 33 A). En células en división, cuando el huso

mitótico está formado y el núcleo ya se dividió, TcAUK1 adopta una distribución semejante a la arquitectura del huso mitótico, del mismo modo a lo observado en epimastigotes WT (Figura 33 panel B).

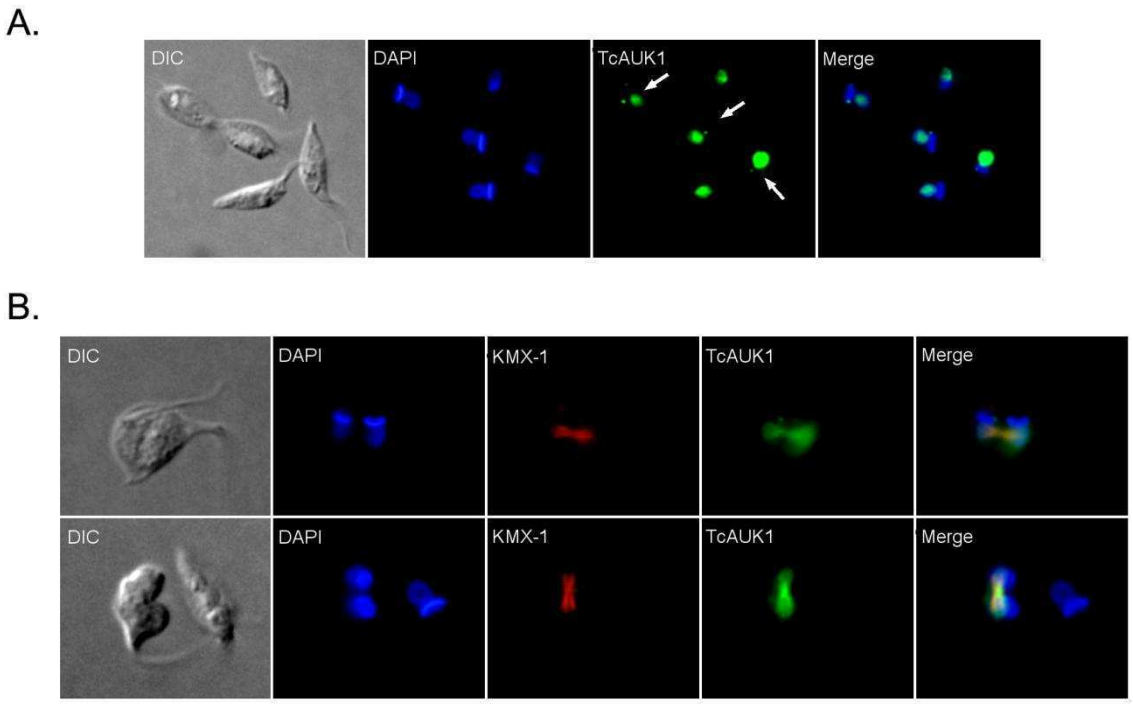


Figura 33. Localización de TcAUK1 en epimastigotes pTREX-TcAUK1. Por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti TcAUK1 se estudió la localización de esta proteína en epimastigotes sobreexpresantes. **A.** Epimastigotes interfásicos en donde se observa la localización nuclear de TcAUK1, con flechas se marcan aquellas células en la cual TcAUK1 conserva la localización vecina al kinetoplasto. **B.** Epimastigotes en división celular donde se marca el huso mitótico con anticuerpo anti β-tubulina (KMX-1). El núcleo y el kinetoplasto fueron marcados con DAPI.

La deslocalización de TcAUK1 en epimastigotes sobreexpresantes es en realidad una "deslocalización temporal", ya que TcAUK1 en niveles endógenos también localiza en el núcleo. Lo que sucede con la sobreexpresión es que esta localización sucede en una fase del ciclo celular en que a niveles endógenos no sucede. Con el fin de seguir la localización de TcAUK1 en epimastigotes pTREX-TcAUK1 a lo largo de todo el ciclo celular, células sincronizadas fueron marcadas para esta proteína y para β-tubulina por ensayo de inmunofluorescencia. Durante las todas las fases del ciclo, excepto para la mitosis tardía y al citoquinesis, TcAUK1 se localiza en el núcleo de todas las células. Por otra parte, en un porcentaje importante de células la marca de los puntos en los extremos del kinetoplasto no es detectada, sugiriendo que los altos niveles causados por la sobreexpresión provocan que la proteína pierda su localización en el kinetoplasto para pasar a ubicarse en el núcleo celular. Durante la mitosis TcAUK1 en células sobreexpresantes muestra el mismo comportamiento que en epimastigotes WT, donde se lo detecta en asociación con el huso

mitótico hasta que éste es desensamblado en las etapas finales de la mitosis (Figura 34). En este ensayo se detectó a TcAUK1 localizada en la hendidura de división de las dos células hijas durante la citoquinesis. Esta ubicación de la proteína no ha sido detectada en epimastigotes WT, posiblemente porque la escisión de las dos células hijas es un evento rápido que difícilmente pueda ser detectado.

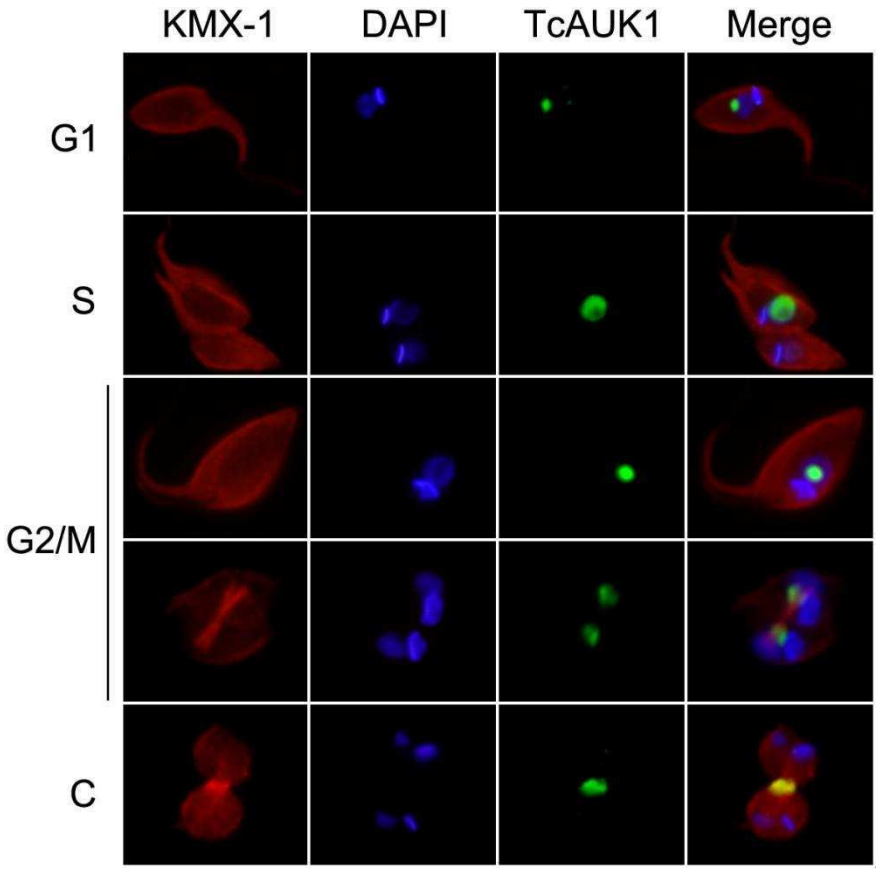


Figura 34. Localización de TcAUK1 a lo largo del ciclo celular en epimastigotes pTREX-TcAUK1. Epimastigotes sincronizados fueron doblemente marcados con anticuerpos contra β-tubulina (KMX-1) y contra TcAUK1, mientras que el ADN fue teñido con DAPI. En la figura se representan las distintas fases del ciclo celular G1, S, G2/M y citocinesis (C).

El comportamiento en cuanto a la localización subcelular que muestra TcAUK1 en parásitos sobreexpresantes muestra una fuerte relación con el fenotipo observado en estas células. La localización nuclear se corresponde con el fenotipo de la cromatina con mayor grado de compactación observado en estas células. Por otra parte, la ausencia de TcAUK1 en los extremos del kinetoplasto puede que esté relacionado con el retraso observado en el tiempo de división de esta organela que muestran las células sobreexpresantes respecto a las WT.

6.2. Análisis funcional TcAUK2

Para generar epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK2, el gen TcCLB.503685.10 fue clonado en el vector pTREX. A nivel genético, se confirmó la copia extra del gen en el genoma de los epimastigotes transfectados respecto a los WT (Figura 35 A). Habiendo obtenido así una población de células transgénicas se procedió al clonado del cultivo. De un total de 16 clones recuperados sólo uno pudo ser confirmado respecto a la sobreexpresión de TcAUK2 (clon D7). Este clon mostró por Western blot la presencia de una banda de PM aproximado a 45 kDa, que es el valor esperado para la proteína TcAUK2s (Figura 35 B). En células WT esta banda no es detectada, pero sí aparecen dos bandas de PM aproximado de 65 y 90 kDa. Estas dos bandas son similares en tamaño a las detectadas al estudiar el perfil de expresión de la TcAUK2 en las tres formas del parásito. Por consiguiente, la detección de una banda correspondiente al PM esperado para la proteína TcAUK2s en los epimastigotes transgénicos confirma que estas células sobreexpresan la enzima.

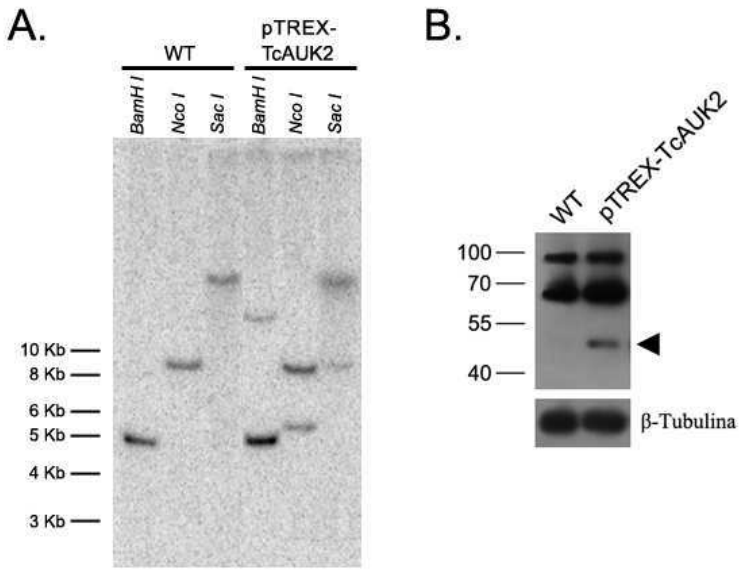


Figura 35. Epimastigotes CL Brener pTREX-TcAUK2s. A. Southern blot donde se detecta la copia extra del gen en epimastigotes pTREX-TcAUK2, utilizándose como sonda la extensión completa del gen TcAUK2. **B.** Western blot sobre extracto crudo de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK2 (50 µg de proteínas totales) con anticuerpos anti-TcAUK2 o anti-β-tubulina (control de carga).

6.2.1. Comportamiento del cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK2

Durante el proceso de propagación de los distintos clones recuperados se observó una gran disparidad en la tasa de crecimiento, con clones cuyos cultivos pudieron ser propagados sin dificultad y otros cuya propagación demoró más tiempo. El clon que resultó positivo para la sobreexpresión de TcAUK2 pertenecía al grupo de clones que pudieron ser propagados sin dificultad. De todas formas, con el antecedente de este retraso en el crecimiento que mostraron

algunos clones, el primer análisis que se realizó sobre los epimastigotes pTREX-TcAUK2 fue una curva de crecimiento del cultivo. Para esto, cultivos de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK2s con igual concentración inicial de parásitos ($1x10^6$ células ml^{-1}) fueron cuantificados cada 24 hs para determinar el número de células por ml de cultivo. El cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK2 mostró un crecimiento más lento que el de células WT (Figura 36 A). Sin embrago, la diferencia entre la tasa de crecimiento de unos y otros no fue muy amplia, y recién al día 4 el cultivo WT duplicaba en número de células al cultivo de sobreexpresantes ($1,24x10^7$ y $0,63x10^7$ células ml^{-1}, respectivamente). Esta diferencia se mantuvo constante hasta el día 7, en donde el cultivo de células WT mostró una densidad de saturación de $9,8x10^7$ células ml^{-1} mientras que el cultivo de sobreexpresantes presentaba una densidad de $4,5x10^7$ células ml^{-1}. Este retraso leve en el crecimiento del cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK2 denota la alteración en la progresión del ciclo celular en estas células. Con el objetivo de establecer qué etapa del ciclo se ve afectada por la sobreexpresión de TcAUK2, epimastigotes WT y pTREX-TcAUKs fueron arrestados con HU para lograr la sincronización de las células en el ciclo celular y así poder realizar un detallado seguimiento en la progresión del mismo. Luego de incubar las células por 22 hs con HU 15 mM las mismas fueron lavadas con PBS y resuspendidas en medio LIT fresco (desarresto). Se recolectaron muestras a distintos tiempos para analizar por citometría de flujo la progresión del ciclo celular en cada cultivo por medio del marcado del ADN con IP (Figura 36 B). De esta forma se observó que hasta las 10 hs post-desarresto ambos cultivos progresan a la par en el ciclo celular. A las 2 hs ambos cultivos se muestran en fase G1 (2C), mientras que a las 7 hs las células se encuentran duplicando su ADN en la fase S (carga genética entre 2C y 4C), para finalmente a las 10 hs llegar ambos cultivos a la fase G2/M (4C). Es en estas fases donde los cultivos se comportan de forma distinta, observándose un retraso en la progresión a través de las mismas en parásitos sobreexpresantes de TcAUK2 (11 a 14 hs). Al analizar detenidamente el perfil de las curvas entre las horas 11 y 15 se puede estimar que el tiempo de retraso entre un cultivo y otro es de aproximadamente 60 minutos, y que a las 15 hs ya ambos cultivos muestran el mismo perfil de curva de IP. Es en G2/M donde las células duplican sus estructuras y organelas para posteriormente dividirse para formar dos células hijas. Por lo que el retraso mostrado por las células sobreexpresantes de TcAUK2 puede estar reflejando la alteración en alguno o varios de estos procesos celulares que se desarrollan durante estas fases.

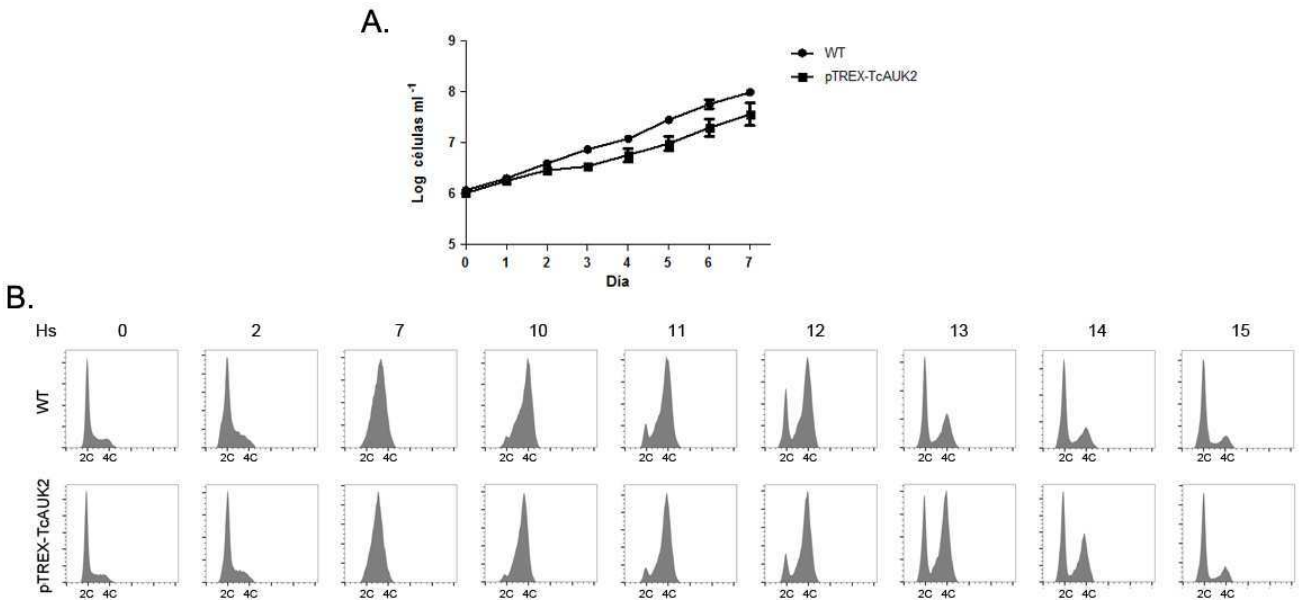


Figura 36. Curva de crecimiento y progresión del ciclo celular en epimastigotes pTREX-TcAUK2. A. Cultivos de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK2 (n=3) fueron cuantificados para número de células por ml cada 24 hs. Por cada punto se graficó el promedio de los tres cultivos con el error estándar. **B.** Por citometría de flujo de células sincronizadas y cuyo ADN fue marcado con IP, se determinó la fase del ciclo celular de muestras de parásitos tomadas a distintos tiempos post-desarresto (0 a 15 hs). El pico en 2C representa células en la fase G1 (0 hs y 2 hs), el pico en 4C corresponde a células en fase G2/M (10 a 15 hs) y el pico intermedio a 2C y 4C representa a células en fase S (7 hs).

6.2.2. Fenotipo de células sobreexpresantes de TcAUK2

Para comenzar a estudiar el efecto fenotípico a nivel celular de la sobreexpresión de TcAUK2 se observaron los epimastigotes pTREX-TcAUK2 por microscopía de fluorescencia. Para esto, parásitos sobreexpresantes en fase exponencial de crecimiento fueron fijados con PFA 4% y el ADN fue marcado con DAPI. El primer rasgo detectado fue alteraciones de distinta naturaleza a nivel de la carga genética. Algunas células mostraban miniestructuras de ADN por fuera del núcleo y el kinetoplasto (Figura 37 AI), otras sólo mostraban presencia de kinetoplasto (zoides) o un único núcleo (Figura 37 AII), mientras que en otras se observó la presencia de dos con un único kinetoplasto (2N1K). Estos desarreglos en la composición genética de las células también se pudo determinar por citometría de flujo de células obtenidas de cultivos asincrónicos marcadas con IP. En la curva de IP de un cultivo asincrónico en fase exponencial de crecimiento de epimastigotes WT se distinguen los picos de G1 (2C) y G2/M (4C), separados por el valle de células en fase S (Figura 37 C). En esta curva también se pueden distinguir picos discretos de células con carga genética superior a 4C (8C) y un pequeño pico de células con carga menor a 2C (flecha roja). En la curva de IP de epimastigotes pTREX-TcAUK2 no se observan picos discretos de células con carga genética mayor a 4C, sino que existe un continuo de mayor amplitud que en células WT y que se extiende hasta la altura del pico 8C. Este perfil de la curva refleja la presencia de las células con

ditinto grado de poliploidia que contienen mayor carga génica que células 2N2K. En el otro extremo de la curva de IP de epimastigotes pTREX-TcAUK2 se observa que el pico de células con carga genética inferior a 2C es mayor respecto a los WT (Figura 37 C, flechas rojas). Este aumento se puede explicar por un mayor número zoides, de células que poseen sólo un núcleo o bien células que han perdido parte de su ADN y que son la contraparte de las células 1N1K con miniestructuras de ADN. El perfil de esta misma curva también muestra un valle de fase S de mayor amplitud, atribuible a células 1N1K con presencia de miniestructuras de ADN.

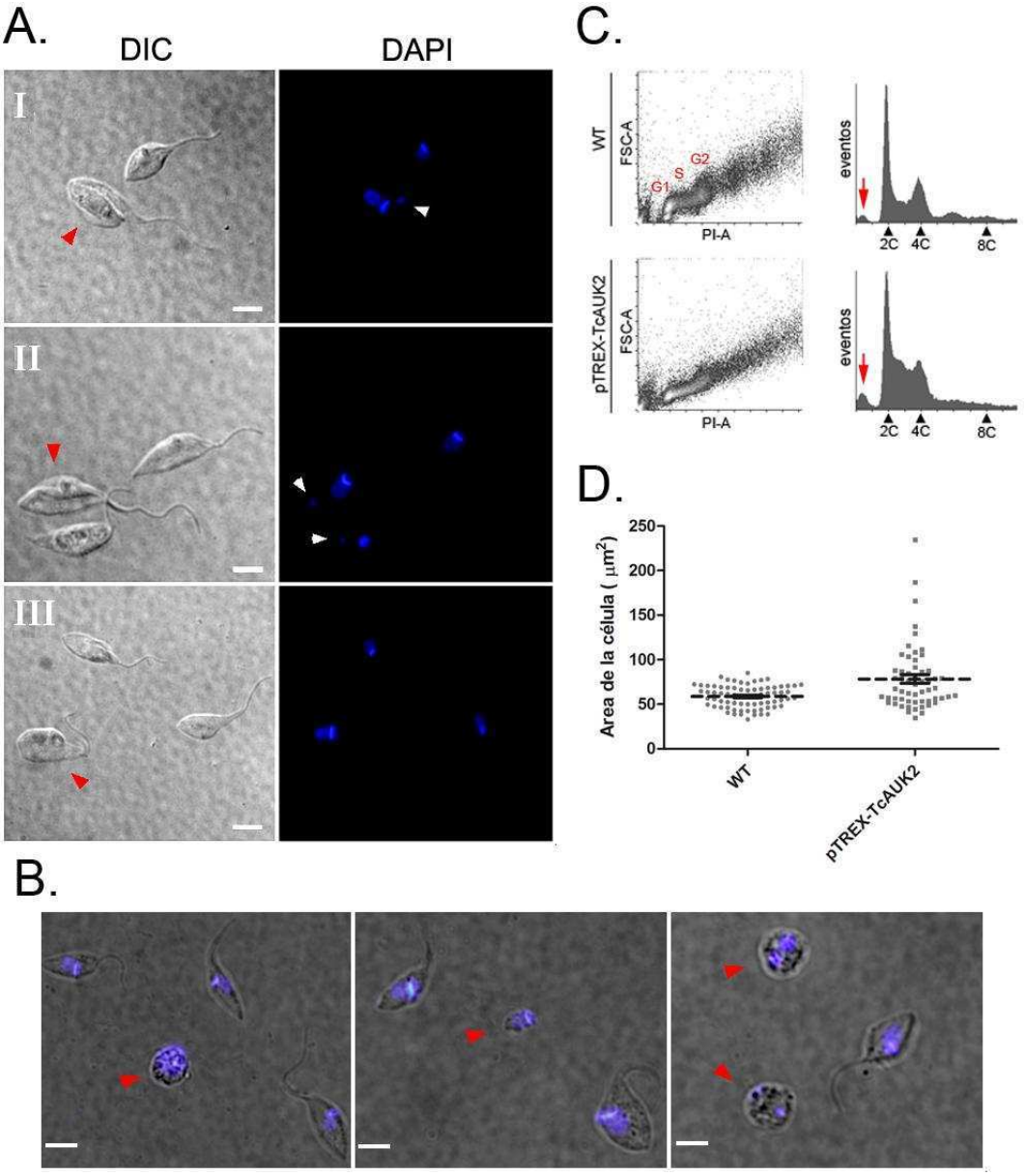


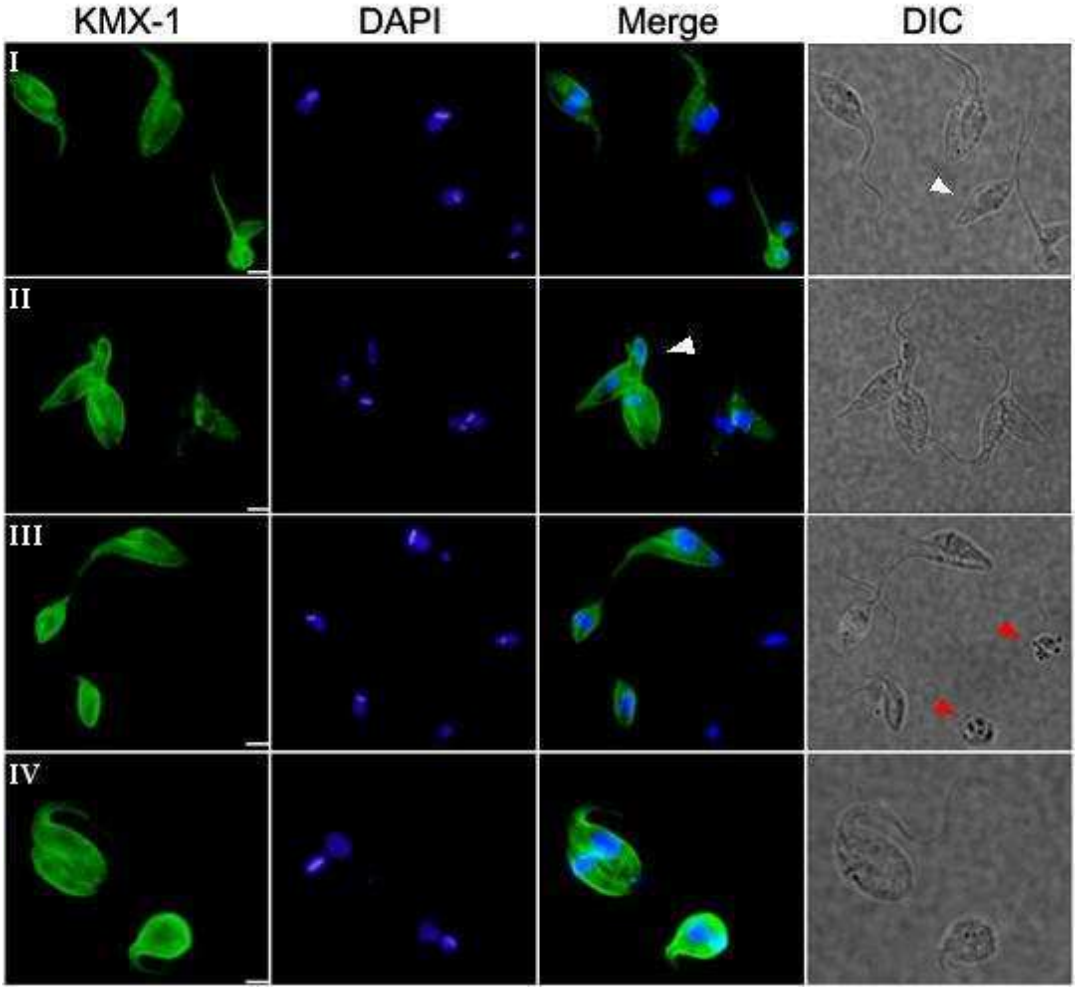
Figura 37. Fenotipo del cultivo de epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK2. A. Imágenes de fluorescencia de epimastigotes pTREX-TcAUK2 cuyo ADN fue marcado con DAPI. Las flechas blancas marcan miniestructuras de ADN y las flechas rojas señalan células con morfología aberrante. **B.** Overlay de DIC y ADN marcado con DAPI de epimastigotes pTREX-TcAUK2. Las flechas rojas señalan células redondas de tamaño alterado. **C.** *Density plot* (izquierda) y curva de IP (derecha) de células WT y pTREX-TcAUK2

analizadas por citometría de flujo. En el *density plot* la región blanca es la de mayor densidad de células y se identifican las nubes correspondientes a las fases G1, S y G2. En las curva de IP las flechas rojas marcan el pico sub 2C. **D.** Cuantificación del tamaño celular medio en cultivo de epimastigotes WT (n=73) y pTREX-TcAUK2 (n=57), en el s*catter plot* cada punto representa una célula y la línea punteada marca el valor medio de cada cultivo ± errores standard (barras de error). En **A.** y **B.** la barra representa 2 µm.

Junto con la aberración en la carga genética, en el cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK2 también se detectaron numerosas células con morfología alterada. Las alteraciones observadas mostraron un patrón heterogéneo, aunque como rasgos predominantes se detectaron células de forma redondeada (Figura 37 B, flechas rojas) y células de morfología aberrante con un tamaño mayor al de las células WT (Figura 37 A, flechas rojas). Una cuantificación del tamaño de las células en cultivos en fase exponencial de crecimiento de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK2 muestra que estos últimos poseen un mayor tamaño medio (78,32 μm^2 respecto a los 57,84 de las células WT), acompañado por una mayor dispersión de tamaños (Figura 37 D). Si por citometría de flujo se analizan dos parámetros celulares como es el tamaño de la célula (FSC-A) y su contenido de ADN (PI-A), en un cultivo asincrónico en fase exponencial de crecimiento de células WT se pueden distinguir 3 poblaciones mayoritarias bien definidas. Células en fase G1 de menor tamaño y menor contenido de ADN, que a medida que avanzan en el ciclo celular mantienen el contenido de ADN constante mientras van incrementando su tamaño. Las células en fase S muestran un tamaño mayor que células en G1, el cual mantienen constante mientras aumenta su contenido de ADN. Y por último las células en fase G2/M, que conservan constante su contenido de ADN (4C) mientras aumentan de tamaño hasta que ingresan en mitosis para reducir a valores de G1 su contenido de ADN (2C) y su tamaño. La lectura de estos parámetros celulares en un cultivo asincrónico dibuja una curva en forma de S recostada que se puede apreciar claramente en el *density plot* de epimastigotes WT de la Figura 37 C. Al medir estos dos parámetros en un cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK2 la curva del *density plot* no muestra la forma en S bien marcada como en células WT. Por el contrario, en este cultivo los límites de las poblaciones G1, S y G2/M se pierden y lo que se presenta es una curva de aspecto lineal, reflejando la presencia de células con contenido intermedio de ADN (miniestructuras). Esta curva también se diferencia de la de las células WT en que muestra una nube de células en G1 de mayor tamaño (corrida hacia arriba en el gráfico), reflejo de un mayor tamaño celular medio en este cultivo.

Con el objetivo de analizar con mayor profundidad las alteraciones morfológicas observadas en los epimastigotes pTREX-TcAUK2 se realizó una inmunofluorescencia contra β-tubulina en células tomadas de un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Durante la observación de estas células se identificaron una gran variedad de alteraciones a nivel de las estructuras de ADN: células que sólo presentaban sólo un único núcleo o kinetoplasto (Figura 38 V y VI), células con un kinetoplasto y más de un núcleo (Figura 38 VII), células con miniestructuras de ADN (Figura 38 IV,

VII y VIII). A nivel morfológico, en rasgos generales las células desarrollan un tamaño mayor que las células WT (ya descripto anteriormente). Este mayor tamaño viene acompañado de alteraciones estructurales que propician cambios en la morfología de las células. La más frecuente de estas morfologías son células con aspectos de "siamesas" que muestran dos somas separados en su parte posterior, unidos su parte anterior y con un único flagelo. Estas células pueden presentarse como 1N1K (Figura 38 I) o bien como 2N2K (Figura 38 VIII). En el caso de ser 1N1K se puede observar que el núcleo se ubica en uno de los somas de la célula mientras que el kinetoplasto se aloja en el otro. En las células siamesas 2N2K cada parte posee un núcleo y un kinetoplasto. Por otro lado, también se observaron células gigantes con aspecto de dos células juntas. Estas células también pueden encontrarse como 1N1K o 2N2K. En las primeras el kinetoplasto y el núcleo poseen una disposición relativa aberrante con el kinetoplasto lateral al núcleo (Figura 38 IV). En otras células se observa una expansión de la región de la base del flagelo, que tiene el aspecto de formar un anexo separado del cuerpo celular, separado de éste por una zona de constricción. En todos los casos observados este anexo contiene estructuras de ADN con aspecto de ser el núcleo celular (Figura 38 II y VI, flechas blancas).



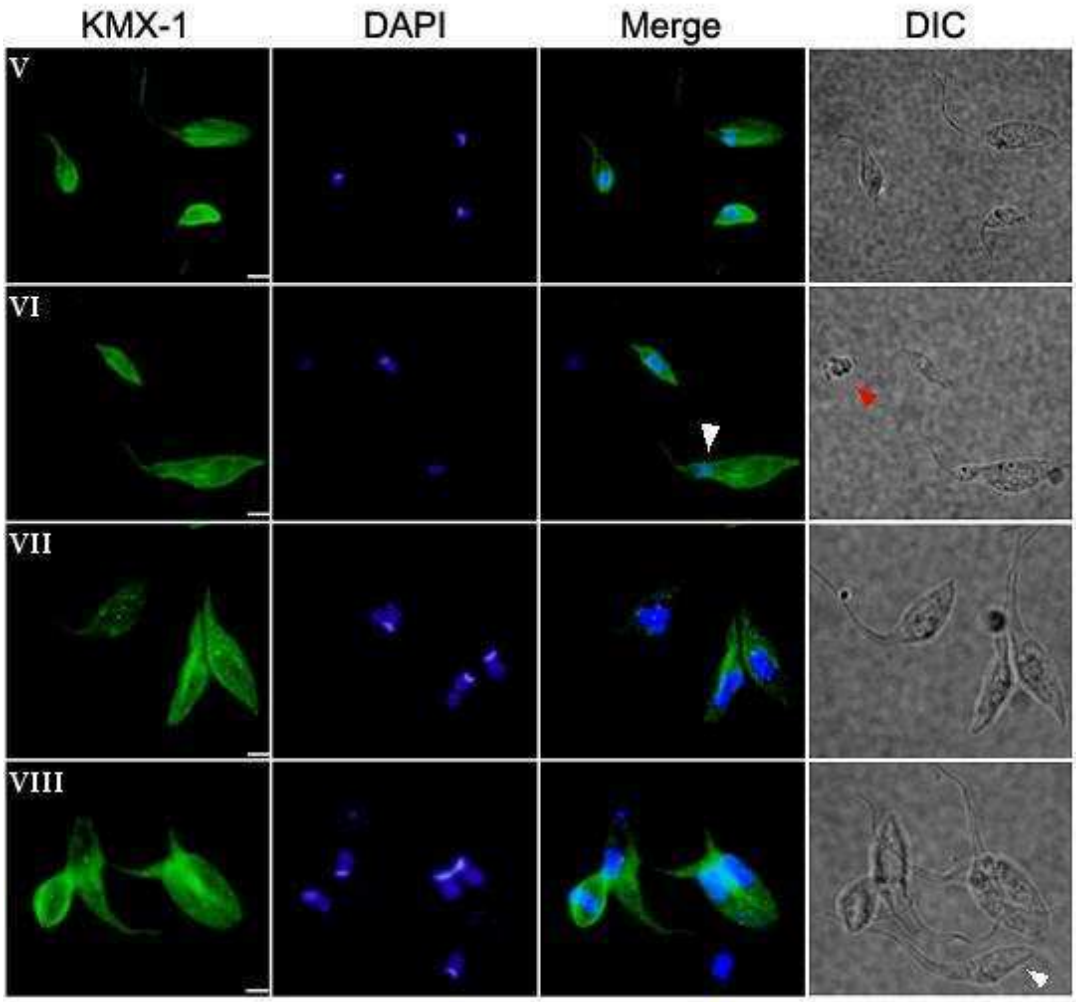


Figura 38. Estudio morfológicos de epimastigotes pTREX-TcAUK2. Células sobreexpresantes de TcAUK2 fueron fijadas en PFA 4% y marcado su citoesqueleto con anticuerpo anti-β-tubulina (KMX-1). El ADN fue marcado con DAPI. Las barras representan 2 µm.

Un aspecto sobresaliente de algunas células sobreexpresantes es que no son marcadas con el anticuerpo contra β-tubulina (KMX-1). Entre estas células se encuentran las células redondeadas descriptas anteriormente (Figura 38 III y VI, flechas rojas), con lo que la falta de microtúbulos podría ser las causa de la pérdida de su morfología. Pero más llamativo es la falta de marca para β-tubulina en células de morfología normal (Figura 38 I y VIII, flechas blancas), a las cuales ubicamos como un estadio previo a las células redondeadas

6.2.3. Localización subcelular de TcAUK2 en células sobreexpresantes

Hemos visto por inmunofluorescencia en epimastigotes WT que TcAUK2 se localiza en la región de la base del flagelo, en las cercanías del cuerpo basal. Con el fin de determinar si los mayores niveles de TcAUK2 provocan una deslocalización de la enzima, se analizó la ubicación de la misma en epimastigotes pTREX-TcAUK2 mediante un ensayo de inmunofluorescencia. De este modo se observó que en células sobreexpresantes, TcAUK2 también se ubica en la región de la base del

flagelo (Figura 39 A). Aunque también se detecta una marca citoplasmática difusa y débil de la proteína. Mediante inmunofluorescencia en células WT, se observó que TcAUK2 no parecía estar asociada directamente al cuerpo basal. Para tratar de establecer de una forma más precisa la ubicación exacta de TcAUK2 en células sobreexpresantes, se realizó un doble marcado con anticuerpo contra TcAUK2 y un anticuerpo contra flagelo (L13D6). De esta forma se pudo observar que en la mayoría de las células TcAUK2 se localiza en estrecha relación con el nacimiento del flagelo (Figura 39 B), a la altura donde éste atraviesa el bolsillo flagelar. Al enfocar en detalle el aspecto de la marca de TcAUK2 (Figura 39 B recuadro) se observa que la misma posee forma de filamento de poca longitud, con un diámetro similar al del esqueleto del flagelo.

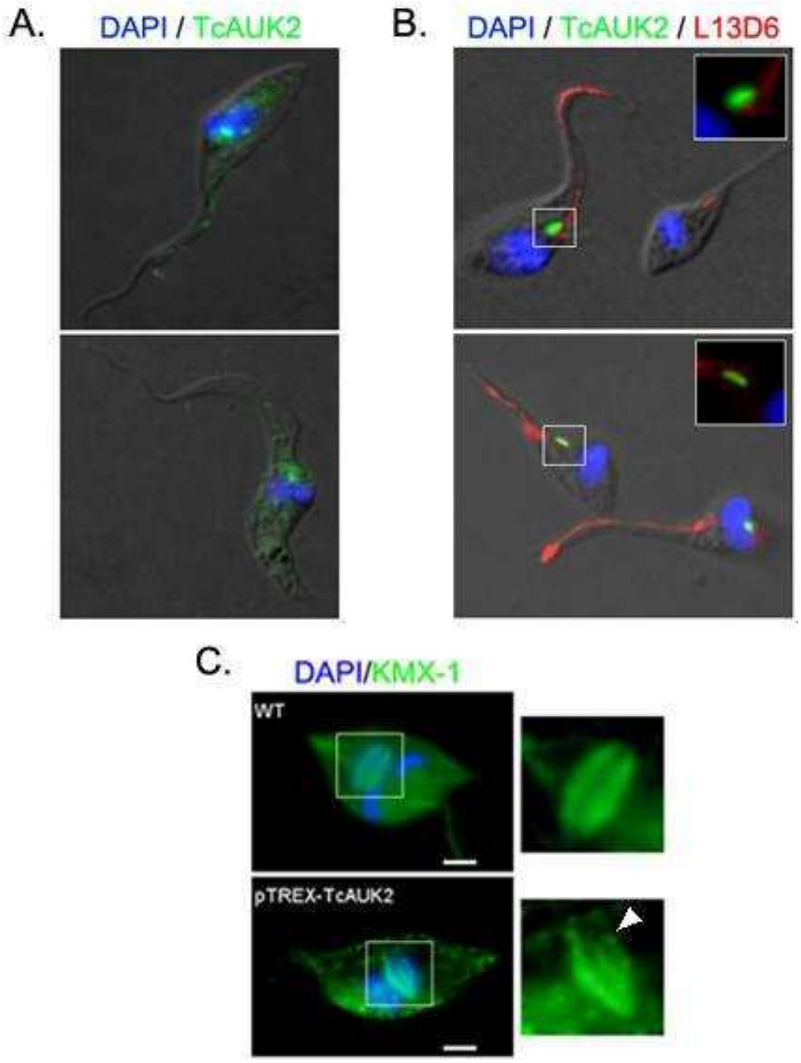


Figura 39. Localización de TcAUK2 en epimastigotes pTREX-TcAUK2. A. Inmunofluorescencia contra TcAUK2 en epimastigotes fijados con PFA 4%. **B.** Inmunofluorescencia contra TcAUK2 y flagelo (L13D6) en epimastigotes pTREX-TcAUK2 fijados con metanol. **C.** Inmunofluorescencia contra β-tubulina (KMX-1) en epimastigotes WT y pTREX-TcAUK2, la flecha blanca marca polo del huso mitótico con menor número de microtúbulos. En todos los casos el ADN fue marcado con DAPI. La barra representa 2 µm.

Tanto el flagelo como el kinetoplasto mostraron su secuencia de duplicación típica del ciclo celular. Es decir que la progresión del ciclo en parásitos sobreexpresante conservó el orden de duplicación de estas estructuras que sucede con las células WT, encontrando en un cultivo asincrónico sólo células con un flagelo y un kinetoplasto (1F1K), dos flagelos y un kinetoplasto (2F1K), y dos flagelos con dos kinetoplastos (2F2K). En cambio, se observaron una gran cantidad de células en las cuales el número de núcleos por célula no se correspondía con ninguna fase del ciclo, encontrándose células 1F1K con dos núcleos (1F1K2N), células con flagelo y kinetoplasto pero sin núcleo (1F1K0N), o bien células con un flagelo y el núcleo sólo (1F0K1N). En estas últimas el núcleo se encuentra totalmente deslocalizado, con un tamaño reducido y morfología no circular. Estas observaciones muestran que, junto con alteraciones en la morfología de la célula, la sobreexpresión de TcAUK2 también provoca alteraciones en la morfología nuclear y produce una alteración en el comportamiento del núcleo durante la división celular. En la mitosis nuclear es fundamental la participación del huso mitótico, que se forma dentro del núcleo al inicio de la mitosis y dirige la segregación de los cromosomas hasta que ambos núcleos hijos quedan establecidos con idéntica composición génica. Para tratar de verificar si el desbalance génico observado en epimastigotes sobreexpresantes se debe a la alteración de la estructura del huso mitótico, epimastigotes WT y pTREX-TcAUK2 fueron inmunomarcados con el anticuerpo anti β-tubulina KMX-1. Al analizar las imágenes de inmunofluorescencia de células en mitosis nuclear se observa que el huso mitótico en epimastigotes pTREX-TcAUK2 pierde la simetría que sí se observa en el huso de células WT, detectándose que distinto número de microtúbulos que se originan en uno y otro polo del huso (Figura 39 C).

Los fenotipos encontrados en células pTREX-TcAUK2 sugieren que la sobreexpresión de TcAUK2 provoca una alteración en la estructura y dinámica de los microtúbulos. Esto tendría su principal efecto sobre la segregación de las distintas organelas y estructuras que se duplican y separan previo a la división celular (principalmente kinetoplasto, núcleo y flagelo). En casos extremos, esta alteración lleva a algunas células a perder totalmente su forma normal como consecuencia de la ausencia total de fibras de microtúbulos.

6.3. Análisis funcional de TcAUK3

Epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK3 fueron generados por transfección de la construcción pTREX-TcAUK3. En el diseño de esta construcción se eligió la secuencia TcCLB.504655.30 (Tabla 1 sección Resultados) como gen TcAUK3. Una vez realizada la transfección, y luego de tres semanas de selección, se confirmó la generación de epimastigotes transgénicos mediante ensayo de Southern blot. En éste fue detectada la copia extra del gen TcAUK3 en la población de células transfectadas (Figura 40 A). Una vez confirmada la transgénesis, a partir de la población original de transfectantes se obtuvieron cultivos clonales (22 clones) por la técnica de diluciones mínimas. Todos los clones recuperados fueron chequeados para los niveles de expresión proteica de

TcAUK3 por ensayo de Western blot, y sólo uno resultó positivo y fue denominado clon G5 (Figura 40 B). Al analizar el perfil de bandas obtenido en epimastigotes pTREX-TcAUK3 se detecta la presencia de una proteína de PM aproximado a 55 kDa, que es el valor esperado para TcAUK3 (56,3 kDa). En epimastigotes WT no se detecta una banda de este PM, por lo que la sola presencia de la misma es suficiente para considerar al clon pTREX-TcAUK3 como sobreexpresantes de esta enzima. El resto de las bandas observadas en los epimastigotes sobreexpresantes también las muestran las células WT, y son las mismas que se detectaron al estudiar el perfil de expresión de TcAUK3 en las tres formas del parásito (Figura 10 de resultados).

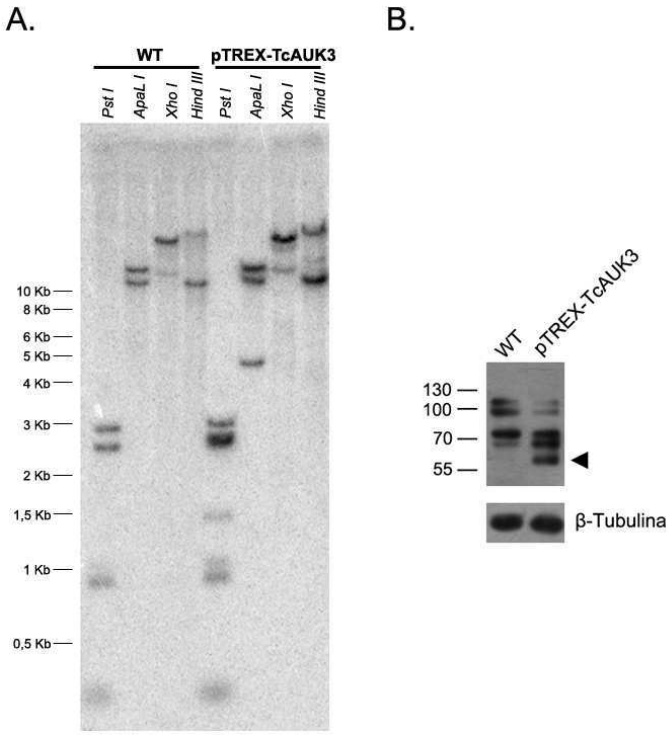


Figura 40. Epimastigotes CL Brener pTREX-TcAUK3. A. La confirmación de la obtención de epimastigotes transgénicos se realizó por Southern blot para detectar la copia extra del gen en el genoma de los parásitos pTREX-TcAUK3, utilizando como sonda la extensión completa del gen TcAUK3. **B.** Por Western blot con anticuerpo específico anti-TcAUK3 se comprobó el mayor nivel de expresión de la proteína (flecha). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti β-tubulina.

6.3.1. Comportamiento del cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK3

Durante la recuperación de los distintos clones se observó una gran disparidad en la tasa de crecimiento entre los mismos, habiendo clones de crecimiento rápido, intermedio y lento. Incluso tres clones de crecimiento muy lento no prosperaron y el cultivo termino por perderse. Esta diferencia en el crecimiento de los cultivos nos llevó a pensar que la sobreexpresión posiblemente afecte la tasa de división de las células. Por consiguiente, una vez establecido el cultivo del clon elegido se analizó la tasa de división celular mediante una curva de crecimiento. Cultivos de células

WT y sobreexpresantes se iniciaron con una densidad de $1x10^6$ epimastigotes por ml y cada 24 hs se cuantificó la concentración de parásitos a lo largo de 7 días continuos (Figura 41 A). Las células sobreexpresantes de TcAUK3 muestran una tasa de crecimiento, que en términos relativos se aproximaba al 75% del tiempo de duplicación de los parásitos WT. Esto hizo que durante los días iniciales de cultivo las diferencias no sean notorias, y que sí comience a ser significante durante la fase exponencial de crecimiento del cultivo. En el día 4 el cultivo WT duplica en número de células al cultivo de sobreexpresantes ($1,24x10^7$ y $0,63x10^7$ células ml^{-1}, respectivamente). Al cabo de 7 días la diferencia entre los dos cultivos se incrementa al casi el triple de densidad en cultivo WT (densidad de saturación de $9,8x10^7$ células ml^{-1}) respecto al cultivo pTRX-TcAUK3 ($3,44x10^7$ células ml^{-1}). Este retraso en el crecimiento del cultivo nos llevó a analizar el ciclo celular de los epimastigotes sobreexpresantes para tratar de determinar cuál era la fase afectada que provocaba el retraso en el crecimiento de las células sobreexpresantes. Para esto, cultivos de células WT y de células pTREX-TcAUK3 fueron arrestados con HU para lograr la sincronización de los mismos. Luego de que las células fueron liberadas del arresto se tomaron muestras a distintos tiempos para poder definir una cronología de las distintas fases de ciclo celular mediante el marcado del ADN con IP y citometría de flujo. Las curvas de IP a distintos tiempos mostraron que ambos cultivos progresan en paralelo por las fases G1 y S del ciclo celular. Así a las 11 horas post desarresto la mayor parte de las células en ambos cultivos se encuentran en G2/M (pico 4C), y una pequeña proporción en G1 (pico 2C). A partir de aquí se observa que el cultivo pTREX-TcAUK3 sufre un retardo en transitar las fases G2/M, y mientras que a las 12 hs en el cultivo WT existe una proporción similar de células en G1 y G2/M, recién a las 13 hs el cultivo de sobreexpresantes muestra el mismo perfil de curva (Figura 41 B).

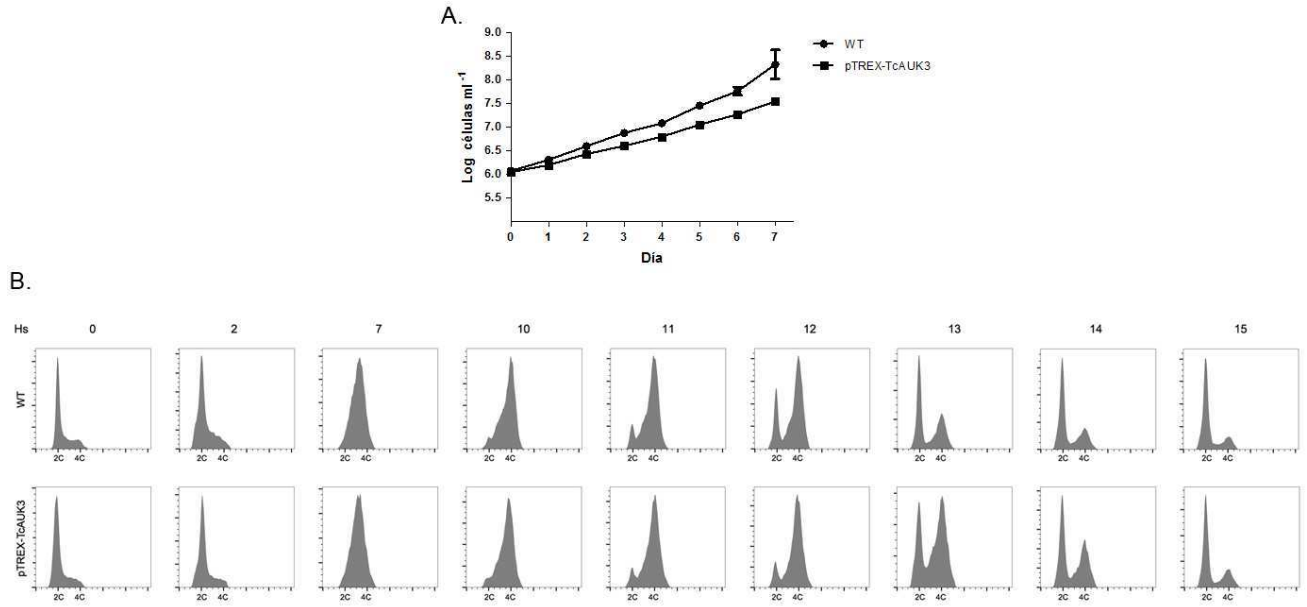


Figura 41. Análisis del cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK3. A. Cultivos de epimastigotes WT y pTREX-TcAUK3 (n=3) fueron cuantificados para número de células por ml cada 24 hs. Por cada punto se graficó el promedio de los tres cultivos con el error estándar. **B.** Por citometría de flujo de células sincronizadas cuyo ADN fue marcado con IP, se determinó la fase del ciclo celular de muestras de parásitos tomadas a distintos tiempos post desarresto. El pico en 2C representa células en la fase G1 (0 y 2 hs), el pico en 4C corresponde a células en fase G2/M (10 a 15 hs) y el pico intermedio a 2C y 4C representa a células en fase S (7 hs).

6.3.2. Fenotipo de células sobreexpresantes de TcAUK3

Con el objetivo de analizar el fenotipo de las células sobreexpresantes de TcAUK3 se tomó una muestra de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, se fijaron las células en PFA 4% y se marcó el ADN con DAPI para observación en microscopía de fluorescencia. El primer rasgo observado fue una alta proporción de células con un contenido aberrante de núcleos y kinetoplastos. Estas alteraciones se presentaban de distintas formas, encontrándose células multinucleadas y con un kinetoplasto (XN1K, Figura 42 A flecha roja); células multinucleadas y sin kinetoplasto (XN0K); células con un núcleo y sin kinetoplasto (1N0K); células con un kinetoplasto y sin núcleo (zoides 0N1K); y células con más de 2 kinetoplastos y múltiples núcleos (XNYK). Aparte de la alteración numérica, estas organelas también mostraron alteraciones estructurales como ser la presencia de miniestructuras de ADN (Figura 42 A flecha roja), núcleos que se observaban como un voluminoso agregado nuclear, o bien kinetoplastos de muy pequeño tamaño con aspecto de ser sólo fracciones de esta organela (Figura 42 A flecha blanca). En forma general, estas aberraciones en el número de núcleos y kinetoplastos parecían estar acompañadas por un aumento en el tamaño celular. Ante este hallazgo, y para obtener un panorama global de la composición celular en cultivos de epimastigotes pTREX-TcAUK3, se marcó el ADN de células sobreexpresantes asincrónicas con IP y se analizaron las muestras por citometría de flujo. Este análisis, que también se realizó para epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK2, muestra que la nube de *density plot* para células pTREX-TcAUK3 muestra el mismo perfil que en células WT, pero con la salvedad de estar corrido hacia arriba en el eje SSC-A. Esto último refleja que el cultivo de epimastigotes pTREX-TcAUK3 está compuesto por células de mayor tamaño que el de epimastigotes WT (Figura 42 B). Para tener una referencia de los tamaños de las células sobreexpresantes se realizó una cuantificación del área celular en imágenes de microscopía de fluorescencia de células pTREX-TcAUK3 y WT con sus microtúbulos marcados con un anticuerpo anti β-tubulina. Los resultados de esta cuantificación muestran que el tamaño medio de las células sobreexpresantes (127,92 μm^2) es mayor al doble que el de los parásitos WT (56,58 μm^2). El perfil de la curva de contenido de ADN de la población de células pTREX-TcAUK3 es similar al que se observó para parásitos sobreexpresantes de TcAUK2, donde respecto al WT hay una mayor cantidad de células con carga génica menor a 2C (Figura 42 B flecha roja), es decir células con menos ADN que una célula 1N1K, y un aumento de células con distinto grado de mayor cantidad de ADN que una célula 2N2K (4C).

El valle entre los dos picos de carga génica normal (2C y 4C) también se observa aumentado en la muestra de epimastigotes sobreexpresantes, reflejando la presencia de mayor cantidad de células que se encuentran en el intermedio de las subpoblaciones 1N1K y las de 2N2K.

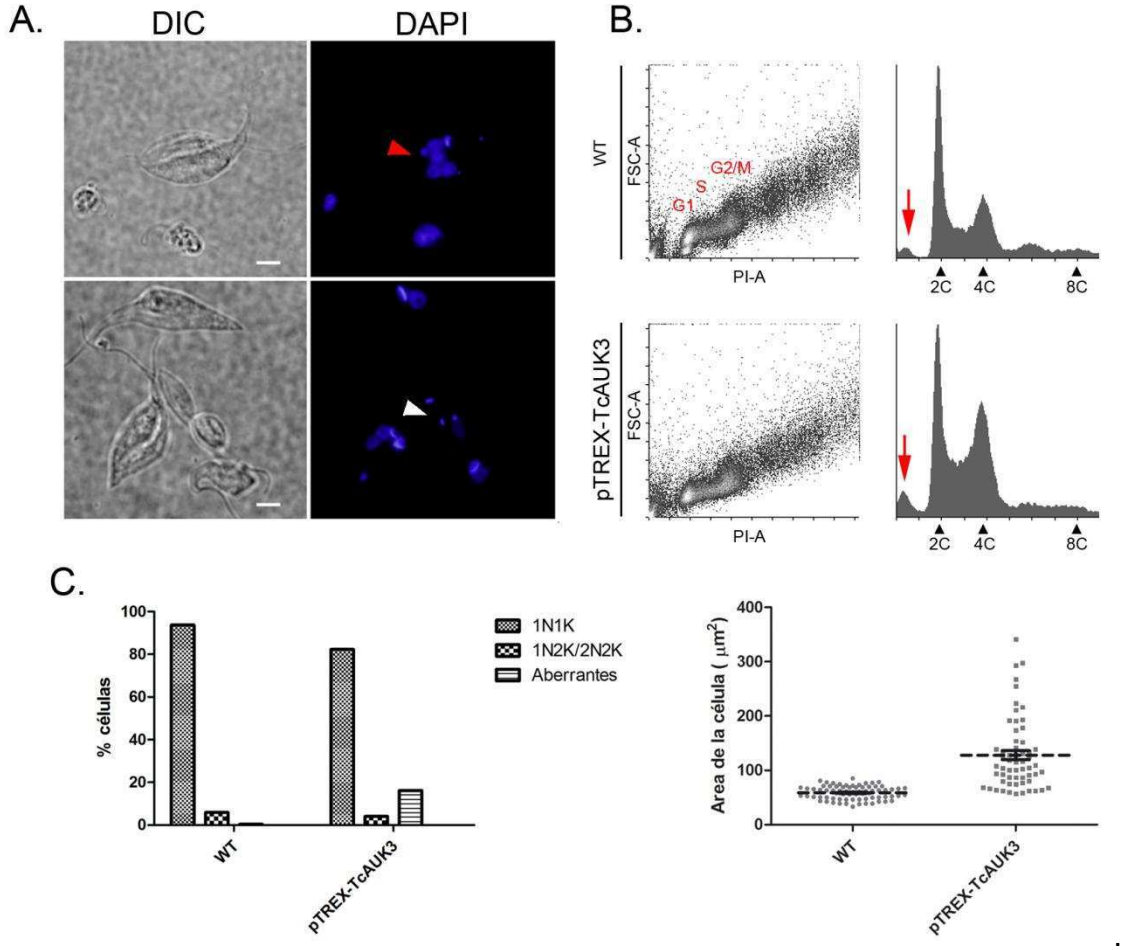


Figura 42. Fenotipo del cultivo de epimastigotes sobreexpresantes de TcAUK3. A. Células con el ADN marcado con DAPI fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Se observan célula multinucleada con "miniestructuras" de ADN (flecha roja) y célula con kinetoplastos pequeños (flecha blanca). La barra representa 2 µm. **B.** *Density plot* y curva de IP de células WT y pTREX-TcAUK3 analizadas por citometría de flujo. En el *density plot* la región blanca es la de mayor densidad de células, las flechas rojas marcan el pico sub 2C en la curva de IP. **C.** Izquierda: cuantificación de células con carga génica aberrante en cultivo de epimastigotes WT (n=241) y sobreexpresantes de TcAUK3 (n=198). Derecha: cuantificación del tamaño celular medio en cultivo de epimastigotes WT (n=73) y pTREX-TcAUK3 (n=59), en el s*catter plot* cada punto representa una célula y la línea punteada marca el valor medio de cada cultivo ± errores estándar (barras de error).

Para analizar la morfología celular de células sobreexpresantes, epimastigotes en fase exponencial de crecimiento fueron fijados en PFA 4%, su citoesqueleto marcado con anticuerpo anti-β-tubulina y el ADN con DAPI. Luego por microscopia de fluorescencia se observaron las células, estudiando su morfología y el contenido de ADN. Como se mencionó más arriba, el contenido aberrante de

ADN que se observa entre las distintas células es muy variado, y lo mismo sucede con la morfología de las mismas. Una característica llamativa que se observa en algunas de estas células es que la marca de β-tubulina no es homogénea, como lo es en células WT, sino que se pueden distinguir puntos de mayor intensidad dispersos por todo el soma celular (Figura 43 I), lo que estaría reflejando la presencia de múltiples puntos de nucleamiento o agregado de tubulina. Por otro lado, y al igual que se observó con la sobreexpresión de TcAUK2, fueron detectadas células pequeñas que han perdido la morfología normal y no muestran marca para β-tubulina (Figura 43 II). Nuevamente, al igual que en epimastigotes pTREX-TcAUK2, aquí también se detectaron células "siamesas" unidas por la región posterior, y que también pueden ser agrupadas en las que son 1N1K o bien 2N2K. En estas últimas los dos pares de núcleo y kinetoplasto se localizan de un mismo lado, quedando la otra parte de la célula sin ninguna estructura de ADN (Figura 43 IV y V). Otro aspecto morfológico observado en estos parásitos es la presencia de más de un flagelo por célula, incluso en aquellas que han perdido la morfología característica (Figura 43 II y III). En cuanto al contenido de ADN, estas células muestran rasgos similares a las sobreexpresantes de TcAUK2, como ser la presencia de miniestructuras de ADN y células 1N0K o 0N1K. Por otro lado, aparecen rasgos únicos de esta condición de sobreexpresión de TcAUK3 y que son células con más de 2 núcleos (>2N, Figura 42 A), células cuyo núcleo adopta un aspecto de voluminoso agregado nuclear (Figura 43 I) y células que muestran uno o más kinetoplastos de tamaño notablemente inferior al normal (Figura 42 A, flecha blanca).

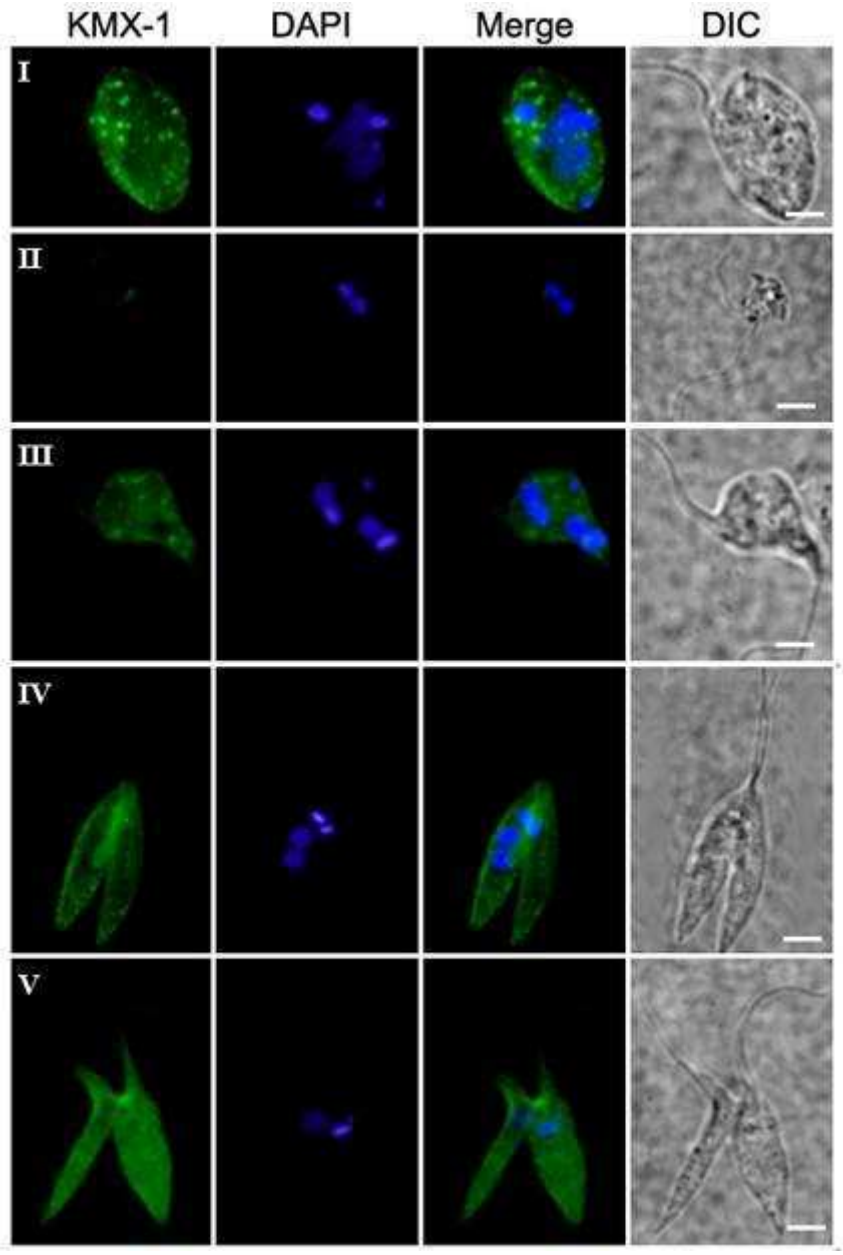


Figura 43. Morfología de epimastigotes pTREX-TcAUK3. Las células fueron fijadas con PFA 4%, los microtúbulos fueron marcados por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti β-tubulina (KMX-1) y se tiño el ADN con DAPI. Las barras corresponden a 2 µm.

Para profundizar en el estudio de las alteraciones estructurales y morfológicas que presentan las células sobreexpresantes de TcAUK3, epimastigotes fueron fijados con metanol y doblemente marcados para β-tubulina (KMX-1) y para flagelo (L13D6). Las células que perdieron su morfología (Figura 43 II) muestran un desorden total en el arreglo de los microtúbulos, las estructuras de ADN se presentan como grandes agregados sin una forma concreta y poseen más de un flagelo. Esto último sugiere que se trata de células que comenzaron el proceso de mitosis, en las cuales se concreto el crecimiento del nuevo flagelo pero falla la división y segregación de las organelas de ADN probablemente debido a una falta de estructura del citoesqueleto de la célula (Figura 44). Esta

misma alteración en los microtúbulos podría estar provocando una imposibilidad por parte de las células de llevar a cabo la citoquinesis.

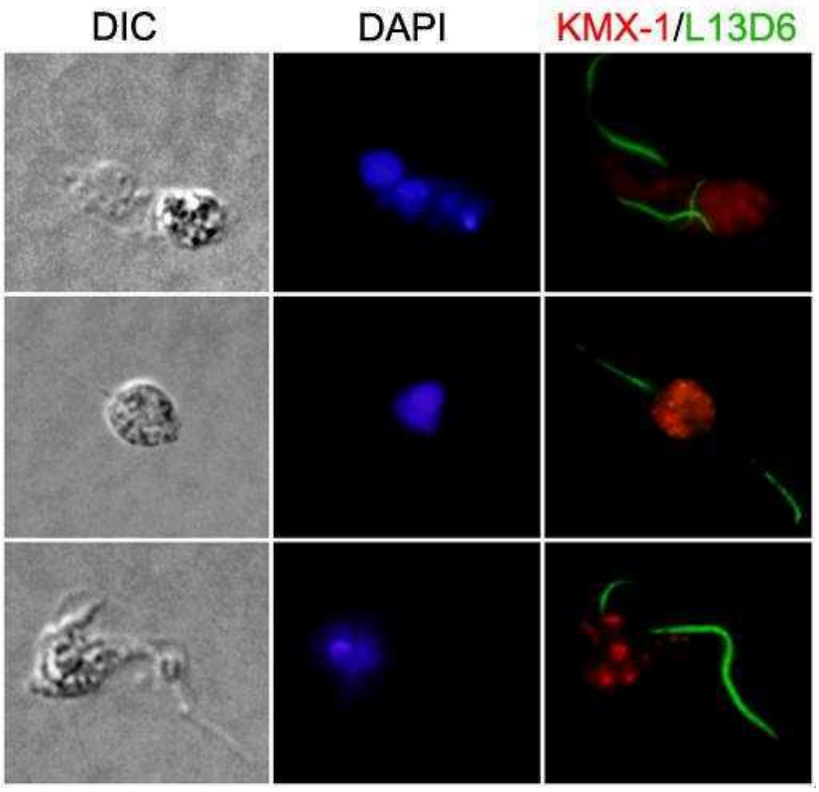


Figura 44. Morfología de epimastigotes pTREX-TcAUK3. Células fijadas con metanol fueron doblemente marcadas para microscopia de fluorescencia con Ac anti β-tubulina (KMX-1) y anti flagelo (L13D6), el ADN se tiñó con DAPI.

6.3.3. Localización de TcAUK3 en células sobreexpresantes

Para estudiar si con su sobreexpresión TcAUK3 conserva la localización subcelular que posee cuando es expresada a niveles endógenos, o bien sufre algún tipo de deslocalización, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo específico contra esta proteína en epimastigotes pTREX-TcAUK3. Así se observó que células multinucleadas que mantienen la morfología de una única célula de tamaño gigante mostraban una deslocalización de TcAUK3, siendo detectada la misma en forma difusa por el citoplasma de la célula (Figura 45 I). En cambio, en el caso de estructuras celulares que muestran aspecto de varias células que se mantiene unidas sin poder concretar su separación durante la citocinesis, TcAUK3 muestra localización puntual en las proximidades de cada uno de los kinetoplasto que se encuentran dentro de estas células (Figura 45 II y III). En células con morfología normal pero que muestra alterada la estructura del kinetoplasto (Figura 45 IV flecha blanca), TcAUK3 muestra una localización puntual en las proximidades de esta organela al igual que en células WT. Todas estas observaciones parecen demostrar que la sobreexpresión de TcAUK3 no produce mayores alteraciones en su localización. Considerando que TcAUK3 es

una enzima, los mayores niveles de actividad debido a su sobreexpresión puede ser el desencadenante del fenotipo observado, a pesar que la proteína se mantenga localizada tal cual las células WT.

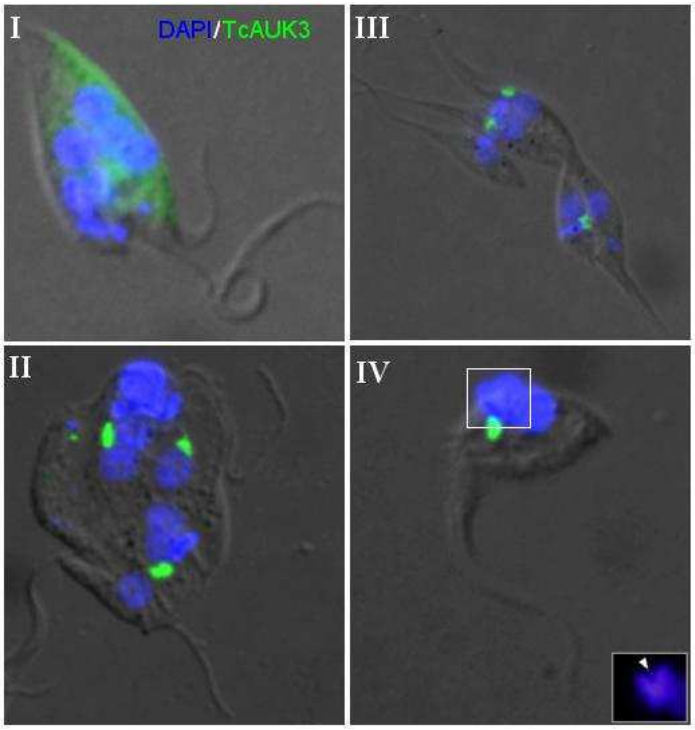


Figura 45. Localización subcelular de TcAUK3 en células sobreexpresantes. Epimastigotes pTREX-TcAUK3 fueron fijados con PFA 4% y sometidos a inmunofluorescencia con anticuerpo anti TcAUK3 para detectar su ubicación dentro de las células. El ADN fue marcado con DAPI. En IV el recuadro muestra una amplificación del kinetoplasto.

Ahora bien, cuál es la causa de este fenotipo que se observa en células sobreexpresantes de TcAUK3. Al marcar las células con el anticuerpo anti β-tubulina se detectó una severa desorganización del citoesqueleto, con grumos de microtúbulos dispersos por todo el cuerpo celular. La alteración en la dinámica de los microtúbulos parece ser la causa principal por la cual se observa este abanico de fenotipos, que si bien muestran un patrón en común, también muestra bastante heterogeneidad y matices diferenciales entre las distintas células

DISCUSIÓN

Antes de iniciar la discusión de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, considero importante introducir el estado actual del conocimiento sobre los temas aquí tratados. En búsquedas en las bases de datos del PubMed con la entrada “Cell Cycle” se obtienen un total de 376.436 referencias, al buscar “Trypanosoma” se obtienen 24.204 referencias. Ahora, al buscar la intersección de ambos el total de referencias obtenidas se reduce a 351. Más específicamente, sobre ciclo celular en *T. brucei* se pueden encontrar 247 trabajos, mientras que en *T. cruzi* tan solo 95. Si se es un poco más exigente con los requisitos de la búsqueda, tenemos que trabajos que contengan “Aurora kinase” y *T. brucei* hay solo 5, mientras que con “Aurora kinase” y *T. cruzi* el resultado es nulo. Finalmente, y para contextualizar la relevancia de las Aurora quinasas, es importante hacer notar que más de la mitad de los resultados obtenidos al buscar información sobre estas enzimas (1.089) son trabajos en cuyo título aparecen las palabras “Aurora kinase” y cáncer, mientras que más del 50% de los trabajos publicados en los últimos dos años corresponden al estudio de inhibidores de estas proteínas. Este último dato indica claramente los esfuerzos que se están haciendo para encontrar una quimioterapia eficiente utilizando a esta familia de proteínas como blanco. Por consiguiente, consideramos importante todo avance que se pueda realizar en un tema tan poco explorado y que en otros sistemas es considerado como un posible blanco de drogas. Por otro lado, este trabajo aporta datos a un tema poco estudiado como es la división celular en tripanosomátidos y el rol que juegan los genes Auroras quinasas en este proceso.

Las Aurora quinasas son enzimas esenciales en la regulación de la mitosis en células eucariotas. En mamíferos hay tres Aurora quinasas: la Aurora quinasa A, que participa en el ensamblado del huso mitótico y también forma parte de la vía de señalización que permite la progresión de células en G2 hacia la mitosis; la Aurora quinasa B, involucrada en el control de la correcta segregación de los cromosomas y también participa en la citoquinesis; y la Aurora quinasa C, que se expresa en células germinales en las cuales controla procesos de la división celular. En *Drosophila melanogaster*, donde las Aurora quinasas fueron descriptas por primera vez [109], se han identificado dos Aurora quinasas. En el mismo sentido, el número de Aurora quinasas disminuye, y también se ve modificada la función que estas enzimas desempeñan, en los taxones más primitivos. Esto posiblemente como reflejo a las variantes en la estrategia de división celular presentes en organismos menos evolucionados. Ejemplo de esto es la única Aurora quinasa presente en levaduras (Ipl1 en *S. cerevisiae* y Ark1 en *S. pombe*), la cual es requerida para el ensamblado del huso y la segregación de los cromosomas sin un aparente rol en la citoquinesis [142]. La simplificación en el numero de Aurora quinasas al llegar a organismos unicelulares no parece ser la regla, ya que al menos en protozoos como *T. brucei* y *P. falciparum* se han detectado tres miembros de la familia. En *T. brucei* sólo uno de los miembros es funcional y es donde más se ha avanzado sobre el papel que desempeña un gen Aurora durante la división celular de protozoos

[173-175, 194-196]. En cambio, en *P. falciparum* los tres genes Auroras parecen ser funcionales aunque sus roles no han sido descriptos aún [171].

Durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis se detectaron y caracterizaron parcialmente tres genes Aurora quinasas en *Trypanosoma cruzi* (TcAUK1, TcAUK2 y TcAUK3). Las secuencias aminoacídicas de estas proteínas mostraron un alto nivel de conservación en la región del sitio activo, e incluso todos los residuos involucrados en la actividad catalítica de la Aurora A humana se mantienen conservados en las TcAUKs (Figura 5 de resultados). Otro dato que respalda la pertenencia de los genes identificados como TcAUKs a la familia de las proteínas Aurora quinasas es el hecho que residuos específicos que distinguen a estas proteínas, respecto a otras quinasas, se encuentran conservados (en Aurora A Leu210, Trp277 y Val 279). Del análisis de secuencia, uno de los datos más relevantes es la alta identidad que muestran las TcAUKs respecto a las Auroras de *T. brucei*, y sobre todo el 80% de identidad que muestra TcAUK1 respecto a la Aurora quinasa 1 de *T. brucei*. Este alto grado de conservación, en comparación con los otros genes Aurora en estos dos organismos, nos da la idea de la importancia de TcAUK1 en la biología del parásito. El hecho que en los organismos protozoos haya tres genes Aurora en lugar de uno, como en el caso de otros organismos unicelulares, puede responder a varios motivos. Lo primero que hay que destacar es que los protozoos muestran una arquitectura celular compleja con estructuras celulares atípicas. Otro aspecto es la división celular en estos organismos, en los cuales la presencia del kinetoplasto modifica en parte las fases S y M del ciclo celular. Por último, hay que tener en cuenta que los protozoos son células que a lo largo de su ciclo de vida se diferencian a otras formas, variando su morfología y arquitectura. Es posible que la función de los genes Aurora en estos organismos se adapte a uno o varios de estos aspectos diferenciales de la biología celular. Un antecedente de esto es el hecho que la Aurora quinasa 1 de *T. brucei* muestra distintas funciones entre las formas procíclica y sanguínea del parásito [174].

La mitosis y la meiosis son procesos fundamentales durante los cuales las células sufren profundos cambios estructurales. Estos eventos son orquestados con una altísima precisión, activando y desactivando distintas vías de señalización en el momento preciso y en la localización subcelular adecuada. Uno de los principales coordinadores de estas actividades es el *Chromosomal Passenger Complex* (CPC), conformado por la Aurora B, INCENP, Survivina y Borelina [158]. En este complejo la Aurora B es el componente enzimático, mientras que las otras tres proteínas cumplen la función de regular la actividad de la Aurora y de conducir al complejo hacia las distintas localizaciones que adopta durante la mitosis [118]. La ausencia de cualquiera de los componentes del CPC conduce a la deslocalización del complejo con un concomitante bloqueo de la mitosis. También se ha observado que la no conformación del complejo provoca una alteración en la estabilidad de las proteínas que lo conforman, por lo que ser parte del complejo evita que estas proteínas sean degradadas [197-201]. En *S. cereviciae* también se ha descripto la presencia del

CPC, con la diferencia de que éste está compuesto sólo por homólogos de INCENP, Aurora B y Survivina [202]. Dentro de este complejo la Aurora B sólo interacciona con INCENP y lo hace a través de su región N-terminal [142]. Al realizar los alineamientos de a pares de las TcAUKs con las proteínas Aurora de otros organismos hemos observado que la región N-terminal presenta una alta divergencia, mientras que la C-terminal catalítica es la más conservada (Sección 2.3 de resultados). El hecho que la región con mayor divergencia sea la N-terminal, mediante la cual las Auroras establecen interacciones con otras proteínas, probablemente sea un reflejo de la formación de diferentes complejos entre los distintos organismos. Esta diferencia en la conformación de los complejos denota la especificidad de la regulación, que se adapta a las necesidades particulares de cada especie. Las TcAUKs no escapan a esta observación ya que estas proteínas fueron incapaces de complementar la función de Ipl1 en levaduras mutantes termosensibles (sección 2.3 de Resultados). Este resultado negativo no fue inesperado ya que en trabajos con Auroras de otros organismos tampoco lograron una complementación funcional de Ipl1. Solamente Bishchoff y colaboradores obtuvieron una complementación parcial cuando construyeron una quimera conformada por el extremo C-terminal catalítico de la Aurora A humana y la región N-terminal de la propia Ipl1 [141]. En *T. brucei,* se ha descripto que la Aurora quinasa 1 conforma un complejo con dos proteínas (CPC-1 y CPC-2) que no poseen ninguna similitud de secuencia con los componentes del CPC en otros organismos [175]. En este mismo trabajo, los autores reportan la presencia de los genes homólogos de CPC-1 y -2 tanto en *T. cruzi* como en *Leishmania*, por lo que es posible que TcAUK1 también conforme un complejo funcional con estas proteínas.

Las proteínas Aurora quinasas son enzimas regulatorias involucradas en procesos celulares muy sensibles. Esto hace que se encuentren bajo una estricta regulación que le imprime tres características al perfil de expresión de estos genes: i) son genes que sólo se expresan durante la mitosis celular, es decir durante una ventana temporal acotada; ii) los niveles de proteína son considerablemente bajos, incluso durante su pico de expresión; iii) las proteínas Aurora quinasas son blanco de distintas modificaciones post-traduccionales que influyen tanto es su estado de actividad como en su estabilidad. Estos tres rasgos de la expresión de los genes Aurora quinasas podrían ser en parte la explicación de lo complejo que resultó ser el estudio del perfil de expresión de los genes TcAUKs. A nivel de transcripto se detectó que los tres genes TcAUKs se expresan en la forma epimastigote (Figura 7 de Resultados) y que a su vez muestran variaciones en la expresión entre las distintas formas que adopta el parásito a lo largo de su ciclo de vida (Figura 8 de Resultados). Considerando que la regulación de la expresión génica en kinetoplástidos se da casi exclusivamente a nivel post-transcripcional, el análisis más relevante del perfil de expresión de las TcAUKs se enfocó en los niveles de proteínas detectados por medio de ensayos de Western blot (Figura 10 de Resultados). Mediante estos ensayos se detectó a TcAUK1 y TcAUK3 en las tres formas del parásito, mientras que TcAUK2 sólo fue detectada en epimastigotes. Un rasgo común

entre los resultados obtenidos en los Western blot para las tres TcAUKs es el mayor peso molecular de las bandas detectadas respecto al esperado según los datos obtenidos de la base a los datos del Proyecto Genomas de *T. cruzi*. TcAUK1, cuyo peso molecular teórico es de 35,3 Da, es detectada en las tres formas del parásito como una banda de PM un poco superior a los 40 kDa. En vista de esto se consideró la posibilidad de que en la base de datos del Proyecto Genoma de *T. cruzi* el marco de lectura correspondiente a este gen presente algún error y que en realidad el gen sea de mayor longitud. Por consiguiente se analizó la posición del ATG iniciador a partir de la amplificación del fragmento 5' del ADN copia obtenido en la RT-PCR (Figura 8 de Resultados), y también se amplificó la región 3' con parte de la región intergénica inmediatamente *downstream* a partir de ADN genómico. En ambos casos se confirmó la correcta lectura del marco abierto de lectura presente en el Proyecto Genoma, por lo que descartamos la posibilidad de que la proteína sea de un PM mayor al esperado. El perfil de banda que se observa en el ensayo de Western muestra un "chorreado" que se inicia en el PM teórico de la TcAUK1, lo que podría estar indicando una modificación covalente estable sobre esta enzima. Para el caso de TcAUK2 y TcAUK3, en el Western blot se detectaron más de una banda -dos bandas para TcAUK2 y tres bandas para TcAUK3- y ninguna se corresponde con el PM esperado para las proteínas, que en el caso de TcAUK2 es de 46 kDa y para TcAUK3 57 kDa. En ambos casos todas las bandas detectadas mostraron un PM superior al esperado, mostrando algunas bandas una diferencia superior a los 20 kDa respecto al valor teórico. Para tratar de comprender este fenómeno de alteración del PM aparente para las tres TcAUKs, planteamos la hipótesis que las TcAUKs presentan alguna modificación post-traduccional que modifica la corrida electroforética. Entre las modificaciones post-traduccionales que sufren los genes Aurora la principal es la fosforilación, pero la gran diferencia en el PM de las bandas detectadas respecto al de las esperadas hace que descartemos la posibilidad de que esta modificación sea la causante del fenómeno observado. Otras modificaciones post-traduccionales descriptas para estos genes son la ADP-ribosilación [203] y la SUMOilación [204], e incluso ambos tipo de modificación están descriptos en *T. cruzi* [205, 206]. El aspecto que muestran estas modificaciones en un ensayo de Western blot es bien distinto. La ADP-ribosilación consiste en la adhesión de polímeros de ADP-ribosa de longitudes variables en residuos ácidos. Esta variabilidad de longitud de los polímeros se detecta en Western blot como un chorreado continuo con un rango acotado de PM, y este es el aspecto de las bandas que se observan en el Western blot realizado contra TcAUK1. Los polímeros de ADP-ribosa son degradados por una enzima específica denominada Poli-ADP-ribosa glicosilasa (PARG). Para evaluar si la modificación en TcAUK1 se trataba de una ADP-ribosilación, se realizó un ensayo *in vitro* en el cual extracto total de *T. cruzi* fue incubado con la enzima PARG. En el ensayo de Western blot (revelado con anticuerpo anti TcAUK1) la banda mostró una leve variación en su corrida, ubicándose apenas por debajo de la banda detectada en un extracto no tratado con PARG. Este resultado no nos permite atribuir la diferencia de PM observado respecto al teórico a la presencia de polímeros de ADP-

ribosa unidos a TcAUK1. La SUMOilación de una proteína corresponde a la adhesión de un polipéptido, que en *T. cruzi* posee una longitud de 107 aminoácidos, a residuos lisina en el contexto de un motivo consenso altamente conservado (ψKXE, donde ψ corresponde a un residuo hidrofóbico y X puede ser cualquier residuo) [207]. Una proteína determinada puede poseer más de uno de estos motivos y por tanto se le pueden agregar más de un polipéptido SUMO. Sin embargo, el hecho de que los polipéptidos posean una longitud fija hace que esta modificación se detecte en un ensayo de Western blot como una banda discreta, y en el caso de proteínas con más de un sitio de SUMOilación el número de bandas puede ser múltiple. Este es el perfil que se observa en los ensayos de Western blot de TcAUK2 y 3, por lo que existe la posibilidad que estas proteínas puedan ser blanco de SUMOilación. Al analizar las secuencias proteicas de las tres TcAUKs para la presencia de motivos consenso de SUMOilacion con el software *SUMOPlot™ Analysis Program* (http://www.abgent.com/sumoplot), fue detectado un motivo con alto *score* en TcAUK1 y tres motivos con alto *score* en TcAUK2 y TcAUK3. Al ubicar estos motivos en el alineamiento múltiple de secuencia entre las TcAUKs y las Aurora quinasas de organismos modelo (Figura 5 de Resultados) se observó que la lisina del único motivo de TcAUK1 junto a la de uno de los motivos de las TcAUK2 y TcAUK3 se encuentran en una posición altamente conservada. Incluso estos mismos dominios de las TcAUKs se alinean con el motivo de SUMOilación identificado en la Aurora B humana. Estos datos respaldan la idea de que las TcAUKs puedan estar modificadas por SUMOilación. Acorde a esta hipótesis, la detección de más de una banda en los ensayos de Western blot para las TcAUK2 y 3 puede ser el reflejo de que estas proteínas presenten modificaciones en más de uno de los sitios predichos para SUMOilación. Esta diferencia entre el valor teórico y el encontrado también se observó en el PM del único gen Aurora quinasa de *D. discoideum* [169], el cual paradójicamente también posee un sitio potencial de SUMOilación. Considerando que los genes Aurora poseen una estricta regulación de su expresión, la no detección por Western blot de TcAUK2 en las formas amastigote y tripomastigote no permite concluir que esta proteína no se exprese en estas formas del parásito. Teniendo en cuenta que el Western blot se realizó sobre extractos proteicos obtenidos a partir de una población de células asincrónicas, es posible que proteínas con regulación temporal de su expresión no sean detectadas mediante esta técnica. Este limitante puede ser subsanado al enfocar el análisis en células individuales. De esta manera, en estudios de inmunofluorescencia vimos que TcAUK2 muestra una expresión heterogénea tanto en tripomastigotes como en amastigotes. En la forma tripomastigote se detectaron células con altos niveles de expresión en donde la proteína se localizaba por todo el citoplasma, mientras que otras células presentaban niveles más bajos de proteína con una localización más puntual (Figura 23 de Resultados). En amastigotes la diferencia no fue tan notoria, pero también se pudieron distinguir células con todo el citoplasma marcado y otras células con una localización más puntual de la proteína (Figura 24 A). Todas estas observaciones respaldan la idea de que TcAUK2 posee una regulación espacio-temporal de su

expresión, pudiendo ser la causa de la imposibilidad de detectar la proteína por medio de un ensayo de Western blot.

Para el estudio funcional de las TcAUKs se comenzó analizando sus localizaciones subcelulares en las distintas formas del parásito. Como primera aproximación se expresaron las distintas TcAUKs fusionadas a GFP en epimastigotes. A pesar de la baja proporción de células con señal positiva para la fusión en cada caso, esta estrategia nos permitió obtener conclusiones preliminares de importancia. Para TcAUK1 se determinó su localización nuclear y para TcAUK2 se observó su ubicación en la región del cuerpo basal (Figuras 13 y 22 de resultados). La poca proporción de células fluorescentes en cultivos transfectados con las fusiones, comparado a la alta proporción en cultivos transfectados con GFP sola, nos da un indicio de la fuerte regulación a la cual está expuesta la expresión de las proteínas TcAUKs. Este hecho mostró su lado más extremo en el caso de TcAUK3, que con tres eventos de transfección distintos nunca fue posible encontrar una célula con expresión de la fusión. Ante este panorama, y con la obtención de los anticuerpos específicos para cada una de las TcAUKs, se realizó el análisis de la localización de las proteínas por ensayos de inmunolocalización. Junto con su localización subcelular, el estudio funcional de las TcAUKs se complementó con la generación de epimastigotes transgénicos con sobreexpresión de cada una de estas enzimas. Las alteraciones fenotípicas en estas células sobreexpresantes más la localización de las proteínas, tanto en células transfectantes como en células WT, conforman los datos cruciales que nos permitieron establecer los posibles roles de estas proteínas en la biología del parásito.

La proteína TcAUK1 muestra una localización variable en las formas replicativas del parásito (epimastigotes y amastigotes). En epimastigotes sigue un patrón de localización ordenado que se corresponde con la progresión del ciclo celular, mostrando un comportamiento dinámico durante la división de la célula. El perfil de localización que se observa durante esta fase del ciclo es similar al descripto para la Aurora quinasa 1 de *T. brucei* [173] y lo observado para la Aurora B [118]. Esto demuestra que de los tres genes Aurora de *T. cruzi*, TcAUK1 es el homólogo de la Aurora B de humanos. La localización de TcAUK1 en interfase de epimastigotes es la misma que se observó en las formas tripomastigote y en amastigotes. En estos últimos la marca observada para esta proteína parece corresponder a los *antipodal sites* adyacentes al kinetoplasto, aunque esto tendría que ser confirmado por estudios de co-localización. Esta localización difiere de lo observado en la forma procíclica de *T. brucei*, en los cuales la Aurora quinasa 1 se localiza en el núcleo durante la interfase [173]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la localización de la Aurora quinasa 1 en *T. brucei* fue determinada en células que sobreexpresaban a la proteína fusionada al tag de HA y con un anticuerpo primario anti HA, lo que no permite detectar a la proteína endógena. Algo similar observamos nosotros cuando sobreexpresamos TcAUK1 en epimastigotes, donde la proteína se localiza en el núcleo durante la interfase (Figuras 33 y 34 de resultados). El hecho que la

sobreexpresión de TcAUK1 provoque su localización nuclear puede significar que los mayores niveles de esta proteína sea uno de los factores que determinen su ubicación, y que en condiciones salvajes la localización nuclear que adquiere en la mitosis sea en parte consecuencia de aumentos en los niveles de expresión. Para evaluar esta hipótesis hemos analizado los niveles de TcAUK1 en las distintas fases del ciclo celular en epimastigotes sincronizados mediante ensayos de Western blot, pero no se pudo determinar una diferencia significativa en la cantidad de proteína entre las distintas fases. La localización nuclear de TcAUK1 en epimastigotes sobreexpresantes se corresponde con la pérdida parcial de su ubicación en los extremos del kinetoplasto. En cuanto al comportamiento que muestra esta proteína durante la mitosis se pude observar que es el mismo tanto en epimastigotes WT como en los sobreexpresantes (Figuras 18 y 34). De modo que la única alteración en la localización de la proteína cuando es sobreexpresada es su localización nuclear y su deslocalización de los extremos del kinetoplasto durante la interfase. Este patrón de localización de TcAUK1 en epimastigotes sobreexpresantes tiene una fuerte relación con el fenotipo observado en estas células. En metazoos la Aurora B es capaz de fosforilar a las histonas, y particularmente la fosforilación de la histona H3 por esta enzima se asocia a un mayor grado de compactación de la cromatina [208]. Es posible que los mayores grados de compactación de la cromatina observados en epimastigotes sobeexpresantes sea consecuencia de los altos niveles de TcAUK1 dentro del núcleo. Si bien no hemos podido comprobar que la TcAUK1 recombinante fosforile a la histona H3 de *T. cruzi* también recombinante, por medio de ensayos quinasas *in vitro*, no se puede descartar que *in vivo* esto sí suceda o bien que alguna otra histona sea el sustrato endógeno de TcAUK1. El otro efecto fenotípico detectado en epimastigotes pTREX-TcAUK1 es el retraso que muestran en la progresión de las fases G2 y M del ciclo celular. Durante estas dos fases se produce la duplicación de las distintas organelas y estructuras que posteriormente serán heredadas por las células hijas. Los tripanosomátidos muestran una secuencia ordenada de duplicación de estas estructuras, que en epimastigotes de *T. cruzi* viene dada por: duplicación del flagelo, segregación del kinetoplasto y mitosis nuclear. Al analizar en epimastigotes sincronizados la progresión temporal de estos eventos observamos que células pTREX-TcAUK1 mostraron un retraso en la duplicación del kinetoplasto (Figura 32). Por otra parte, en una alta proporción de parásitos no hemos detectado la localización de TcAUK1 en los extremos del kinetoplasto. Es posible que la localización subcelular de esta enzima sea dosis dependiente, y que a los altos niveles alcanzados por la sobreexpresión provoque que esta proteína localice en el núcleo en detrimento de su localización en el kinetoplasto. Estos dos datos, en cuanto al retraso en el tiempo de duplicación del kinetoplasto junto a la baja disponibilidad de TcAUK1 en esta misma organela de los epimastigotes TcAUK1, nos lleva a sugerir un posible rol de esta enzima en el proceso de división del kinetoplasto durante la fase G2 del ciclo celular. Sin embargo, esta no es la única función que estaría realizando la enzima ya que como vimos anteriormente estaría involucrada en la mitosis nuclear. Otro rol

atribuible a la TcAUK1 en base a lo observado en la Figura 34 es una posible participación en la escisión celular hacia el final de la citoquinesis.

A diferencia de TcAUK1, a la cual fue posible relacionar de forma precisa con la función que cumplen los genes Aurora en otros organismos, las proteínas TcAUK2 y 3 parecen mostrar funciones más específicas para los organismos Tripanosomátidos. En este sentido, si bien ortólogos a estos genes fueron estudiados en *T. brucei* [173] e identificados en *P. falciparum* [171], hasta el momento no se había podido determinar el rol que estas proteínas cumplen en la biología de estos organismos. El estudio realizado en las Auroras quinasas 2 y 3 de *T. brucei* se basó en el silenciamiento de ambos genes por ARNi, no detectándose fenotipo aparente. En contraposición, el enfoque adoptado en este trabajo fue la sobreexpresión de TcAUK2 y 3, que junto con estudios de localización subcelular nos permitió alcanzar las primeras evidencias de la función de estas enzimas en Tripanosomátidos.

Teniendo en cuenta las coincidencias en varios aspectos relacionados a la localización que muestran estas proteínas y al fenotipo de epimastigotes sobreexpresantes, es que se procederá a un análisis en conjunto de los resultados obtenidos para ambas. Ambas proteínas muestran una localización puntual en la región de la base del flagelo, la cual no mostró variaciones entre las distintas formas del parásito (Figuras 24, 25, 26 y 27 de Resultados). Esta región está conformada por estructuras citoesqueléticas interconectadas e involucradas en la morfogénesis y segregación de las organelas durante la división celular. Ensayos de inmunofluorescencias en epimastigotes fijados con metanol resultaron ser positivas para ambas proteínas, lo que indica que estas se encuentran asociadas a estructuras citoesqueléticas, sin embargo su grado de asociación a las estructuras citoesqueléticas es diferente. TcAUK3 mostró una fuerte asociación a estas estructuras, evidenciada por su permanencia en extracciones citoesqueléticas (Figura 28 de Resultados). Mientras que TcAUK2 no quedó retenida luego de las extracciones, reflejando una asociación más débil de esta proteína al citoesqueleto. Los epimastigotes transfectados con estas enzimas mostraron un fenotipo severo que comprometía la viabilidad celular. Atribuible a esto es el hecho que sólo uno de de los clones recuperados a partir de la población original para cada una de estas proteínas haya mostrado bajos niveles de sobreexpresión, que además se fueron perdiendo en repiques sucesivos. Este efecto condicionó el estudio de los fenotipos resultantes de la sobreexpresión, y lo mostrado en este trabajo corresponde a los cultivos inmediatos posteriores a la obtención de los clones. Si bien el fenotipo preponderante en ambos transfectantes fue alteraciones en el contenido de ADN celular, lo observado permite hacer una distinción entre ambos sobreexpresantes. En epimastigotes pTREX-TcAUK2 el fenotipo más llamativo fue la presencia de células que no presentaban señal cuando se realizó la inmunofluorescencia contra β-tubulina (Figura 38 de Resultados), sugiriendo la ausencia en las mismas de fibras de microtúbulos. Considerando que la forma celular en tripanosomátidos se encuentra determinada por la presencia

del corset subpelicular, la morfología redondeada de algunas células sobreexpresantes (Figura 37 B y Figura 38) es otra fuerte evidencia de alteración en la organización de estructuras microtubulares. Otros fenotipos observados en estos parásitos son alteraciones con aberraciones del contenido de ADN como consecuencia de una segregación desbalanceada del material genético. Una de estas aberraciones son células con miniestructuras de ADN, que estarían siendo originadas como consecuencia del ensamblado de husos mitóticos multipolares. Otra alteración en la carga génica la muestran células con número aberrante de núcleo y kinetoplasto (0N1K y 2N1K). La aparición de estas células también puede ser explicado por alteraciones en la dinámica de los microtúbulos, cuya función durante la división celular es la de posicionar a los núcleos y los kinetoplastos para garantizar que ambas células hijas hereden su correspondiente carga génica. El fenotipo mostrado por los epimastigotes pTREX-TcAUK3, si bien también muestra alteraciones en cuanto a la carga genética y la morfología de la célula, es levemente diferente al que muestran las células sobreexpresantes de TcAUK2. En cuanto al contenido génico, lo que caracteriza a las células sobreexpresantes de TcAUK3 es la alta poliploidia. Esta se observa de dos formas: células multinucleadas y células con un voluminoso agregado nuclear (Figuras 42 A, 43 I, 44 y 45 de Resultados). Mientras que las células multinucleadas se originan a partir de múltiples rondas de división nuclear en células que poseen bloqueada la citoquinesis, la presencia de un agregado nuclear refleja sucesivas rondes de replicación del ADN dentro de núcleos que no pueden dividirse. De esta forma, la sobreexpresión de TcAUK3 parece estar provocando la aparición de dos fenotipos contradictorios, mientras unas células son capaces de sufrir mitosis nuclear otras muestran bloqueado este proceso. Si se observa la morfología de ambos tipos celulares se puede apreciar que si bien ambas poseen tamaños gigantes, las células multinucleadas conservan la forma típica de epimastigote (Figura 45 I), mientras que las células con el agregado nuclear perdieron la morfología de epimastigote y muestran una desorganización de su citoesqueleto (Figura 43 I). De esta forma, es posible que en las células con el agregado nuclear lo que suceda es que no se forme el huso mitótico por una alteración en la dinámica de los microtúbulos y que por tanto los cromosomas no sean segregados. Desde un punto de vista morfológico, es llamativa la presencia de células que parecen en proceso de citoquinesis y que presentan el surco de división en la mitad posterior de la célula. En células WT el surco de división ingresa desde el extremo anterior de la célula, en la región entre los dos flagelos, y se extiende hacia el extremo posterior para producir la división de las dos células hijas. Lo observado en células sobreexpresantes de TcAUK3 sugiere un cambio de polaridad en la formación del surco de división, que sin embargo parece no poder extenderse a lo largo de toda la célula. De esta forma, el efecto fenotípico principal de la sobreexpresión de TcAUK2 y 3 parece ser la alteración en la dinámica de los microtúbulos. Todos los eventos principales que suceden durante las fases G2 y M del ciclo (segregación de los kinetoplastos, duplicación del cuerpo basal, crecimiento del axonema flagelar, mitosis y citoquinesis) dependen de la polimerización y despolimerización de los microtúbulos. Si bien ambas

proteínas afectan la dinámica de los microtúbulos, el fenotipo morfológico de las células sobreexpresantes permite diferenciar los procesos celulares que se ven afectados por la sobreexpresión de cada una de estas enzimas. El efecto de la sobreexpresión de TcAUK2 parece estar dirigido hacia el ciclo de división del núcleo y por esto el fenotipo preponderante de los sobreexpresantes es el de células con fallas en la segregación de la cromatina. Mientras que TcAUK3 parece actuar sobre el ciclo de división del kinetoplasto, lo que se ve reflejado en células con esta organela fragmentada y con tipos morfológicos que se corresponden a células con imposibilidad de concretar la citoquinesis.

El objetivo original de este trabajo fue el de iniciar el estudio de una familia de proteínas que hipotéticamente podrían desarrollar un rol relevante durante la progresión del ciclo celular de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos establecen una sólida base a partir de la cual se deberá profundizar los estudios para poder comprender cabalmente la función específica de este grupo de enzimas en la biología de este parásito. De las tres proteínas estudiadas, es sobre TcAUK1 donde se obtuvo evidencia más fuerte sobre su funcionalidad. Esta proteína mostró ser la homóloga funcional de la Auora quinasa B de humanos, aunque también parece estar involucrada en un proceso exclusivo de organismos kinetoplástidos como es precisamente la división del kinetoplasto. Por otra parte, las proteínas TcAUK2 y TcAUK3 parecen ser los miembros de la familia con una función más específica de la biología de tripanosomátidos. Sin embargo, los resultados obtenidos aquí respecto a estas proteínas son bastante parciales y un trabajo más exahustivo será necesario para lograr determinas la funcionalidad de ambas enzimas durante el ciclo de vida de *T. cruzi*.

Bibliografía

1 Aufderheide, A.C.*, et al.* (2004) **A 9,000-year record of Chagas' disease**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2034-2039

2 Chagas, C. (1909) **Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfolojía e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolójico de nova entidade morbida do homen**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1, 159-218

3 WHO (2002) **Control of Chagas disease. Second report of the WHO expert Committee**. (905, T.r.s.n., ed), World Health Organization

4 Zeledon, R. and Rabinovich, J.E. (1981) **Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors**. *Annual review of entomology* 26, 101-133

5 Deane, L.M. (1964) **Animal Reservoirs of Trypanosoma Cruzi in Brazil**. *Revista brasileira de malariologia e doencas tropicais. Publicacoes avulsas* 16, 27-48

6 Russomando, G.*, et al.* (1998) **Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction**. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59, 487-491

7 Schmunis, G.A. (1999) **Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 93-101

8 Rassi, A., Jr.*, et al.* (2010) **Chagas disease**. *Lancet* 375, 1388-1402

9 Macedo, A.M.*, et al.* (2004) **Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 1-12

10 Teixeira, A.R.*, et al.* (2006) **Evolution and pathology in chagas disease--a review**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 463-491

11 Pinto Dias, J.C. (1995) **[Natural history of Chagas disease]**. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 65, 359-366

12 Rassi, A., Jr.*, et al.* (2000) **Chagas' heart disease**. *Clinical cardiology* 23, 883-889

13 WHO, U.W.B. (1991) **Special Programme for Research and Training in Tropical Disease**. In *Eleventh Programme Report*

14 WHO/TDR (2006) **Report of the Scientific Working Group on Chagas disease**. World Health Organization

15 Schmunis, G.A. (2007) **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 75-85

16 Stevens, J.R. (2008) **Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes**. *Parasite* 15, 226-232

17 Hoare, C.A. (1972) ***The trypanosomes of mammals: a zoological monograph***.

18 Matthews, K.R. (2005) **The developmental cell biology of Trypanosoma brucei**. *Journal of cell science* 118, 283-290

19 Brisse, S.*, et al.* (2000) **Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers**. *Molecular and biochemical parasitology* 111, 95-105

20 Zingales, B.*, et al.* (2009) **A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054

21 Zingales, B.*, et al.* (2012) **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications**. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 240-253

22 Paulin, J.J. (1975) **The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy**. *The Journal of cell biology* 66, 404-413

23 Simpson, L. (1986) **Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates**. *International review of cytology* 99, 119-179

24 Klingbeil, M.M. and Englund, P.T. (2004) **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4333-4334

25 Lukes, J.*, et al.* (2002) **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure**. *Eukaryotic cell* 1, 495-502

26 De Souza, W. (2002) **Basic cell biology of Trypanosoma cruzi**. *Current pharmaceutical design* 8, 269-285

27 De Souza, W. (2002) **From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality**. *Kinetoplastid biology and disease* 1, 3

28 Souza, W. (2009) **Structural organization of Trypanosoma cruzi**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 89-100

29 Opperdoes, F.R. (1987) **Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes**. *Annual review of microbiology* 41, 127-151

30 Docampo, R.*, et al.* (2005) **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man**. *Nature reviews. Microbiology* 3, 251-261

31 Montalvetti, A.*, et al.* (2004) **A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of Trypanosoma cruzi**. *The Journal of biological chemistry* 279, 38673-38682

32 Webster, P. and Russell, D.G. (1993) **The flagellar pocket of trypanosomatids**. *Parasitol Today* 9, 201-206

33 Soares, M.J.*, et al.* (1992) **Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon Trypanosoma cruzi**. *Journal of cell science* 102 (Pt 1), 157-167

34 Teixeira, D.E., *et al.* (2012) **Interactive multimedia to teach the life cycle of Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease**. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1749

35 Simpson, L., *et al.* (2000) **Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6986-6993

36 Martinez-Calvillo, S., *et al.* (2003) **Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region**. *Molecular cell* 11, 1291-1299

37 Liang, X.H., *et al.* (2003) **trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation**. *Eukaryotic cell* 2, 830-840

38 Glover, L. and Horn, D. (2006) **Repression of polymerase I-mediated gene expression at Trypanosoma brucei telomeres**. *EMBO reports* 7, 93-99

39 Hartmann, C., *et al.* (1998) **Effect of multiple downstream splice sites on polyadenylation in Trypanosoma brucei**. *Molecular and biochemical parasitology* 93, 149-152

40 Siegel, T.N., *et al.* (2005) **Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in Trypanosoma brucei**. *Molecular and cellular biology* 25, 9586-9594

41 Clayton, C. and Shapira, M. (2007) **Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias**. *Molecular and biochemical parasitology* 156, 93-101

42 Berriman, M., *et al.* (2005) **The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei**. *Science* 309, 416-422

43 El-Sayed, N.M., *et al.* (2005) **The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease**. *Science* 309, 409-415

44 Ivens, A.C., *et al.* (2005) **The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major**. *Science* 309, 436-442

45 Johnston, D.A., *et al.* (1999) **Genomics and the biology of parasites**. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 21, 131-147

46 Martinez-Calvillo, S., *et al.* (2010) **Gene expression in trypanosomatid parasites**. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 525241

47 Daniels, J.P., *et al.* (2010) **Cell biology of the trypanosome genome**. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74, 552-569

48 Alsford, S. and Horn, D. (2004) **Trypanosomatid histones**. *Molecular microbiology* 53, 365-372

49 Galanti, N., *et al.* (1998) **Histone genes in trypanosomatids**. *Parasitol Today* 14, 64-70

50 Elias, M.C., *et al.* (2001) **Transcription rate modulation through the Trypanosoma cruzi life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation**. *Molecular and biochemical parasitology* 112, 79-90

51 Ogbadoyi, E.*, et al.* (2000) **Architecture of the Trypanosoma brucei nucleus during interphase and mitosis**. *Chromosoma* 108, 501-513

52 Hecker, H. and Gander, E.S. (1985) **The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes**. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 53, 199-208

53 Robinson, D.R. and Gull, K. (1991) **Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle**. *Nature* 352, 731-733

54 Spadiliero, B.*, et al.* (2002) **Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of Trypanosoma cruzi**. *Journal of cellular biochemistry* 84, 832-839

55 Spadiliero, B.*, et al.* (2002) **Chromatin of Trypanosoma cruzi: in situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization**. *Journal of cellular biochemistry* 85, 798-808

56 Burri, M.*, et al.* (1993) **Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic Trypanosoma brucei brucei**. *Parasitology research* 79, 649-659

57 Elias, M.C.*, et al.* (2002) **Chromosome localization changes in the Trypanosoma cruzi nucleus**. *Eukaryotic cell* 1, 944-953

58 Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) **The language of covalent histone modifications**. *Nature* 403, 41-45

59 Sullivan, W.J., Jr.*, et al.* (2006) **Histones and histone modifications in protozoan parasites**. *Cellular microbiology* 8, 1850-1861

60 Janzen, C.J.*, et al.* (2006) **Unusual histone modifications in Trypanosoma brucei**. *FEBS letters* 580, 2306-2310

61 Sherwin, T. and Gull, K. (1989) **The cell division cycle of Trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations**. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 323, 573-588

62 Gull, K. (1999) **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites**. *Annual review of microbiology* 53, 629-655

63 Bastin, P.*, et al.* (1998) **Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility**. *Nature* 391, 548

64 Lacomble, S.*, et al.* (2009) **Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography**. *Journal of cell science* 122, 1081-1090

65 Ogbadoyi, E.O.*, et al.* (2003) **A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes**. *Molecular biology of the cell* 14, 1769-1779

66 Taylor, A.E. and Godfrey, D.G. (1969) **A new organelle of bloodstream salivarian trypanosomes**. *The Journal of protozoology* 16, 466-470

67 Rocha, G.M.*, et al.* (2006) **The flagellar attachment zone of Trypanosoma cruzi epimastigote forms**. *Journal of structural biology* 154, 89-99

68 Fridberg, A.*, et al.* (2007) **Flagellar membrane trafficking in kinetoplastids**. *Parasitology research* 100, 205-212

69 He, C.Y.*, et al.* (2005) **Golgi duplication in Trypanosoma brucei requires Centrin2**. *Science* 310, 1196-1198

70 Esson, H.J.*, et al.* (2012) **Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure**. *Eukaryotic cell* 11, 761-772

71 McKean, P.G. (2003) **Coordination of cell cycle and cytokinesis in Trypanosoma brucei**. *Current opinion in microbiology* 6, 600-607

72 Elias, M.C.*, et al.* (2007) **Morphological events during the Trypanosoma cruzi cell cycle**. *Protist* 158, 147-157

73 Hammarton, T.C. (2007) **Cell cycle regulation in Trypanosoma brucei**. *Molecular and biochemical parasitology* 153, 1-8

74 Wheeler, R.J.*, et al.* (2011) **The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology**. *Molecular microbiology* 79, 647-662

75 Moreira-Leite, F.F.*, et al.* (2001) **A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division**. *Science* 294, 610-612

76 Lacomble, S.*, et al.* (2010) **Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in Trypanosoma brucei**. *Journal of cell science* 123, 2884-2891

77 Absalon, S.*, et al.* (2008) **Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes**. *Molecular biology of the cell* 19, 929-944

78 Kohl, L.*, et al.* (2003) **Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes**. *The EMBO journal* 22, 5336-5346

79 Robinson, D.R.*, et al.* (1995) **Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle**. *The Journal of cell biology* 128, 1163-1172

80 Vaughan, S. and Gull, K. (2003) **The trypanosome flagellum**. *Journal of cell science* 116, 757-759

81 Jensen, R.E. and Englund, P.T. (2012) **Network news: the replication of kinetoplast DNA**. *Annual review of microbiology* 66, 473-491

82 Carpenter, L.R. and Englund, P.T. (1995) **Kinetoplast maxicircle DNA replication in Crithidia fasciculata and Trypanosoma brucei**. *Molecular and cellular biology* 15, 6794-6803

83 Morris, J.C.*, et al.* (2001) **Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium**. *International journal for parasitology* 31, 453-458

84 Li, C. and Englund, P.T. (1997) **A mitochondrial DNA primase from the trypanosomatid Crithidia fasciculata**. *The Journal of biological chemistry* 272, 20787-20792

85 Klingbeil, M.M.*, et al.* (2002) **Multiple mitochondrial DNA polymerases in Trypanosoma brucei**. *Molecular cell* 10, 175-186

86 Liu, B.*, et al.* (2005) **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA**. *Trends in parasitology* 21, 363-369

87 Perez-Morga, D.L. and Englund, P.T. (1993) **The attachment of minicircles to kinetoplast DNA networks during replication**. *Cell* 74, 703-711

88 Perez-Morga, D. and Englund, P.T. (1993) **The structure of replicating kinetoplast DNA networks**. *The Journal of cell biology* 123, 1069-1079

89 Gluenz, E.*, et al.* (2011) **The kinetoplast duplication cycle in Trypanosoma brucei is orchestrated by cytoskeleton-mediated cell morphogenesis**. *Molecular and cellular biology* 31, 1012-1021

90 Ersfeld, K. and Gull, K. (1997) **Partitioning of large and minichromosomes in Trypanosoma brucei**. *Science* 276, 611-614

91 Solari, A.J. (1980) **The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in Trypanosoma cruzi**. *Chromosoma* 78, 239-255

92 Solari, A.J. (1995) **Mitosis and genome partition in trypanosomes**. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al* 19, 65-84

93 Vickerman, K. and Preston, T.M. (1970) **Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes**. *Journal of cell science* 6, 365-383

94 Gull, K.*, et al.* (1998) **Segregation of minichromosomes in trypanosomes: implications for mitotic mechanisms**. *Trends in microbiology* 6, 319-323

95 Hammarton, T.C.*, et al.* (2005) **Trypanosoma brucei MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis**. *Molecular microbiology* 56, 104-116

96 Rothberg, K.G.*, et al.* (2006) **The RACK1 homologue from Trypanosoma brucei is required for the onset and progression of cytokinesis**. *The Journal of biological chemistry* 281, 9781-9790

97 Ralston, K.S. and Hill, K.L. (2008) **The flagellum of Trypanosoma brucei: new tricks from an old dog**. *International journal for parasitology* 38, 869-884

98 Shackelford, R.E.*, et al.* (1999) **Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress**. *Environmental health perspectives* 107 Suppl 1, 5-24

99 Nigg, E.A. (2001) **Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints**. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 21-32

100 Alberts, B.J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K; Walter, P. (2008) ***Molecular Biology of the Cell***. Garland Science, Taylor & Francis Group

101 Hammarton, T.C.*, et al.* (2003) **Stage-specific differences in cell cycle control in Trypanosoma brucei revealed by RNA interference of a mitotic cyclin**. *The Journal of biological chemistry* 278, 22877-22886

102 Hammarton, T.C., *et al.* (2004) **The Trypanosoma brucei cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology**. *The Journal of biological chemistry* 279, 24757-24764

103 Li, Z. and Wang, C.C. (2003) **A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of the procyclic form of Trypanosoma brucei**. *The Journal of biological chemistry* 278, 20652-20658

104 Potenza, M., *et al.* (2012) **Functional characterization of TcCYC2 cyclin from Trypanosoma cruzi**. *Experimental parasitology* 132, 537-545

105 Gomez, E.B., *et al.* (1998) **Cloning of a cdc2-related protein kinase from Trypanosoma cruzi that interacts with mammalian cyclins**. *Molecular and biochemical parasitology* 91, 337-351

106 Li, Z. (2012) **Regulation of the cell division cycle in Trypanosoma brucei**. *Eukaryotic cell* 11, 1180-1190

107 Murray, A.W. (1992) **Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls**. *Nature* 359, 599-604

108 Ploubidou, A., *et al.* (1999) **Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis**. *Journal of cell science* 112 (Pt 24), 4641-4650

109 Glover, D.M., *et al.* (1995) **Mutations in Aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles**. *Cell* 81, 95-105

110 Chan, C.S. and Botstein, D. (1993) **Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast**. *Genetics* 135, 677-691

111 Petersen, J., *et al.* (2001) **The S. pombe Aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation**. *Journal of cell science* 114, 4371-4384

112 Giet, R., *et al.* (1999) **The Xenopus laevis centrosome Aurora/Ipl1-related kinase**. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 91, 461-470

113 Reich, A., *et al.* (1999) **Cloning, mapping, and expression of ial, a novel Drosophila member of the Ipl1/Aurora mitotic control kinase family**. *DNA and cell biology* 18, 593-603

114 Roghi, C., *et al.* (1998) **The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly**. *Journal of cell science* 111 (Pt 5), 557-572

115 Schumacher, J.M., *et al.* (1998) **A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in Caenorhabditis elegans embryos**. *Development* 125, 4391-4402

116 Schumacher, J.M., *et al.* (1998) **AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in Caenorhabditis elegans embryos**. *The Journal of cell biology* 143, 1635-1646

117 Andrews, P.D., *et al.* (2003) **Mitotic mechanics: the Auroras come into view**. *Current opinion in cell biology* 15, 672-683

118 Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2003) **The cellular geography of Aurora kinases**. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 842-854

119 Crane, R.*, et al.* (2004) **Requirements for the destruction of human Aurora-A**. *Journal of cell science* 117, 5975-5983

120 Chen, S.H. and Tang, T.K. (2002) **Mutational analysis of the phosphorylation sites of the Aie1 (Aurora-C) kinase in vitro**. *DNA and cell biology* 21, 41-46

121 Walter, A.O.*, et al.* (2000) **The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation**. *Oncogene* 19, 4906-4916

122 Sen, S.*, et al.* (1997) **A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines**. *Oncogene* 14, 2195-2200

123 Dutertre, S.*, et al.* (2002) **On the role of Aurora-A in centrosome function**. *Oncogene* 21, 6175-6183

124 Hannak, E.*, et al.* (2001) **Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in Caenorhabditis elegans**. *The Journal of cell biology* 155, 1109-1116

125 Giet, R.*, et al.* (2002) **Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules**. *The Journal of cell biology* 156, 437-451

126 Berdnik, D. and Knoblich, J.A. (2002) **Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis**. *Current biology : CB* 12, 640-647

127 Terada, Y.*, et al.* (2003) **Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells**. *The Journal of cell biology* 162, 757-763

128 Vader, G. and Lens, S.M. (2008) **The Aurora kinase family in cell division and cancer**. *Biochimica et biophysica acta* 1786, 60-72

129 Kufer, T.A.*, et al.* (2002) **Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle**. *The Journal of cell biology* 158, 617-623

130 Tsai, M.Y.*, et al.* (2003) **A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly**. *Nature cell biology* 5, 242-248

131 Bayliss, R.*, et al.* (2003) **Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle**. *Molecular cell* 12, 851-862

132 Ferrari, S. (2006) **Protein kinases controlling the onset of mitosis**. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 781-795

133 van Vugt, M.A.*, et al.* (2004) **Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells**. *Molecular cell* 15, 799-811

134 Macurek, L.*, et al.* (2008) **Polo-like kinase-1 is activated by Aurora A to promote checkpoint recovery**. *Nature* 455, 119-123

135 Hutterer, A.*, et al.* (2006) **Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora**. *Developmental cell* 11, 147-157

136 Seki, A.*, et al.* (2008) **Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry**. *Science* 320, 1655-1658

137 Dutertre, S.*, et al.* (2004) **Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition**. *Journal of cell science* 117, 2523-2531

138 Krystyniak, A.*, et al.* (2006) **Inhibition of Aurora A in response to DNA damage**. *Oncogene* 25, 338-348

139 Floyd, S.*, et al.* (2008) **APC/C Cdh1 targets Aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase**. *Current biology : CB* 18, 1649-1658

140 van Leuken, R.*, et al.* (2009) **Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1**. *PloS one* 4, e5282

141 Bischoff, J.R.*, et al.* (1998) **A homologue of Drosophila Aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers**. *The EMBO journal* 17, 3052-3065

142 Ruchaud, S.*, et al.* (2007) **Chromosomal passengers: conducting cell division**. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 798-812

143 Lens, S.M.*, et al.* (2006) **Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres**. *Molecular biology of the cell* 17, 1897-1909

144 Jeyaprakash, A.A.*, et al.* (2007) **Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together**. *Cell* 131, 271-285

145 Ainsztein, A.M.*, et al.* (1998) **INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1**. *The Journal of cell biology* 143, 1763-1774

146 Montpetit, B.*, et al.* (2006) **Sumoylation of the budding yeast kinetochore protein Ndc10 is required for Ndc10 spindle localization and regulation of anaphase spindle elongation**. *The Journal of cell biology* 174, 653-663

147 Nakajima, Y.*, et al.* (2011) **Ipl1/Aurora-dependent phosphorylation of Sli15/INCENP regulates CPC-spindle interaction to ensure proper microtubule dynamics**. *The Journal of cell biology* 194, 137-153

148 Vong, Q.P.*, et al.* (2005) **Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin**. *Science* 310, 1499-1504

149 Tsukahara, T.*, et al.* (2010) **Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation**. *Nature* 467, 719-723

150 Wheatley, S.P.*, et al.* (2004) **Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo**. *The Journal of biological chemistry* 279, 5655-5660

151 Terada, Y.*, et al.* (1998) **AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis**. *The EMBO journal* 17, 667-676

152 Bishop, J.D. and Schumacher, J.M. (2002) **Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity**. *The Journal of biological chemistry* 277, 27577-27580

153 Chu, Y.*, et al.* (2011) **Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1**. *Journal of molecular cell biology* 3, 260-267

154 Petsalaki, E.*, et al.* (2011) **Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation**. *The Journal of cell biology* 195, 449-466

155 Hsu, J.Y.*, et al.* (2000) **Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/Aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes**. *Cell* 102, 279-291

156 Giet, R. and Glover, D.M. (2001) **Drosophila Aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis**. *The Journal of cell biology* 152, 669-682

157 Yamagishi, Y.*, et al.* (2010) **Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation**. *Science* 330, 239-243

158 Carmena, M.*, et al.* (2012) **The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis**. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 789-803

159 Burke, D.J. and Stukenberg, P.T. (2008) **Linking kinetochore-microtubule binding to the spindle checkpoint**. *Developmental cell* 14, 474-479

160 Liu, D.*, et al.* (2009) **Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates**. *Science* 323, 1350-1353

161 Ramadan, K.*, et al.* (2007) **Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin**. *Nature* 450, 1258-1262

162 Gruneberg, U.*, et al.* (2004) **Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2**. *The Journal of cell biology* 166, 167-172

163 Douglas, M.E.*, et al.* (2010) **Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis**. *Current biology : CB* 20, 927-933

164 Kawajiri, A.*, et al.* (2003) **Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase**. *Molecular biology of the cell* 14, 1489-1500

165 Stewart, S. and Fang, G. (2005) **Destruction box-dependent degradation of Aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1**. *Cancer research* 65, 8730-8735

166 Sasai, K.*, et al.* (2004) **Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells**. *Cell motility and the cytoskeleton* 59, 249-263

167 Dieterich, K.*, et al.* (2007) **Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility**. *Nature genetics* 39, 661-665

168 Pan, J.*, et al.* (2004) **An Aurora kinase is essential for flagellar disassembly in Chlamydomonas**. *Developmental cell* 6, 445-451

169 Li, H.*, et al.* (2008) **Dictyostelium Aurora kinase has properties of both Aurora A and Aurora B kinases**. *Eukaryotic cell* 7, 894-905

170 Siman-Tov, M.M.*, et al.* (2001) **Identification and cloning of Lmairk, a member of the Aurora/Ipl1p protein kinase family, from the human protozoan parasite Leishmania**. *Biochimica et biophysica acta* 1519, 241-245

171 Carvalho, T.G.*, et al.* (2013) **Nima- and Aurora-related kinases of malaria parasites**. *Biochimica et biophysica acta*

172 Davids, B.J.*, et al.* (2008) **Giardia lamblia Aurora kinase: a regulator of mitosis in a binucleate parasite**. *International journal for parasitology* 38, 353-369

173 Tu, X.*, et al.* (2006) **An Aurora kinase homologue is involved in regulating both mitosis and cytokinesis in Trypanosoma brucei**. *The Journal of biological chemistry* 281, 9677-9687

174 Li, Z. and Wang, C.C. (2006) **Changing roles of Aurora-B kinase in two life cycle stages of Trypanosoma brucei**. *Eukaryotic cell* 5, 1026-1035

175 Li, Z.*, et al.* (2008) **Identification of a novel chromosomal passenger complex and its unique localization during cytokinesis in Trypanosoma brucei**. *PloS one* 3, e2354

176 Mumberg, D.*, et al.* (1995) **Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds**. *Gene* 156, 119-122

177 Vazquez, M.P. and Levin, M.J. (1999) **Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved Trypanosoma cruzi expression vector**. *Gene* 239, 217-225

178 Kelly, J.M.*, et al.* (1992) **A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in Trypanosoma cruzi and Leishmania**. *Nucleic acids research* 20, 3963-3969

179 Laemmli, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227, 680-685

180 Camargo, E.P. (1964) **Growth and Differentiation in Trypanosoma Cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 6, 93-100

181 Cazzulo, J.J.*, et al.* (1985) **End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids**. *Molecular and biochemical parasitology* 16, 329-343

182 Johnson, L.N.*, et al.* (1996) **Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation**. *Cell* 85, 149-158

183 Bischoff, J.R. and Plowman, G.D. (1999) **The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis**. *Trends in cell biology* 9, 454-459

184 Cheetham, G.M.*, et al.* (2002) **Crystal structure of Aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase**. *The Journal of biological chemistry* 277, 42419-42422

185 Nowakowski, J.*, et al.* (2002) **Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography**. *Structure* 10, 1659-1667

186 Littlepage, L.E.*, et al.* (2002) **Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15440-15445

187 Tatchell, K.*, et al.* (2011) **Temperature-sensitive ipl1-2/Aurora B mutation is suppressed by mutations in TOR complex 1 via the Glc7/PP1 phosphatase**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3994-3999

188 Gadelha, C.*, et al.* (2006) **Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes**. *Journal of cell science* 119, 2405-2413

189 Kohl, L. and Gull, K. (1998) **Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton**. *Molecular and biochemical parasitology* 93, 1-9

190 Wehland, J. and Willingham, M.C. (1983) **A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. II. Effects on cell movement, organization of microtubules, and intermediate filaments, and arrangement of Golgi elements**. *The Journal of cell biology* 97, 1476-1490

191 Wehland, J.*, et al.* (1983) **A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo**. *The Journal of cell biology* 97, 1467-1475

192 Sherwin, T.*, et al.* (1987) **Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated alpha-tubulin in the microtubules of Trypanosoma brucei brucei**. *The Journal of cell biology* 104, 439-446

193 Robinson, D.*, et al.* (1991) **Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of trypanosomes**. *Methods in enzymology* 196, 285-299

194 Jetton, N.*, et al.* (2009) **The cell cycle as a therapeutic target against Trypanosoma brucei: Hesperadin inhibits Aurora kinase-1 and blocks mitotic progression in bloodstream forms**. *Molecular microbiology* 72, 442-458

195 Li, Z.*, et al.* (2008) **The chromosomal passenger complex and a mitotic kinesin interact with the Tousled-like kinase in trypanosomes to regulate mitosis and cytokinesis**. *PloS one* 3, e3814

196 Li, Z.*, et al.* (2009) **The Aurora Kinase in Trypanosoma brucei plays distinctive roles in metaphase-anaphase transition and cytokinetic initiation**. *PLoS pathogens* 5, e1000575

197 Adams, R.R.*, et al.* (2001) **Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and Aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation**. *The Journal of cell biology* 153, 865-880

198 Carvalho, A.*, et al.* (2003) **Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells**. *Journal of cell science* 116, 2987-2998

199 Gassmann, R.*, et al.* (2004) **Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle**. *The Journal of cell biology* 166, 179-191

200 Lens, S.M.*, et al.* (2003) **Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension**. *The EMBO journal* 22, 2934-2947

201 Vader, G.*, et al.* (2006) **Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody**. *EMBO reports* 7, 85-92

202 Tanaka, T.U.*, et al.* (2002) **Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections**. *Cell* 108, 317-329

203 Fernandez Villamil, S.H.*, et al.* (2008) **TcPARP: A DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase from Trypanosoma cruzi**. *International journal for parasitology* 38, 277-287

204 Fernandez-Miranda, G.*, et al.* (2010) **SUMOylation modulates the function of Aurora-B kinase**. *Journal of cell science* 123, 2823-2833

205 Bayona, J.C.*, et al.* (2011) **SUMOylation pathway in Trypanosoma cruzi: functional characterization and proteomic analysis of target proteins**. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M110 007369

206 Monaco, L.*, et al.* (2005) **Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14244-14248

207 Hilgarth, R.S. and Sarge, K.D. (2005) **Detection of sumoylated proteins**. *Methods Mol Biol* 301, 329-338

208 Crosio, C.*, et al.* (2002) **Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases**. *Molecular and cellular biology* 22, 874-885